

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Efecto del lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana* en la translocación de NF- κ B y su correlación con la producción de IL-12 en monocitos y células dendríticas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

JOSÉ DE JESÚS ARGUETA DONOHUÉ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH

MÉXICO, D. F.

AGOSTO, 2006



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.

RECONOCIMIENTOS

El trabajo de tesis estuvo apoyado por el proyecto 45048-M y beca con número de registro 186831 de CONACyT.

El desarrollo de esta tesis estuvo bajo la dirección de la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh en el laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM.

Este proyecto de tesis contó con la colaboración de la Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira y el Dr. Alejandro Zentella Dehesa como miembros del Comité Tutorial.

La revisión de este trabajo además, estuvo a cargo del Dr. Eduardo Alberto García Zepeda y del Dr. Armando Pérez Torres como miembros del jurado.

Se agradece el apoyo de la Dra. Ingeborg Becker Fauser

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Beatriz y Jesús por su infinito cariño y apoyo que sin el no podría ser.

A mi hermano Genaro (:P) por acompañarme.

A Paco por su ayuda, confianza y tolerancia en la vida diaria.

A Reyna por su enorme cariño.

A Toño, Adriana-Emiliano por sus valiosos consejos.

A Iraís por su interminable ayuda y comprensión... besos.

A la familia Argueta y Donohué (abuela y tios).

A la fundación Argueta-Donohué por su inagotable apoyo económico.

A Laila por su amistad y apoyo.

A todos los del laboratorio....

....Gracias

A los de la calle por hacerme cotorros los fines de semana.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
I. 1. Características generales de <i>Leishmania</i>	5
I. 1. 1. Ciclo de vida.....	5
I. 1. 2. Moléculas de superficie de <i>Leishmania</i>	6
I. 1. 2. 1. GP63.....	6
I. 1. 2. 2. LPG.....	6
I. 1. 3. Función del LPG.....	7
I. 2. Células que participan en la respuesta inmune en la leishmaniasis.....	9
I. 2. 1. Monocitos.....	9
I. 2. 1. 1. Clasificación de los monocitos.....	9
I. 2. 1. 2. Funciones de los monocitos en la respuesta inmune.....	10
I. 2. 2. Células dendríticas.....	11
I. 2. 2. 1. Clasificación de las células dendríticas.....	11
I. 2. 2. 2 Diferenciación de las células dendríticas.....	12
I. 2. 2. 3. Funciones de las células dendríticas.....	13
I. 2. 2. 3. 1. Células dendríticas inmaduras.....	14
I. 2. 2. 3. 2. Células dendríticas maduras.....	14
I. 3. Interleucina-12 (IL-12).....	15
I. 3. 1. Estructura de la IL-12.....	16

I. 3. 2. Receptor de la IL-12.....	16
I. 3. 3. Mecanismos reguladores de la producción de la IL-12.....	17
I. 3. 4. Regulación molecular de la IL-12.....	18
I. 3. 5. Función biológica de la IL-12.....	19
I. 4. Factor nuclear kB (NF-kB).....	20
I. 4. 1. Inhibidores de NF-kB.....	21
I. 4. 2. Cinasas de IκB (IKK).....	22
I. 4. 3. Vías de activación de NF-kB.....	23
I. 4. 4. Sitios de unión de NF-kB al ADN.....	24
I. 4. 5. Papel biológico de NF-kB.....	25
II. OBJETIVOS.....	27
III. ANTECEDENTES.....	28
III. 1. Monocitos/Macrófagos.....	28
III. 2. Células dendríticas.....	29
III. 3. Los monocitos y las células dendríticas en otras infecciones causadas por patógenos intracelulares.....	30
IV. METODOLOGÍA.....	31
IV. 1. Purificación de monocitos de sangre periférica humana.....	31
IV. 2. Cultivo de células dendríticas humanas.....	32
IV. 3. Citometría de flujo.....	33
IV. 4. Cuantificación de citocinas por ELISA.....	33
IV. 5. Obtención de núcleos celulares.....	35
IV. 6. Cuantificación de proteínas.....	35
IV. 7. Inmunoanálisis tipo “Western Blot”.....	36

IV. 8. Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA).....	37
IV. 9. Análisis estadístico.....	38
V. RESULTADOS.....	39
V. 1. Células.....	39
V. 1. 1. Diferenciación de monocitos a células dendríticas..	40
V. 2. Cuantificación de citocinas por ELISA.....	44
V. 3. “Western blot”.....	47
V. 4. EMSA.....	48
VI. DISCUSIÓN.....	51
VII. CONCLUSIONES.....	56
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	57

RESUMEN

Leishmania es un parásito intracelular, el cual una vez inoculado es reconocido por distintas células, unas de las cuales son los monocitos y las células dendríticas que tienen una participación muy importante en la respuesta inmune innata tanto en el reconocimiento de organismos patogénicos como en la producción de diversas citocinas como la interleucina-12 (IL-12). La síntesis de IL-12 depende de la estimulación de diferentes tipos de receptores, posterior a la activación de estos receptores se llevan a cabo una serie de vías de señalización que terminan en la activación de distintos factores de transcripción, en el caso de la producción de IL-12 un factor de transcripción que está involucrado es el factor nuclear κ B (NF- κ B).

En este proyecto estudiamos las diferencias en la translocación de NF- κ B en monocitos y células dendríticas humanas en respuesta al lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana*, ya que esta molécula es la más abundante en la membrana del parásito y por lo tanto es reconocida por las células. Se ha observado que existen diferencias en la liberación de IL-12 entre ambas células cuando son expuestas al parásito, nosotros pensamos que estas diferencias en la secreción de IL-12 se deben a la translocación de NF- κ B. Se obtuvieron monocitos y células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica humana. Las células se incubaron con lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana*, se cuantificó IL-12 en los sobrenadantes de cultivo por el método de ELISA. Para el análisis de la translocación de NF- κ B al núcleo las células fueron expuestas al LPG durante 30 min y se realizaron ensayos de retardo electroforético (EMSA) de

las fracciones nucleares de estas células. Se observó que cuando un monocito es expuesto al LPG de *Leishmania mexicana* durante 18 h secreta 2.4 veces menos IL-12 que las células dendríticas. Los retardos mostraron mayor expresión en núcleo de NF- κ B en células dendríticas que en monocitos.

Se observó en este trabajo que los monocitos disminuyen su secreción de IL-12 y muestran una menor translocación de NF- κ B que las células dendríticas cuando son expuestos al LPG. Se sugiere que LPG modula la secreción de IL-12 mediada por NF- κ B.

ABSTRACT

Leishmania (a dimorphic protozoa) is a parasite that once is transmitted by the phlebotomine sandfly into mammalian hosts becomes an obligate intracellular parasite that resides primarily within macrophages and dendritic cells. When *Leishmania* invaded a host, one of the first cells with which it has contact is the dendritic cells. These cells are antigen professional presenters as well as good secretory of proinflammatory cytokines like interleukine 12 (IL-12). This IL-12, which has been described in the defense against the parasite favoring a Th1 response, allows a cellular response and cytokines secretion that eventually activates the macrophage and the elimination of *Leishmania*.

Another cell type that comprises the innate immune response involved in the inactivation of pathogens is the monocytes. The pathogenic antigen is recognized by monocytes and swallowed by phagocytosis, then is cleavages by proteolytic enzymes and oxygen radicals.

A particular molecule involved in evading the antimicrobial answer of the host is the lipophosphoglycan (LPG), which constitutes a dense glicocalix covering the total surface of the parasite, including the flagellum.

During *Leishmania* infection monocytes physically recognize the parasite diminishing IL-12 secretion, failing to block the progression of the disease. However, when dendritic cells interact with the parasite not effect in the IL-12 secretion is observed, disturbing the progression of this infection that leads to the leishmaniasis.

In addition, it is known that the translocación of the transcription factor NF- κ B to the nucleus is required for the production of IL-12, participating indirectly in

an early stage in the immune response since it assures a source of this cytokine that potentially can be released during some infectious process.

In this study we assessed the possibility that the decreased IL-12 production in monocytes is due to the lack of NF- κ B translocation to the nucleus, inducing the negative immune response by monocytes in comparison with dendritic cells, suggesting a different mechanisms of both monocytes and dendritic cells as a result of the *Leishmania*-LPG association.

When cultures of monocytes are exposed to the LPG of *Leishmania mexicana* during 18 h resulted in 2.4 fold decrease in IL-12 secretion compared with the response observed when dendritic cells were exposed to LPG. In order to assess the translocation of NF- κ B to the nucleus, dendritic cells and monocytes were exposed to LPG for 30 min. The results of these experiments indicated an increase in the NF- κ B translocation in dendritic cells compared to monocytes.

Since cytokine IL-12 is important for the immune cellular response known as Th1, the mechanisms of how this cytokine is produced and released is determinant in order to explain the progression of *Leishmania* infection at molecular level.

In this study we suggested:

- The secretion of IL-12 in monocytes is decreased due to diminished translocation of NF- κ B to the nucleus.
- Dendritic cells generated a normal NF- κ B translocation and normal released of IL-12 in response to LPG.

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad presente en todo el mundo, principalmente en zonas tropicales y subtropicales con una prevalencia de 12 millones de casos (1). Esta enfermedad presenta las 2 formas clínicas de leishmaniasis cutánea: Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y difusa (LCD), las cuales son provocadas por el protista del género *Leishmania*. Algunas de las especies de este género son: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, etc., presentes en América. En Europa se encuentran *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*, entre otras (2).

I. 1. Características generales de *Leishmania*

El parásito del género *Leishmania* es un protista flagelado tripanosomatide con ciclo de vida digenético (3).

I. 1. 1. Ciclo de vida

El parásito es transmitido por la hembra del mosquito del género *Phlebotomus* (Europa) o *Lutzomyia* (América) que adquiere el parásito cuando se alimenta de sangre de un individuo infectado. El mosquito ingiere macrófagos repletos de amastigotes, fase donde el parásito es inmóvil y mide de 3-7 μm de diámetro; estos son liberados en el estómago y se transforman en promastigotes, que son móviles, alargados, flagelados y con una longitud de 10-20 μm (4).

Los promastigotes se desarrollan en el intestino medio, donde viven extracelularmente y se reproducen por fisión binaria, posteriormente migran a la

probóscide. El ciclo continúa cuando el mosquito infectado se alimenta de un vertebrado e inyecta los parásitos, los cuales son fagocitados por células de la respuesta inmune (3).

I. 1. 2. Moléculas de superficie de *Leishmania*

Leishmania cuenta con dos grandes familias de moléculas en su superficie, la gp63 y los fosfoglicanos. La familia de los fosfoglicanos de *Leishmania* presenta glicolípidos, tales como el lipofosfoglicano (LPG) y las proteínas fosfoglicosiladas, que son las fosfatasa ácidas de secreción y los proteofosfoglicanos (PPG) (2).

I. 1. 2. 1. GP63

La gp63 es una metaloproteasa de zinc, que se expresa abundantemente en los promastigotes y no así en los amastigotes. Esta enzima participa de manera importante en la infección y supervivencia del parásito. Por ejemplo, puede romper C3b a la forma inactiva iC3b, previniendo la formación del complejo lítico C5b-C9. iC3b es una opsonina que permite que el parásito sea reconocido por receptores del complemento presentes en la célula hospedera y la ausencia de C5b-C9 impide la lisis del parásito por este mecanismo de defensa.

I. 1. 2. 2. LPG

El LPG es la macromolécula de superficie más abundante en los promastigotes del parásito *Leishmania* con aproximadamente 6×10^6 copias por célula. Estructuralmente el LPG (figura 1) se compone de 4 dominios distintos: un frente de sacáridos (casquete), repeticiones de fosfodisacáridos compuestos de

manosa-galactosa, una base de fosfosacáridos y un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (5), el cual es modificado por unidades de fosfoglicanos del LPG son largas, de 20-40 repeticiones por molécula. Estas cadenas son ensambladas en el aparato de Golgi y son modificadas con cadenas laterales de monosacáridos y glicanos, así como con cadenas terminales de oligosacáridos (casquete). Se conocen 2 genes que codifican para las enzimas que participan en la síntesis de LPG, *lpg1* y *lpg2*. (6).

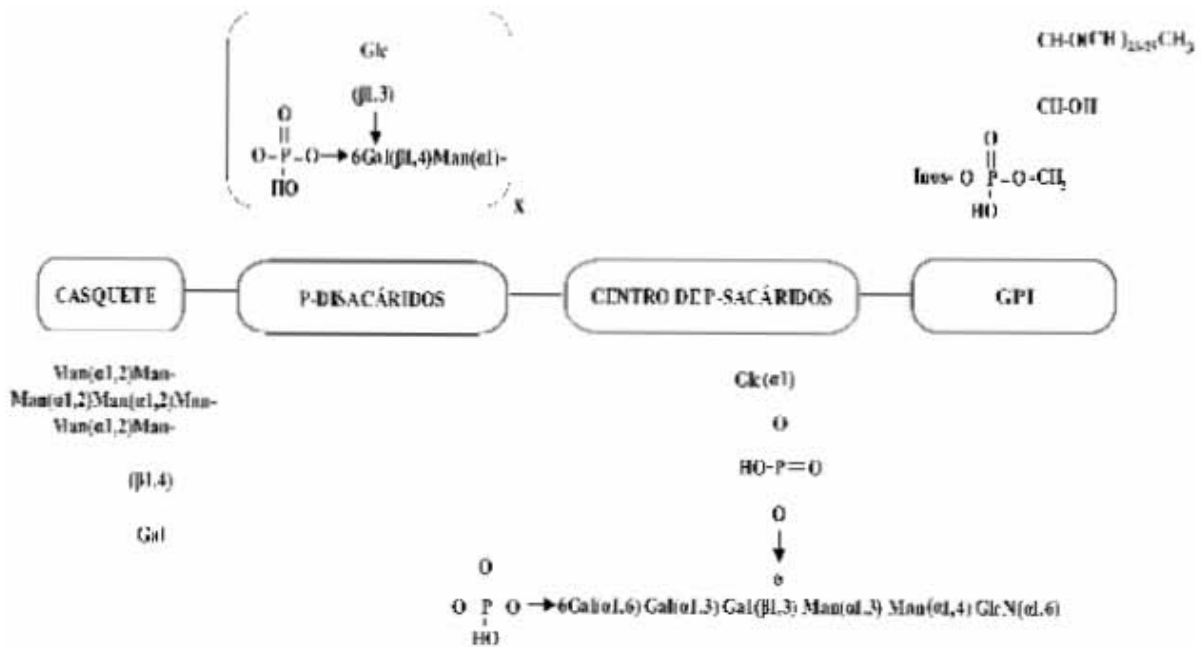


Figura 1. Estructura consenso de LPG de *Leishmania mexicana* en donde se muestran los cuatro dominios presentes en la molécula (7).

I. 1. 3. Función del LPG

En la forma móvil del parásito (promastigote) existen dos estadios, la forma no infectiva inmadura que son llamados promastigotes procíclicos y la forma infectiva madura, que se conocen como promastigotes metacíclicos. La

transformación de parásitos inmaduros a maduros involucra cambios en la estructura del LPG.

El LPG constituye un glicocálix denso que cubre la superficie del parásito, incluyendo al flagelo. Los parásitos inmaduros expresan moléculas cortas de LPG, mientras que en la forma madura, el LPG forma un glicocálix más grueso debido al complejo formado por los residuos de β -galactosa con α -arabinosa y un incremento de 2 a 3 veces en el número de sacáridos en la región de fosfosacáridos compuestos de manosa-galactosa (8). Estos cambios conformacionales son importantes para la unión de los promastigotes a las células epiteliales en el intestino medio del mosco. El promastigote metacíclico migra del intestino medio a la probóscide, cuando el mosco se alimenta, transfiere los promastigotes metacíclicos al hospedero. Una vez dentro del hospedero, el parásito debe evitar los mecanismos microbicidas del organismo infectado. En el torrente sanguíneo, los promastigotes procíclicos son extremadamente sensibles a la lisis mediada por complemento por la vía alterna, mientras que la forma metacíclica activa la vía clásica, pero no es destruido debido a su grueso glicocalix, el cual evita que se forme el complejo de ataque a la membrana (MAC).

Una vez que los parásitos están en el hospedero pueden ser reconocidos por diferentes receptores presentes en monocitos/macrófagos y células dendríticas. Específicamente, el LPG es reconocido por los monocitos/macrófagos a través de la unión al sitio tipo lectina del receptor del complemento 3 (CR3) y al CR1. La unión a los receptores del complemento no activa el estallido respiratorio, por el contrario, la opsonización del parásito por complemento aumenta la

sobrevivencia de éste en el hospedero. Una vez que el parásito ha entrado al macrófago, el LPG puede inhibir la fusión fagosoma-lisosoma, protegiendo al parásito de enzimas hidrolíticas que pueden destruirlo.(9)

I. 2. Células que participan en la respuesta inmune en la leishmaniasis

Los principales hospederos del parásito *Leishmania* son los monocitos/macrófagos y las células dendríticas.

I. 2. 1 Monocitos

Los monocitos varían en tamaño y morfología nuclear. En sangre periférica estas células constituyen del 5-10% de los leucocitos circulantes en humanos. En 1939 Ebert y Florey observaron que los monocitos que migraban de los vasos sanguíneos se transformaban a macrófagos en los tejidos. Una de las células fagocíticas más importantes en los vertebrados es el macrófago, uno de cuyos papeles importantes es la detección y eliminación de microorganismos patogénicos (10).

I. 2. 1. 1. Clasificación de los monocitos

Los monocitos son identificados principalmente por la expresión elevada del receptor para lipopolisacárido (LPS) que es el CD14. Debido a las diferencias en la expresión de CD14 y el receptor III para el segmento Fc de las inmunoglobulinas (CD16), los monocitos se han clasificado en 2 subtipos:

- 1) CD14^{hi} CD16⁻, denominados monocitos clásicos.

2) CD14⁺ CD16⁺, que presentan mayor cantidad de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) y del receptor II para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas (CD32) (11). Se ha sugerido que estas células son las precursoras de los macrófagos de tejidos (12).

Ambos subtipos celulares se diferencian a células dendríticas al ser estimulados *in vitro* con IL-4 y GM-CSF. Recientemente, se ha encontrado otro subtipo de monocitos que expresan CD14, CD16 y el receptor I del fragmento Fc de las inmunoglobulinas (CD64), las cuales se ha visto que combinan las características de monocitos y células dendríticas (13).

I. 2. 1. 2. Funciones de los monocitos en la respuesta inmune

Los macrófagos participan en la respuesta inmune como moduladores y efectores. Reconocen organismos infecciosos debido a la presencia de una serie de receptores entre los que se encuentran los receptores de la familia de los TLRs, los receptores de manosa, receptores del complemento y receptores Fc, entre otros. Algunos de estos receptores inducen la fagocitosis, lo que permite limitar la diseminación y/o crecimiento de los organismos infecciosos. Los macrófagos poseen también un repertorio preformado de moléculas antimicrobianas contenidas en sus gránulos y lisosomas. Entre estas moléculas se encuentran proteasas, nucleasas, fosfatasas, esterases y lipasas, que son liberadas al fagolisosoma en el que se encapsula al organismo invasor fagocitado (14).

1. 2. 2. Células dendríticas

Las células dendríticas (CD) fueron descubiertas por Paul Langerhans en 1868 y después fueron llamadas células de Langerhans (CL). Estas células se encuentran en la epidermis y representan el 5% del total de las células de ese epitelio (15).

En 1973, Ralph M. Steinman y Zanvil A. Cohn describieron un grupo de células obtenidas de bazo de ratón que presentaban características diferentes a las de otras células ya conocidas tales como fagocitos mononucleares, granulocitos y linfocitos. Estas células eran alargadas y de forma estrellada por lo que fueron llamadas células dendríticas (16).

I. 2. 2. 1. Clasificación de las células dendríticas

Las CD son un grupo complejo de células derivadas de médula ósea. Presentan una gran diversidad por lo que las CD en humanos se han clasificado con base a tres criterios:

a) Células precursoras. En humanos, al menos tres subtipos de precursores de CD circulan en la sangre: i) $CD11c^+ CD14^+$, ii) $CD11c^+ CD123^{lo}$, llamadas CD mieloides, y iii) $CD11c^- CD123^{hi}$, $CD303$, $CD304$, llamadas CD plasmacitoides (17) (18).

b) Localización anatómica. La población de las CD representa sólo una pequeña parte de las células mononucleares de sangre periférica, así como también, una parte de la población celular de pulmones, de intestinos, del sistema genitourinario, del tejido linfoide y de la piel. El nivel de heterogeneidad relacionado a su localización incluye a las CL, CD dérmicas, CD de bazo, células

interdigitantes de la zona de células T en ganglios linfáticos, CD de timo, CD de hígado y CD circulantes en sangre periférica. Existen las CD foliculares que no son de origen linfoide y están restringidas a la zona folicular de los tejidos linfoides secundarios (13).

c) Funciones. Los subtipos antes mencionados de CD ejercen diferentes funciones, particularmente en la regulación de la proliferación de células B y la diferenciación de células T (19).

I. 2. 2. 2. Diferenciación de las células dendríticas

Las CD están muy relacionadas a otras células de origen mieloide, en particular a los monocitos y a los macrófagos (20).

La habilidad de los monocitos para diferenciarse en CD fue demostrada por Sallusto y Lanzavecchia (21), quienes reportaron la generación de células dendríticas derivadas de monocitos después de cultivarlas con el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleucina-4 (IL-4).

La diferenciación de monocitos a CD *in vitro* no puede imitar las condiciones fisiológicas de la diferenciación *in vivo*. Sin embargo, son una herramienta muy poderosa para estudiar los factores que controlan la diferenciación de estas células, así como su respuesta a diversos antígenos como, por ejemplo, moléculas de parásitos protistas (22).

Randolph *et al.* reportó la diferenciación de monocitos a CD *in vivo*, en donde ellos concluyeron que cerca del 25% de los monocitos se diferenciaron a

CD y migraron a los nódulos linfáticos, mientras que el resto permaneció en el sitio de inyección del antígeno y se diferenciaron a macrófagos (23).

I. 2. 2. 3. Funciones de las células dendríticas

Las CD se especializan en la captura, transporte, procesamiento y presentación de antígenos. Las CD pueden activar a los linfocitos T y favorecer una respuesta humoral o celular, dependiendo del tipo de antígeno y de las citocinas secretadas. Por ejemplo, en la leishmaniasis se sabe que las CD favorecen una respuesta de tipo celular (Th1) llevada a cabo, en parte, por la secreción de interleucina 12 (IL-12) (24).

Las CD se dividen en CD inmaduras (CDi) y CD maduras (CDm) de acuerdo a su fase de desarrollo. El estado de maduración está muy relacionado con la función de las células, en donde las CDi principalmente captan y procesan antígenos, mientras que las CDm presentan antígenos y aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86. Se ha observado que las CD están involucradas en la inducción de tolerancia. Steinman y colaboradores mostraron evidencias de que la inmunidad y la tolerancia están determinadas por el estado de maduración de las CD, donde sólo las CDm promueven la completa estimulación del linfocito T (25). En contraste Albert y colaboradores presentaron evidencias de que la maduración *per se* puede no ser el factor determinante. Ellos mostraron que las CD maduras *in vitro* con TNF α y prostaglandina E2, que presentan moléculas coestimuladoras como CD86, pueden generar linfocitos T tolerantes (26), (27).

I. 2. 2. 3. 1. Células dendríticas inmaduras

Las CDi se encuentran en sitios periféricos tales como la piel y las mucosas. Se especializan en la captura y procesamiento de antígenos endógenos o exógenos. Los antígenos exógenos pueden ser de bacterias, virus, células necróticas o apoptóticas, proteínas (proteínas de choque térmico) y complejos inmunes. Estos antígenos son capturados por fagocitosis, pinocitosis y endocitosis con la ayuda de receptores de superficie de la célula. Algunos de éstos son receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina y C3b, integrinas, lectinas tipo C y receptores “scavenger”. Estas células también expresan receptores para citocinas proinflamatorias tales como IL-12, TNF α , entre otros, así como moléculas coestimuladoras y presentadoras de antígenos (tabla 1). Presentan también receptores de reconocimiento de patrones moleculares como los TLR's, los cuales permiten detectar la presencia de organismos patogénicos. Estas células también tienen la capacidad de migrar a las regiones de células T en ganglios linfáticos y bazo. (28, 29).

I. 2. 2. 3. 2. Células dendríticas maduras

La maduración de las CD es inducida por estímulos llamados “señales de peligro”, provocados por la presencia de organismos patogénicos, por la inflamación o destrucción de tejidos. Estas señales de peligro activan un programa de diferenciación en la CD, el cual resulta en la secreción de diversas citocinas y quimiocinas, en la disminución de la captura de antígenos, aumento en las moléculas coestimuladoras (tabla 1), así como un incremento en la presentación

de antígenos principalmente a células T. De igual manera se da un aumento en la motilidad celular lo que favorece la migración de estas células a órganos linfoides secundarios (18).

Tabla1 Marcadores de CD inmaduras (CDi) y CD maduras (CDm) (30)

Marcador	CDi	CDm
CD1a	Si	Si
CD14	No	No
CD36	Si / bajo	No
CD83	No / bajo	Si
CD86	Si / bajo	Si / alto
CD115	Si / bajo	No
CD25	No	Si
MHCII	Si	Si / alto

I. 3. Interleucina-12 (IL-12)

Como ya se mencionó anteriormente, las CD juegan un papel muy importante en la inducción de una respuesta inmune celular tipo Th1, mediada, en parte, por la secreción de IL-12. Esta citocina fue purificada por primera vez en 1989 y se observó que era distinta a las otras citocinas conocidas, ya que presenta una estructura molecular única compuesta de dos cadenas, p40 y p35 unidas covalentemente. Se identificó inicialmente como una molécula capaz de estimular a las células asesinas naturales (NK), de inducir la producción de interferón γ (IFN γ) por células NK y células T y de favorecer la proliferación de células T vírgenes (31).

I. 3. 1. Estructura de la IL-12

La IL-12 es una proteína formada por una cadena ligera de 35 kDa (conocida como p35 o IL-12 α) y una cadena pesada de 40 kDa (conocida como p40 o IL-12 β) unidas por un puente disulfuro (32). La subunidad p40 puede encontrarse extracelularmente como monómero (IL-12p40) o formando homodímeros (IL-12(p40)₂). La subunidad p35 no es secretada en forma de monómero. Las dos subunidades forman el heterodímero IL-12p70 (figura 2). La subunidad p40 es producida por macrófagos y CD, los cuales producen la IL-12p70, que es la molécula con actividad biológica. (33, 34).

I. 3. 2. Receptor de la IL-12

La respuesta inmune está regulada entre otros factores por la acción de citocinas proinflamatorias y reguladoras, las cuales se unen a receptores específicos expresados en las células. El receptor de IL-12 está compuesto por 2 cadenas IL-12R α e IL-12R β (35), y tiene una densidad en células mononucleares de 2000 receptores por célula y una $K_D = 571\text{pM}$ (36) (figura 2). El receptor de IL-12 (IL-12R) es expresado principalmente por células T activadas, células NK, CD y células B.

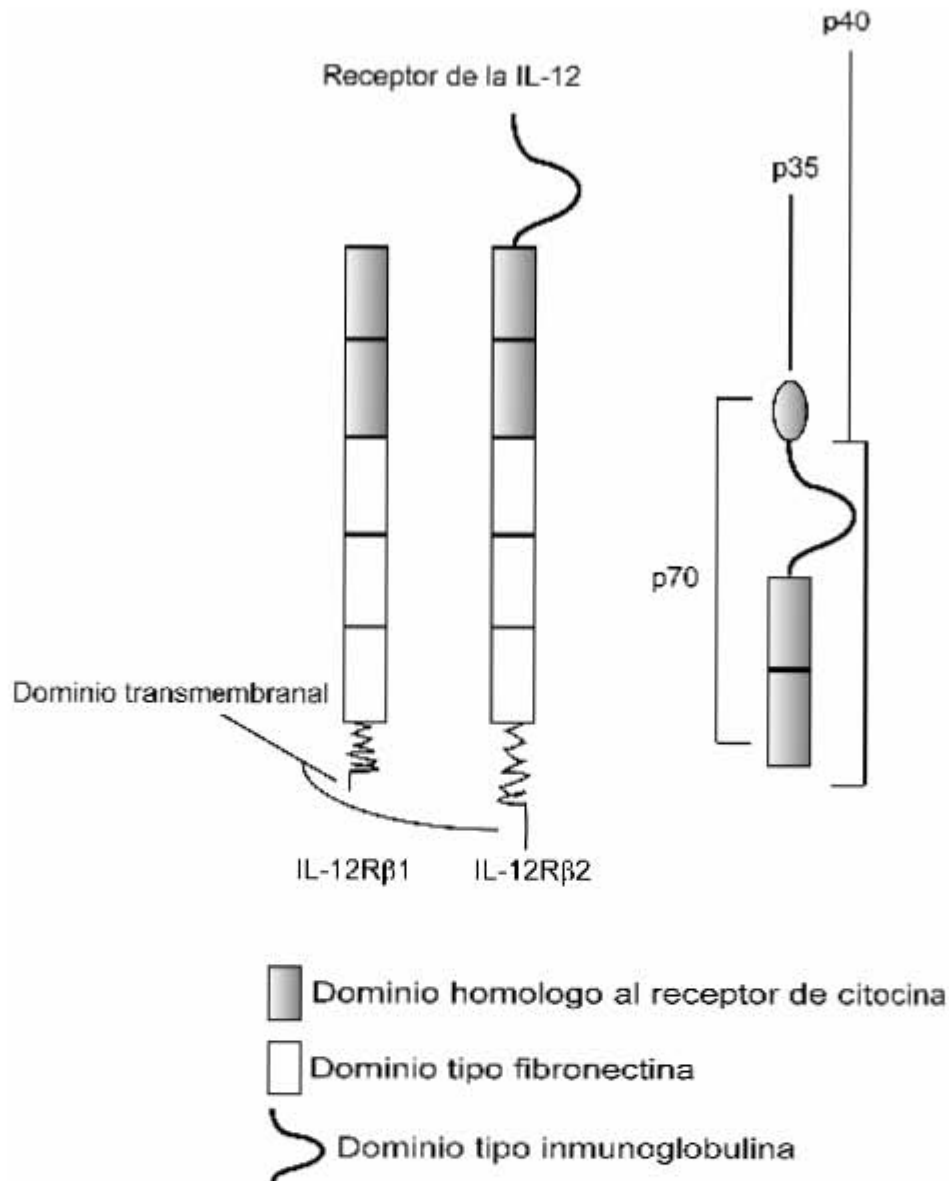


Figura 2. Estructura de la IL-12 y de su receptor IL-12R. Se observan las subunidades IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2 del receptor para IL-12 y las subunidades p35 y p40 que forman el heterodímero p70.

I.3.3. Mecanismos reguladores de la producción de IL-12

La producción de IL-12 puede ser inducida principalmente por dos mecanismos. El primer mecanismo está relacionado con la interacción de las células productoras de IL-12 con varios microorganismos intracelulares tales como *Listeria monocytogenes*, *L. major* y *Toxoplasma gondii*, así como distintos tipos de

virus. Se ha informado también que la producción de IL-12 puede ser inducida por el LPS bacteriano, la enterotoxina B de *Staphylococcus* y nucleótidos CpG no metilados (37). El otro mecanismo por el cual se induce la producción de IL-12 involucra la estimulación de la molécula coestimuladora CD40 de células presentadoras de antígenos con el ligando de CD40 (CD40L) durante la interacción del linfocito T con la célula presentadora de antígenos (38). En la regulación de la producción de IL-12 participan también algunas citocinas. Los reguladores positivos más importantes de la IL-12 son IFN γ , TNF α y GM-CSF y los reguladores negativos son IL-10, IL-4, IL-11, IL-13, TGF β e IFN α/β (39).

I. 3. 4. Regulación molecular de la IL-12

La subunidad p35 está regulada a nivel de transcripción y de traducción. A nivel de transcripción existen diferentes sitios que producen ARNm para p35 con diferentes eficiencias en su traducción. En células sin estímulo alguno, la síntesis del ARNm para p35 tiene una región inhibitoria (ATG) en el extremo 5'. Se ha observado que cuando las células son estimuladas con LPS, la región inhibitoria es excluida y ocurre la traducción (40).

La producción de p40 está regulada a nivel de la transcripción y se induce en gran medida por antígenos microbianos como LPG y LPS. Los promotores del gen de p40 contienen sitios de unión para distintos factores de transcripción tales como NF- κ B, IRF-1 y miembros de la familia Ets. Se han identificado dos elementos en *cis* involucrados en la regulación de la transcripción del gen de p40 activado por LPS e IFN γ . Estos son un sitio *ets* en la posición -211/-206 (TTTCCT)

y un sitio para NF- κ B en la posición -117/-107 (TGAAATTCCCC). En el sitio para NF- κ B se unen los heterodímeros p50/p65 y p50/c-Rel, siendo este último más selectivo para la activación del gen para IL-12p40. Adicionalmente, a la regulación de esta citocina por NF- κ B, se sabe que están implicados también las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) p38, AMP cíclico, canales y bombas iónicas de la membrana celular, óxido nítrico (NO) y receptores de membrana tales como CD46 que une C3b, C4b y CD19 que es un co-receptor en linfocitos B (41).

I. 3. 5. Función biológica de la IL-12

La IL-12 es producida en respuesta a bacterias intracelulares e infecciones parasitarias. Induce la producción de IFN γ , TNF α , GM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-8 e IL-2, principalmente por linfocitos T y células NK y favorece la generación y activación de linfocitos T citotóxicos y células NK. Asimismo dirige las respuestas inmunes innata y adaptativa junto con el IFN γ en contra de tumores así como también potencian la actividad microbicida del macrófago.

Adicional a su participación en la respuesta inmune innata, la IL-12 regula la respuesta inmune adaptativa, al promover la diferenciación del linfocito T CD4⁺ a linfocito T cooperador 1 (Th1) el cual favorece una respuesta de tipo celular. Es por todo esto que a esta citocina se le conoce como la que conecta la inmunidad innata con la inmunidad específica (31).

I. 4. Factor nuclear κ B (NF- κ B)

Los factores de transcripción son moléculas que convierten las señales detectadas por la célula en la activación o represión de distintos genes que regulan respuestas celulares tales como proliferación, diferenciación o apoptosis. Uno de estos factores de transcripción es NF- κ B, un complejo de señalización conservado a través de la evolución que juega un papel muy importante en muchos procesos biológicos tales como el desarrollo del embrión y la muerte celular programada. Además, este factor de transcripción está involucrado en distintos eventos de la respuesta inmune como por ejemplo, en la expresión génica de receptores de la respuesta inmune y en la regulación de citocinas y factores de crecimiento (42).

En mamíferos, la familia de NF- κ B está compuesta por cinco miembros que son NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB y c-Rel (figura 3). NF- κ B1 y NF- κ B2 son sintetizados como precursores p105 y p100, los cuales son procesados a las subunidades p50 y p52, respectivamente y son las que tienen la capacidad de unirse al ADN (43).

Las proteínas de NF- κ B se caracterizan por la presencia de una región conservada de 300 aminoácidos llamada dominio homólogo a Rel (RHD), el cual está localizado cerca de la región amino-terminal de la proteína. La región RHD contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) y está involucrada en la dimerización (tabla 2), en la unión a una secuencia específica de ADN y en la interacción con los inhibidores de NF- κ B (I κ Bs) (44).

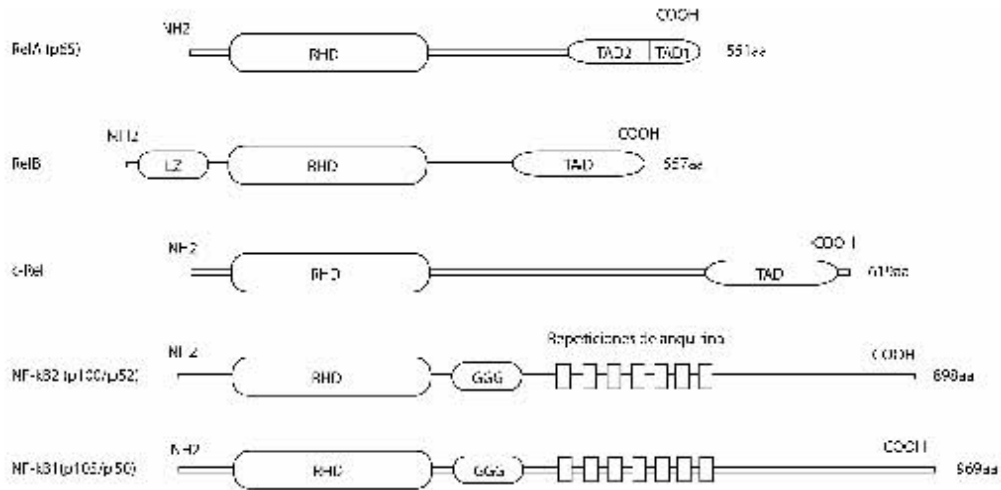


Figura 3. Familia de NF- κ B. Se muestran los diferentes dominios presentes en las proteínas tales como dominio de homología a Rel (RHD), dominio de transactivación (TAD), "zipper" de leucina (LZ) y región rica en glicina (GGG) (44).

I. 4. 1. Inhibidores de NF- κ B

En muchos tipos celulares, los dímeros de NF- κ B son retenidos en el citoplasma por los I κ Bs, los cuales son inhibidores específicos que se unen al RHD e interfieren con la función de NLS. La familia de I κ B está compuesta por 7 miembros: I κ B α , I κ B β , BCL-3, I κ B ϵ , I κ B γ y las proteínas precursoras ya mencionadas p100 y p105. Estas proteínas están caracterizadas por la presencia de 5 a 7 repeticiones de anquirina, que son módulos proteínicos que median la interacción proteína-proteína, que están organizados como cilindros alargados (44), las cuales se unen al dominio de dimerización de NF- κ B (figura 4) (45).

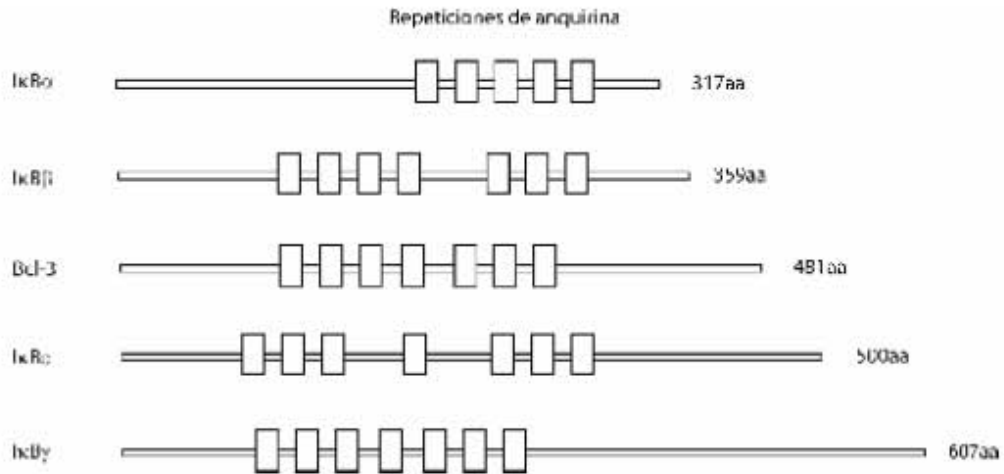


Figura 4. Familia de IκB, inhibidores de NF-κB. Las cajas rectangulares representan las repeticiones de anquirina presentes en todos los miembros (44).

I. 4. 2. Cinasas de IκB (IKK)

La degradación de IκB es un evento que se inicia por la fosforilación de una cinasa de IκB (IKK). En un complejo purificado de 700 a 900 kDa se demostró la presencia de dos subunidades de cinasa, IKKα (IKK1) e IKKβ (IKK2) y una subunidad reguladora, NEMO (modificador esencial de NF-κB) o IKKγ (figura 5) (46).

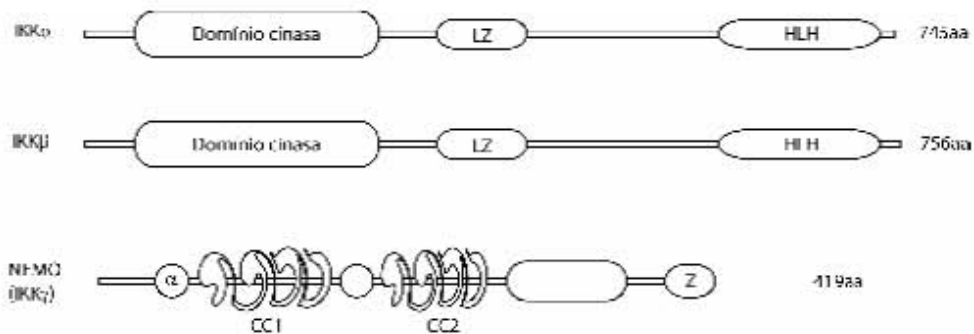


Figura 5. Familia de las cinasas de IκB (IKK), Se indican las regiones más importantes presentes en las proteínas como por ejemplo el “Zipper” de leucina (LZ), “helix-loop-helix” (HLH), dominio α-hélice (α), “coiled-coil domains” (CC1/2), domino de dedos de zinc (Z) (36).

I. 4. 3. Vías de activación de NF- κ B

Existen dos vías de señalización que llevan a la translocación de NF- κ B del citoplasma al núcleo. Diversas citocinas proinflamatorias y patrones moleculares asociados a organismos patogénicos (PAMPs) activan diferentes tipos de receptores tales como los de la familia de TNF (TNFR), receptores tipo Toll (TLR) y receptores de células T (TCR), que provocan una activación del complejo IKK (47).

En la vía clásica de señalización de NF- κ B el complejo IKK activado generalmente actúa por medio de IKK β dependiente de IKK γ , que cataliza la fosforilación de I κ B (Ser32 y Ser36 de I κ B α), para posteriormente ser ubiquitinado por miembros de la familia de las ubiquitin ligasas (SCF o SCRF) (Lys21, Lys22 de I κ B α) y degradado por el proteosoma 26S. Los dímeros liberados de NF- κ B (generalmente p50-RelA) se translocan al núcleo, se unen al ADN y activan la transcripción de algún gen.

En la vía alterna, los homodímeros de IKK α son activados y fosforilan a NF- κ B2/p100, el cual es fosforilado en dos sitios de la región carboxilo-terminal. La fosforilación en estos dos sitios es esencial para degradar a p100 hacia p52. La fosforilación y ubiquitinación de p100 sólo degrada la región inhibitoria carboxilo-terminal; una vez que esta región es degradada, la porción amino-terminal (RHD de p52) es liberada. La proteína p100 se asocia comúnmente a RelB y la activación de esta vía lleva a la translocación nuclear del dímero p52-RelB.

Como se mencionó anteriormente el primer nivel de regulación de la actividad de NF- κ B está dado en el citoplasma donde este factor es liberado de

sus subunidades inhibitorias para ingresar al núcleo. Se ha encontrado que otro nivel de regulación de NF- κ B es la fosforilación de la subunidad p65 (RelA) en el carboxilo-terminal del dominio de transactivación y en el RHD.

Algunos investigadores han demostrado que la interleucina-1 (IL-1) y TNF inducen fosforilación y activación de la subunidad p65 por vías que son distintas de aquellas que llevan a la degradación de I κ B (46) (figura 6).

I. 4. 4. Sitios de unión de NF- κ B al ADN

Estas proteínas se unen selectivamente a la secuencia consenso 5'-GGGRNWYYCC-3' donde R es una purina, W es adenina o timina, Y es una pirimidina y N puede ser cualquier base. Esta secuencia se encuentra en el promotor de una gran variedad de genes. La secuencia consenso κ B en el ADN tiene cientos de variaciones en los genes promotores. En 2005, Huang y colaboradores propusieron clasificar en dos clases los sitios κ B del ADN (47)

1) Los sitios κ B clase I que están compuestos de 10 pb u 11 pb donde preferentemente se unen los homo- y heterodímeros de p50 y p52.

2) Los sitios clase II de 9 pb donde se unen homodímeros de p65 y c-Rel y heterodímeros de p65/c-Rel.

I. 4. 5. Papel biológico de NF-κB

La activación por la vía clásica y la translocación nuclear de los dímeros de NF-κB (principalmente p50-RelA) está asociado principalmente con la transcripción de genes que codifican quimiocinas, citocinas, moléculas de adhesión [molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y molécula de adhesión leucocito-endotelial 1 (ELAM-1)], enzimas que producen mediadores inflamatorios secundarios e inhibidores de la apoptosis. En la vía alterna se transcriben genes que codifican para quimiocinas (CXCL15, CCL21, CXCL12), para proteínas que activan organogénesis linfoide, entre otros (47).

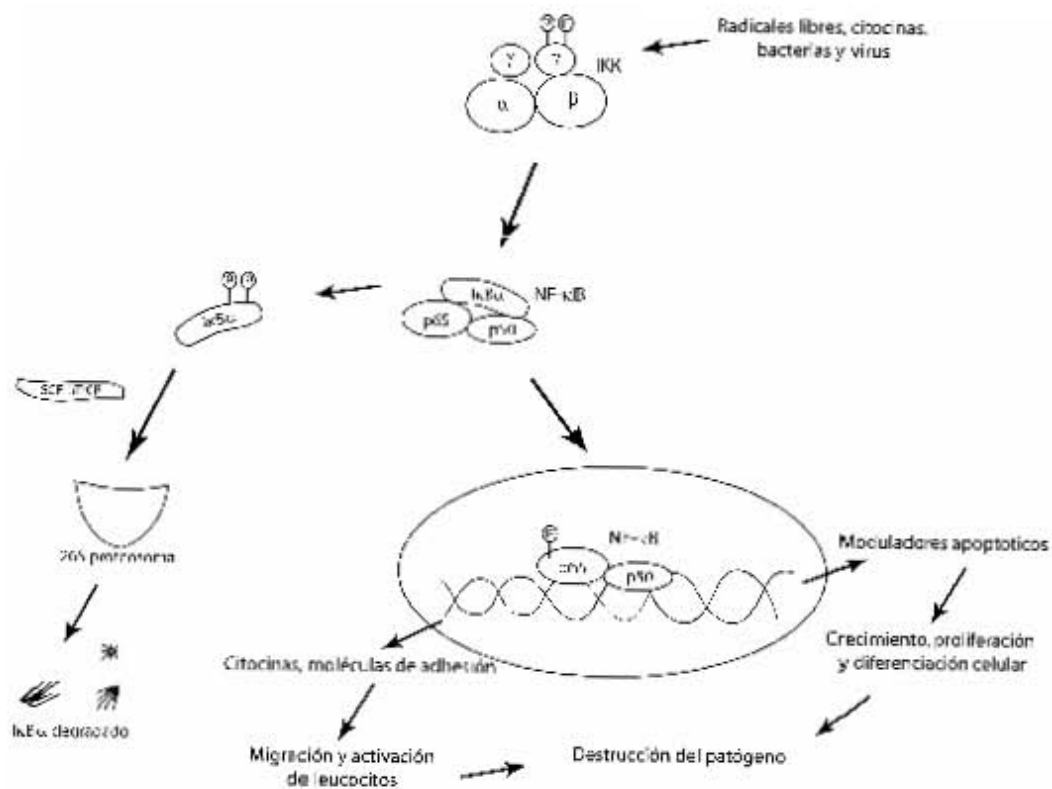


Figura 6. Vía de activación de NF-κB. Se muestra de manera general como se lleva a cabo la translocación de NF-κB al núcleo.

Tabla 2. Proteínas de NF- κ B/Rel, I κ B e IKK.

Proteínas	Sinónimo	Complejos
NF-κB/Rel		
p50/p105 (NF- κ B1)	p110, KBF1, EBO-1	RelA, Rel., Bcl-3
p52/p100 (NF- κ B2)	p50B o p97, p49 o p100, p55 o p98, Lyt10, H2TF1	RelB, Bcl-3
RelA	p65	p50, p52
RelB	I-Rel	p50, p52
c-Rel	Sin nombre	p50, p52, RelA
v-Rel	Sin nombre	p50, p52
IκB		
I κ B α	MAD-3, pp40, RL/IF-1, ECI-6	Todos los dímeros de NF- κ B
I κ B β	Sin nombre	Todos los dímeros de NF- κ B
I κ B γ	p105/pdl, porción C-terminal de p105	Todos los dímeros de NF- κ B
I κ B ϵ	Sin nombre	Todos los dímeros de NF- κ B
Bcl-3	Sin nombre	Todos los dímeros de NF- κ B
Cinasa de IκB (IKK)		
IKK α	IKK1, CHUK	No se sabe
IKK β	IKK2	No se sabe
IKK γ	IKK3, NEMO (Modificador esencial de NF- κ B)	No se sabe

II. OBJETIVOS

El parásito *Leishmania* tiene la capacidad de inhibir o disminuir la producción de IL-12 en monocitos infectados y no así en CD. No se conoce el mecanismo a través del cual el parásito ejerce este efecto sobre la producción de IL-12. El objetivo general de este trabajo fue analizar el efecto que ejerce el LPG de *L. mexicana* en la secreción de IL-12 y su relación con NF- κ B en CD y monocitos humanos. Los objetivos particulares fueron los siguientes:

II.1 Analizar la secreción de IL-12, IL-10 y TNF α en CD y monocitos humanos estimulados con LPG de *L. mexicana*

II.2 Analizar la translocación de NF- κ B en CD y monocitos humanos posteriormente a la estimulación con LPG de *L. mexicana*.

III. ANTECEDENTES

En la leishmaniasis, dos de las principales células hospederas del parásito son los monocitos/macrófagos y las CD.

III. 1. Monocitos/Macrófagos

Se ha estudiado de manera importante la forma en que el parásito de *Leishmania* puede modular la respuesta inmune en las células hospederas. Cuando los monocitos/macrófagos son infectados por el parásito, los mecanismos de interacción con los linfocitos T se alteran. Por ejemplo, los amastigotes pueden degradar, suprimir la síntesis e inhibir la carga de antígenos en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) (48); además, existe una expresión deficiente en las moléculas coestimuladoras como CD80 (49). Otros estudios han demostrado que *Leishmania* disminuye la inducción de la citocina proinflamatoria IL-12 y aunado a esto, los macrófagos infectados y estimulados posteriormente con $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$, son incapaces de producir IL-12 (50). Carrera *et al.* demostraron que en macrófagos estimulados con promastigotes de *Leishmania* disminuye el ARNm para IL-12p40; así mismo observaron que existía una débil inhibición del ARNm y de la proteína de otras citocinas como IL-1 α y β , $\text{TNF}\alpha$ y de la proteína inductora de la sintetasa de óxido nítrico (iNOS). Además, observaron un aumento en la expresión de IL-10, citocina que se sabe regula la secreción de citocinas proinflamatorias (51).

Algunos estudios han tratado de correlacionar la producción de citocinas con la activación de ciertos factores nucleares cuando las células son expuestas al

parásito, a componentes de su membrana o a moléculas secretadas por él mismo. En un estudio realizado por Piedrafita, demostraron que cuando estimulan macrófagos murinos de la línea celular J774, con fosfoglicano (PG) de *Leishmania*, existe disminución en el ARNm y disminuye la secreción de IL-12 (p40 y p70). En este mismo estudio analizaron la presencia de NF- κ B p65/p50 y p50/p50 en el núcleo de las células y demostraron que la disminución de la citocina IL-12 no se correlacionó con la expresión de p65 en el núcleo (52).

III. 2. Células dendríticas

En CD murinas y de humano se ha observado que cuando son infectadas con *L. major* producen IL-12 (53), Se ha informado que las CD murinas contienen IL-12 preformada que es liberada cuando estas células son expuestas a *L. donovani* (54). En contraste con lo que sucede con los macrófagos, Aebischer T. *et al.* demostraron que las CD aumentan la expresión de MHCII y CD86 debido a la estimulación con LPG de *L. mexicana*. De manera interesante, mediante microarreglos, el mismo grupo demostró la activación de genes que codifican para citocinas proinflamatorias como IL-12, TNF α , entre otras. Por microscopía de fluorescencia se observó que en células estimuladas con *L. mexicana* hubo mayor expresión de IL-12p40 y no así en las que fueron estimuladas con una mutante del parásito que no presenta LPG (*lpg1^{-/-}*) (55).

III. 3. Los monocitos y las células dendríticas en otras infecciones causadas por patógenos intracelulares

Cuando los monocitos están infectados con *Toxoplasma gondii* se inhibe la secreción de IL-12. Butcher *et al.* demostraron que la inhibición de la secreción de IL-12 se debía a una disminución en la translocación de NF- κ B al núcleo (56). En el caso de las CD no hay una inhibición en la secreción de esta citocina (57). Por otro lado, en monocitos infectados por *Plasmodium berghei*, también está disminuida la secreción de IL-12. Xu *et al.* demostraron que la disminución en la transcripción del gen que codifica para IL-12p40 era debido a un aumento en la secreción de IL-10 y que estaba correlacionado al factor regulador de interferon 1 (IRF-1) y no a NF- κ B (58).

IV. METODOLOGÍA

IV. 1. Purificación de monocitos de sangre periférica humana

Con el fin de conocer el efecto del LPG de *L. mexicana* sobre la translocación nuclear de NF- κ B y su correlación con la producción de IL-12, lo primero que se realizó fue la purificación de monocitos y su diferenciación a CD de sangre periférica humana. Se obtuvieron paquetes celulares o “buffy coats” de donadores sanos, que fueron donados por el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS. La sangre se diluyó 1:2 con amortiguador de fosfatos salino (PBS) (0.15 M NaH₂PO₄, 0.15 M Na₂HPO₄ y 0.0205 M NaCl, pH 7.2). En un tubo cónico de 50 ml se colocaron 15 ml de Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, MO) y 30 ml de sangre diluida teniendo cuidado de no mezclarlos. La sangre/Histopaque se centrifugó a 280 xg durante 20 min a 20°C y se separó la interfase, que es la región rica en células mononucleares y plaquetas. La interfase se centrifugó a 200 xg durante 10 min a 4°C. Para eliminar eritrocitos contaminantes, el paquete celular se resuspendió en solución lítica (0.3 M NH₄Cl, 0.1 M NaHCO₃, 0.5mM EDTA) durante 10 min en hielo y se centrifugó a 200 xg durante 10 min a 4°C. Posteriormente, se formó un gradiente de células/plasma para eliminar las plaquetas y se centrifugó la suspensión celular a 120 xg durante 10 minutos a 4°C.

Para obtener monocitos a partir de la interfase de células mononucleares se utilizó un anticuerpo dirigido contra CD14 que es una molécula expresada abundantemente en monocitos. Se cuantificaron las células obtenidas de la

interfase y se resuspendieron en PBS adicionado con 0.5% ASB, 2 mM EDTA y 5% de suero fetal bovino (SFB) (PBS-MACS) en una relación de 10^7 células/ml y se centrifugaron a 200 xg durante 10 min a 4°C. Posteriormente se agregaron 80 μ l de PBS-MACS por cada 10^7 células y 20 μ l de perlas anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y se incubaron durante 15 min a 4°C. Después de este tiempo se centrifugaron a 200 xg a 4°C durante 10 min y se resuspendieron en 1 ml de PBS-MACS/ 10^7 células y esto se repitió dos veces más. Las células se resuspendieron en 500 μ l de PBS-MACS y se colocaron en una columna LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) que se acopló en la unidad de separación magnética Super MACS II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). La columna LS se preparó previamente adicionando 3 ml de PBS-MACS y posteriormente se agregó la suspensión celular. Se colectaron las células no marcadas (CD14⁻) lavando la columna 3 veces con 3 ml cada vez con PBS-MACS. La columna se retiró del magneto y se le agregaron 5 ml de PBS-MACS para obtener la fracción rica en células CD14⁺. Esta fracción se pasó nuevamente por una columna LS, siguiendo los pasos ya descritos, con el fin de obtener monocitos CD14⁺ con un alto grado de pureza.

IV. 2. Cultivo de células dendríticas humanas

Una vez realizada la purificación de células CD14⁺, éstas se dejaron reposar por 12 h en tubos de teflón (Daigger) a 37°C con 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Grand Island, NY) adicionado con SFB (Gibco Invitrogen Grand Island, NY) al 10% (R-10). Después de 12 h los monocitos se

incubaron en cajas de 6 pozos (Corning Inc. Corning, NY) con 5 ml/pozo a una concentración de 1×10^6 células/ml con R-10 adicionado con 1000 U/ml de GM-CSF (BD Pharmingen, San Diego, CA) y 500 U/ml de IL-4 (BD Pharmingen, San Diego, CA) a 37°C con 5% de CO₂. Los cambios de medio se realizaron cada 3 días. Las células se incubaron durante 6 ó 7 días.

IV. 3. Citometría de flujo

La caracterización de marcadores de membrana de monocitos y CD se realizó por citometría de flujo. Las células se fijaron con paraformaldehído (Sigma, St. Louis, MO) al 2% en PBS a temperatura ambiente durante 20 min y se lavaron 2 veces con PBS y SFB al 5%. Para el marcaje celular se utilizaron los siguientes anticuerpos: PE-CD14 (clona M5E2), FITC-CD1a (clona HI149), FITC-CD80 (clona L307.4), FITC-CD86 (clona 2331 (FUN-1)), todos obtenidos de BD Pharmingen, San Diego, CA. Se agregaron 2 µl de anticuerpo por cada 1×10^6 células y se incubaron durante 20 minutos. El análisis de las muestras se realizó por citometría de flujo (FACSCAN, Becton Dickinson), con base en el programa Cell Quest (versión 1.0) de Becton Dickinson. El análisis de los datos se hizo en el programa WinMDI (versión 2.8). Se realizaron histogramas de la intensidad de fluorescencia de las células marcadas.

IV. 4. Cuantificación de citocinas por ELISA

El efecto del LPG de *L. mexicana* sobre la producción de citocinas en CD y monocitos se determinó por el método de ELISA en los sobrenadantes de cultivo.

Las células se estimularon con LPS (50 ng/ml) y LPG (*L. mexicana* 10 µg/ml) durante 18 h a 37°C y CO₂ 5%. Posteriormente se recolectaron los sobrenadantes y se realizó la prueba de ELISA para las citocinas IL-12 p40, IL-10 y TNF α . Todos los anticuerpos y las citocinas recombinantes se obtuvieron de BD Pharmingen San Diego, CA.

En una placa de 96 pozos (Costar-Corning Corning, NY) se colocaron 50 µl del anticuerpo de captura. Los anticuerpos utilizados fueron TNF α (clona MAb1), IL-12p40 (clona C8.3) e IL-10 (clona JES3-9D7). La placa se incubó a 4°C durante 12 h. Posteriormente se lavó cuatro veces con PBS y Tween-80 0.01% (Sigma San Louis, MO) en un lavador para ELISA (Bio-Tek Instruments, Vermont). La placa se bloqueó con 100 µl/pozo de la solución bloqueadora (PBS, 5% caseína, 1N NaOH) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con PBS/Tween-80 y se agregaron 100 µl de los sobrenadantes de las células estimuladas y de la citocina recombinante en concentraciones conocidas para la curva patrón. La placa se incubó 2 h a temperatura ambiente y se lavó cuatro veces con PBS/Tween-80. Posteriormente se colocaron 100 µl del anticuerpo de detección marcado con biotina. Las clonas de los anticuerpos utilizadas para la detección de las diferentes citocinas fueron las siguientes: TNF α (clona MAb11), IL-12p40 (clona C8.6) e IL-10 (clona JES3-12G8). La placa se incubó 1 h a temperatura ambiente y se lavó cuatro veces con PBS/Tween-80. La presencia de los anticuerpos biotinilados se detectó por la adición de estreptavidina-fosfatasa alcalina (1:200 Sigma, St. Louis, MO) por 30 min. La placa se lavó seis veces con PBS/Tween-80 y se agregaron 100 µl de paranitrofenil

fosfato (Sigma, St. Louis, MO). Las muestras se leyeron a 405 nm cada 5 min por un periodo de 30 min en un espectrofotómetro (Bio-Tek Instruments, Vermont). Las concentraciones de las muestras se reportaron en pg/ml por interpolación de los datos de las muestras problema en la recta obtenida con la curva patrón.

IV. 5. Obtención de núcleos celulares

Se purificaron las fracciones nucleares utilizando 3×10^6 células las cuales se estimularon con LPS (50 ng/ml) y LPG de *L. mexicana* (10 μ g/ml) durante 30 min a 37°C y CO₂ 5%. Posteriormente, las células se centrifugaron a 9000 xg por 10 s, se congelaron a 0°C durante 5 min y se resuspendieron en 400 μ l de amortiguador hipotónico (10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF) a 4°C. Se agitaron las células por 10 s y se centrifugaron por 10 s a 9000 xg y el sobrenadante se desechó. El botón de núcleos se resuspendió en 40 μ l de amortiguador hipertónico (20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF) a 4°C durante 40 min con agitación constante a 4°C. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 13500 xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante, que contiene las proteínas unidas al ADN, se almacenó a -70°C.

IV. 6. Cuantificación de proteínas

Se utilizó el kit RC DC (Bio-Rad) que es una modificación del método de Lowry (59). Este método detecta proteínas tratadas con solución alcalina de cobre en presencia del reactivo de Folín. La reacción colorimétrica se leyó en un

espectrofotómetro (Bio-Tek Instruments, Vermont, USA) a 650 nm y los resultados se expresaron en μg proteína/ml.

IV. 7. Inmunoanálisis tipo “Western Blot”

Se realizó un “western blot” para identificar las isoformas de NF- κ B p65 y c-Rel en los núcleos celulares. Para p65 se utilizó el anticuerpo primario monoclonal de ratón-anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, clona F-6) y para c-Rel se utilizó el anticuerpo primario monoclonal de ratón-anti-c-Rel (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, clona B-6).

Las proteínas nucleares (6 μg), se desnaturalizaron con amortiguador de carga 1x a 96°C durante 5 min y se colocaron en un gel de acrilamida al 10% en una cámara de electroforesis con amortiguador de corrida 1x (25 mM Tris, 190 mM Glicina y 0.1% SDS). Las muestras se corrieron a 120 V durante 60 min. Posteriormente, el gel se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore, Bedford, MA) durante 1 h a 20 V con amortiguador de transferencia 1x (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanol) en cámara de transferencia semi-seca. La membrana fue bloqueada con ASB al 3% y 0.5% de albúmina de cabra durante 1 h. Después se incubó con un anticuerpo primario (1:500 para ambos anticuerpos) diluido en TTBS 1x (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) y 1% ASB durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana se lavó con TTBS 1X cada 10 min durante 1 h. Se agregó anticuerpo secundario HRP-anti-ratón (Dako, Denmark) diluido en 1x TTBS y 1% ASB y se incubó durante 1 h. La membrana se lavó con 1x TTBS cada 10 min durante 1 h. La membrana se incubó con los reactivos del

kit (Bio-Rad) para quimioluminiscencia durante 10 min. La membrana se expuso a una película fotográfica (Kodak) durante 5 min y se reveló.

IV. 8. Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)

La presencia de NF- κ B en el núcleo de las CD y monocitos estimulados con LPG y LPS se determinó mediante un ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA). Las muestras de proteína nuclear se incubaron con el oligonucleótido (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') marcado con ^{32}P en un extremo 5' y se resolvieron en un gel de acrilamida al 5%. El gel se secó y se expuso a una pantalla sensible a ^{32}P , la cual se analizó en un escáner Typhoon 9200 (Amersham Biosciences Buckinghamshire, England), obteniendo una imagen digital correspondiente a la marca del ADN retardado por las proteínas.

La mezcla de reacción para las proteínas nucleares se preparó en una solución (amortiguador 1) de 2 μl de buffer HDKE (20 mM HEPES, pH 7.9, 50 mM KCl, 5% glicerol (v/v), 1 mM EDTA, 5 mM DTT), 1 μl de BSA (10 mg/ml), 1 μl de DTT y 1 μl de poly(dI-dC) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). Se preparó la mezcla con la proteína nuclear (10 μg) del experimento a 4°C. Se agregaron 5 μl de amortiguador 1, aforando hasta 20 μl con H₂O. Para el control de especificidad, se utilizaron 3 μl del oligonucleótido no marcado para NF- κ B. A la mezcla del amortiguador 1 con proteína nuclear se le adicionó 1 μl del oligonucleótido marcado con ^{32}P para NF- κ B y se incubó la mezcla durante 20 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 6 μl de amortiguador de carga

(0.25% de azul de bromofenol (2.5 mg/ml), 0.25% de xileno (2.5 mg/ml) y 15% de ficoll).

El marcaje del oligonucleótido para NF- κ B se realizó utilizando 100 a 250 ng del oligonucleótido más 7 μ l de H₂O, 1 μ l de solución de incubación T4 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT), 0.5 μ l de ³²P γ -ATP (ICN, Biomedicals) y 0.5 μ l de cinasa T4 (Q-biogene). Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 min inactivando la reacción a 65°C durante 15 min. Finalmente se agregaron 30 μ l de TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico y 2 mM EDTA).

Las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 5% en 1X TBE. El gel se precorrió durante 1 h a 200 V. Las muestras se cargaron entonces y el gel se corrió durante 2 h a 200 V. El gel se retiró de los vidrios, se transfirió a papel filtro (Whatman) y se cubrió con papel celofán húmedo. Se montó en un secador de geles Bio-Rad (Gel dryer system) durante 2 h a 80°C. Después del secado, el gel se expuso en una pantalla sensible a ³²P (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) y se analizó en un escáner Typhoon 9200 (Amersham Biosciences Buckinghamshire, England).

IV. 9. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de las citocinas secretadas por CD y monocitos estimulados con LPG se analizaron por la prueba t-student.

V. RESULTADOS

V. 1. Células

Se purificaron monocitos de sangre periférica humana por gradiente de densidad utilizando Histopaque y separación positiva magnética con perlas anti-CD14 humano. La población obtenida se caracterizó por citometría de flujo. En general el rendimiento fue de 1×10^6 células a partir de 1×10^8 de células mononucleares con una pureza del 80-85% (figura 7). En la figura 8 se muestra el histograma de intensidad de fluorescencia.

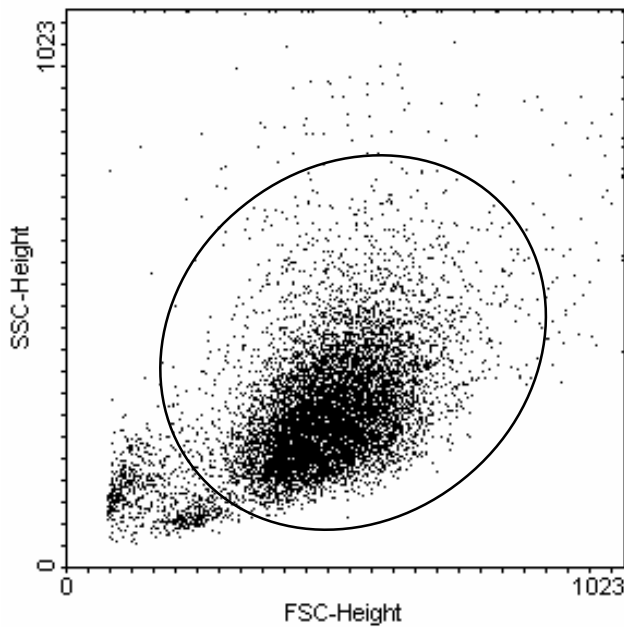


Figura 7. Población total de monocitos purificados de sangre periférica humana, analizados por citometría de flujo. La gráfica muestra un experimento representativo (n=5).

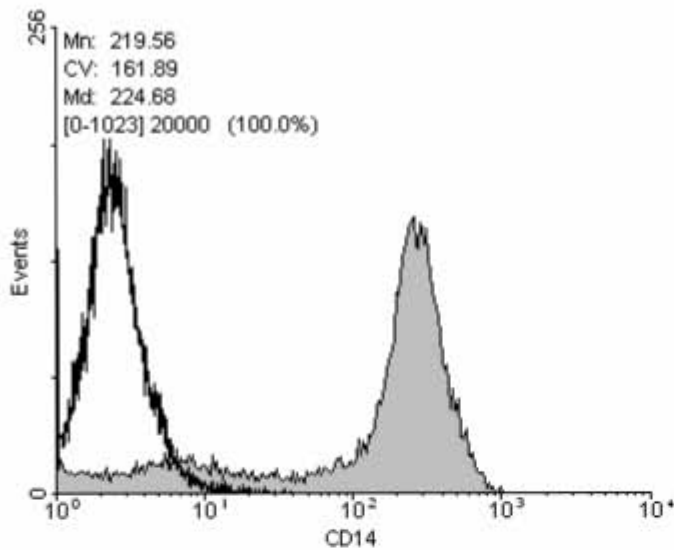


Figura 8. Histograma de citometría de flujo que muestra la expresión de CD14 en los monocitos purificados de sangre periférica humana. Los monocitos obtenidos de la purificación por columna magnética se marcaron con un anticuerpo anti-CD14 humano-FITC y se analizaron por citometría de flujo. Se muestra la expresión de CD14 (área gris) en relación al control de isotipo (área blanca).

V. 1. 1. Diferenciación de monocitos a células dendríticas

Las CD se diferenciaron a partir monocitos por la incubación con las citocinas GM-CSF e IL-4 durante siete días y se caracterizaron por citometría de flujo utilizando anticuerpos dirigidos contra marcadores que se expresan en esta población celular tales como CD1a, CD80, CD86. El rendimiento de CD obtenido a partir de 1×10^7 de monocitos fue de 6×10^6 con una pureza del 80% (figura 9).

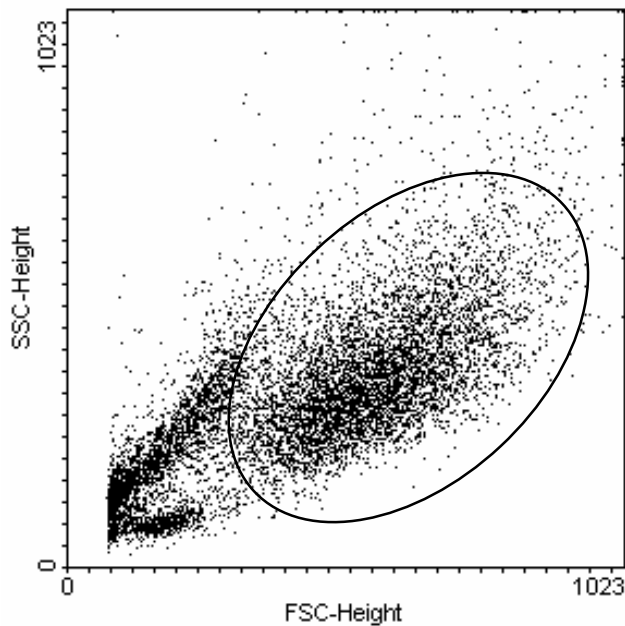


Figura 9. Población total de células dendríticas (CD) derivadas de monocitos, analizados por citometría de flujo. La gráfica muestra un experimento representativo (n=5).

Durante el proceso de diferenciación de las CD a partir de los monocitos se analizó la presencia de los marcadores CD14, CD1a, CD80 y CD86 en los días 3 y 7 de cultivo. Se observó que en el día 3 de cultivo CD14 está presente con una mediana de fluorescencia (Md) de 50 y en el séptimo día la expresión de este marcador disminuye notablemente con una Md de 1.7 (figura 10). Esto indica que las células a los 7 días de cultivo disminuyen considerablemente la expresión del marcador de monocitos CD14.

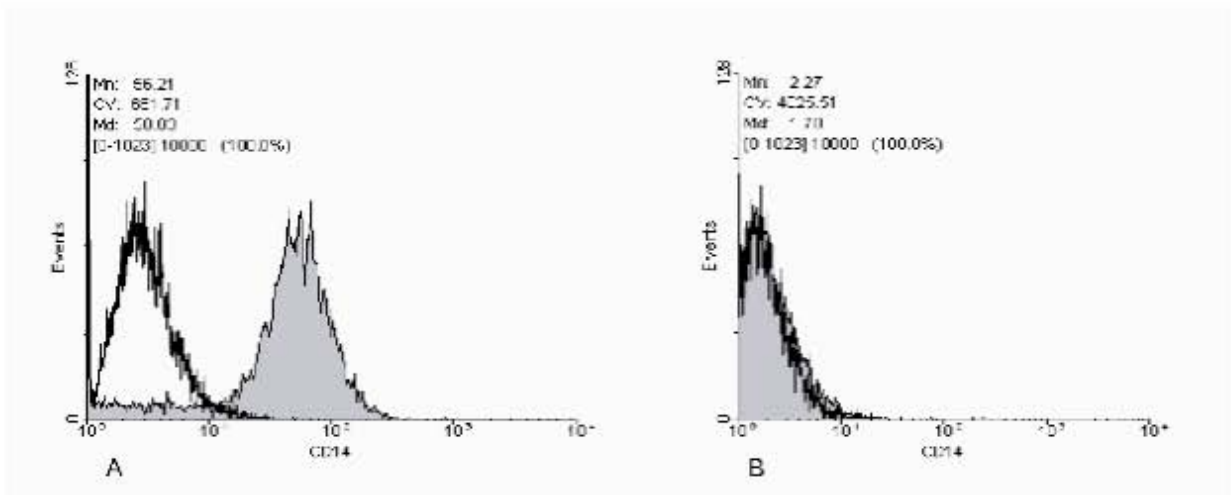


Figura 10. Expresión de CD14 en monocitos (A) y células dendríticas (CD) (B) estimuladas con GM-CSF e IL-4 durante 3 días y 7 días respectivamente. El área blanca y el área gris corresponden al control de isotipo y a CD14 respectivamente.

Por otro lado, se observó que el marcador CD1a que se expresa de manera importante en CD no se encuentra en el día 3 de cultivo en el cual no se ha dado la total diferenciación de las células. En el tercer día los monocitos presentaron una Md de fluorescencia de 3 y en el séptimo día las CD mostraron una Md de 9 (figura 11).

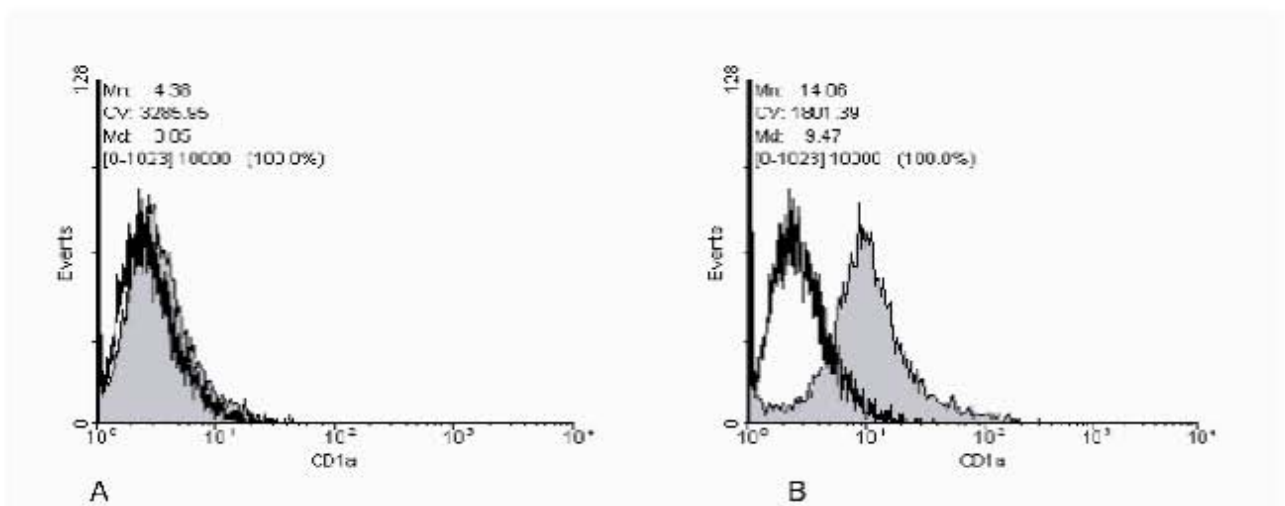


Figura 11. Expresión de CD1a en monocitos (A) y células dendríticas (CD) (B) estimulados con GM-CSF e IL-4 durante 3 y 7 días respectivamente. El área blanca y el área gris corresponden al control de isotipo y a CD1a respectivamente.

La molécula coestimuladora CD80 es expresada en mayor grado en CD. Se observó que las células al tercer día presentaron una Md de fluorescencia de 2 y en el séptimo día las CD presentaron un aumento en la mediana de 8 (figura 12).

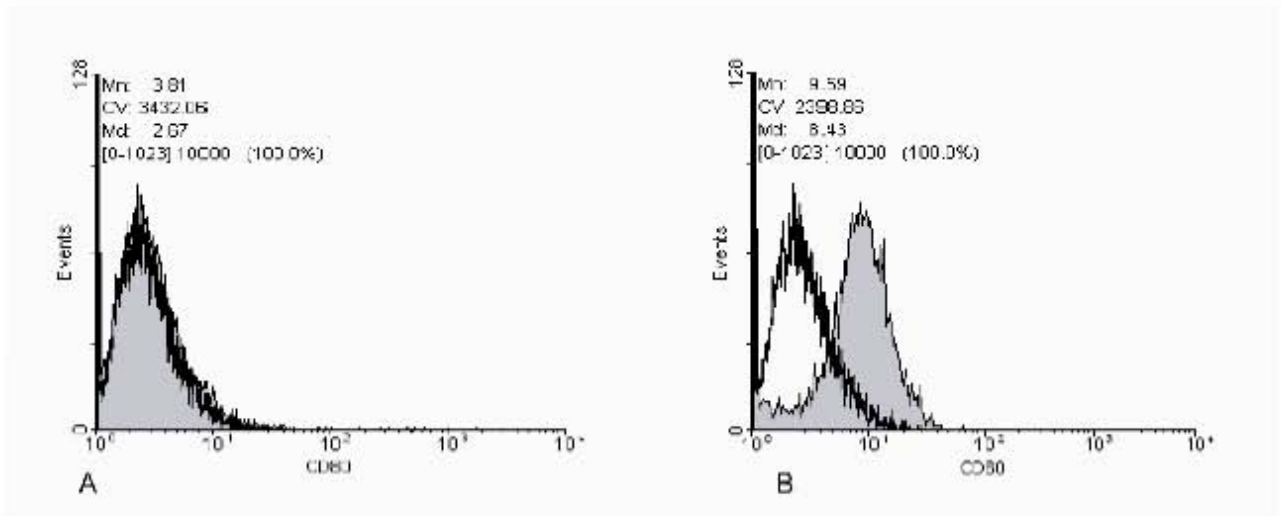


Figura 12. Expresión de CD80 (B7.1) en monocitos (A) y células dendríticas (CD) (B) estimulados con GM-CSF e IL-4 durante 3 y 7 días respectivamente. El área blanca y el área gris corresponden al control de isotipo y a CD80 respectivamente.

La molécula coestimuladora CD86 es expresada en mayor grado en CD. Se observó que en las células al tercer día presentaron una Md de fluorescencia de 5 y en el séptimo día se observó el doble de aumento en la mediana de fluorescencia (figura 13). El aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras indica que las células a los 7 días de cultivo presentan marcadores típicos de CD.

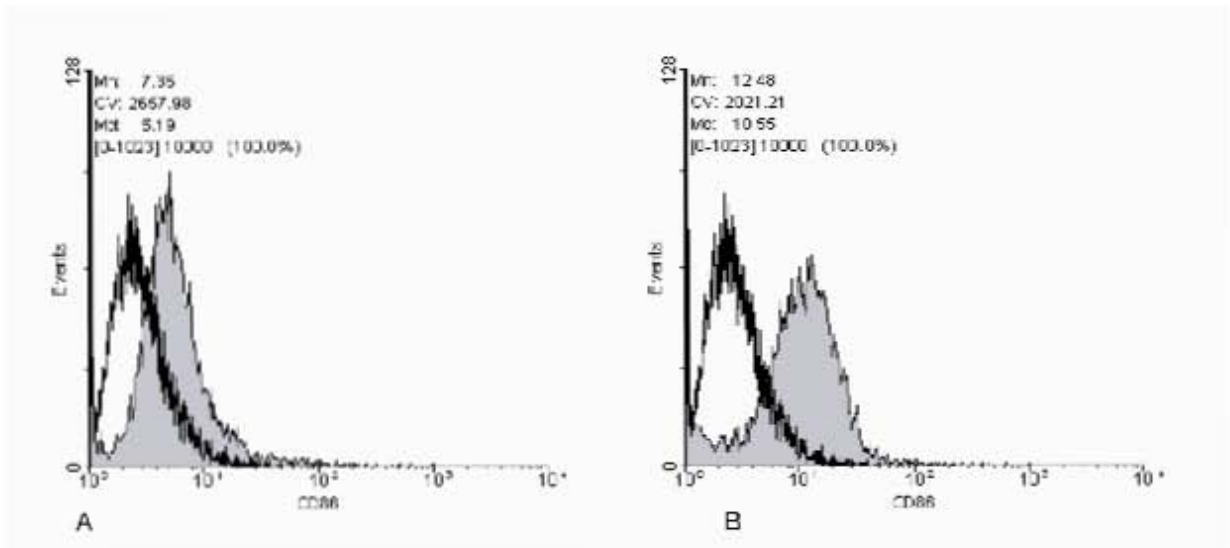


Figura 13. Expresión de CD86 (B7.2) en monocitos (A) y células dendríticas (CD) (B) estimuladas con GM-CSF e IL-4 durante 3 y 7 días respectivamente. El área blanca y el área gris corresponden al control de isotipo y a CD86 respectivamente.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se decidió utilizar las CD de 7 días de cultivo en los experimentos posteriores.

V. 2. Cuantificación de citocinas por ELISA

Con el objeto de analizar el efecto del LPG de *L. mexicana* sobre la producción de citocinas por CD y monocitos humanos se cuantificaron las citocinas proinflamatorias TNF α e IL-12p40 y la citocina reguladora IL-10. Las células se estimularon con 10 μ g/ml de LPG y 50 ng/ml de LPS durante 18 h. En la figura 14 se muestra la secreción de TNF α en monocitos estimulados con LPG en donde se obtuvo una concentración de 140 pg/ml mientras que en los monocitos estimulados con LPS se obtuvo una concentración de 1460 pg/ml. De manera similar las CD cuando fueron estimuladas con LPG secretaron 151 pg/ml y cuando fueron estimuladas con LPS secretaron 1672 pg/ml (figura 14). La secreción de esta citocina no es significativamente diferente en ambos tipos celulares ($p < 0.05$).

El estímulo con LPG indujo una mínima secreción de $\text{TNF}\alpha$ en ambos grupos celulares, lo cual indica que el parásito no está estimulando la vía de producción de $\text{TNF}\alpha$. Sin embargo, las células respondieron al estímulo con LPS mediante una elevada secreción de la citocina en cantidades similares para ambos tipos celulares.

$\text{TNF}\alpha$ liberado por Mo y CD humanas

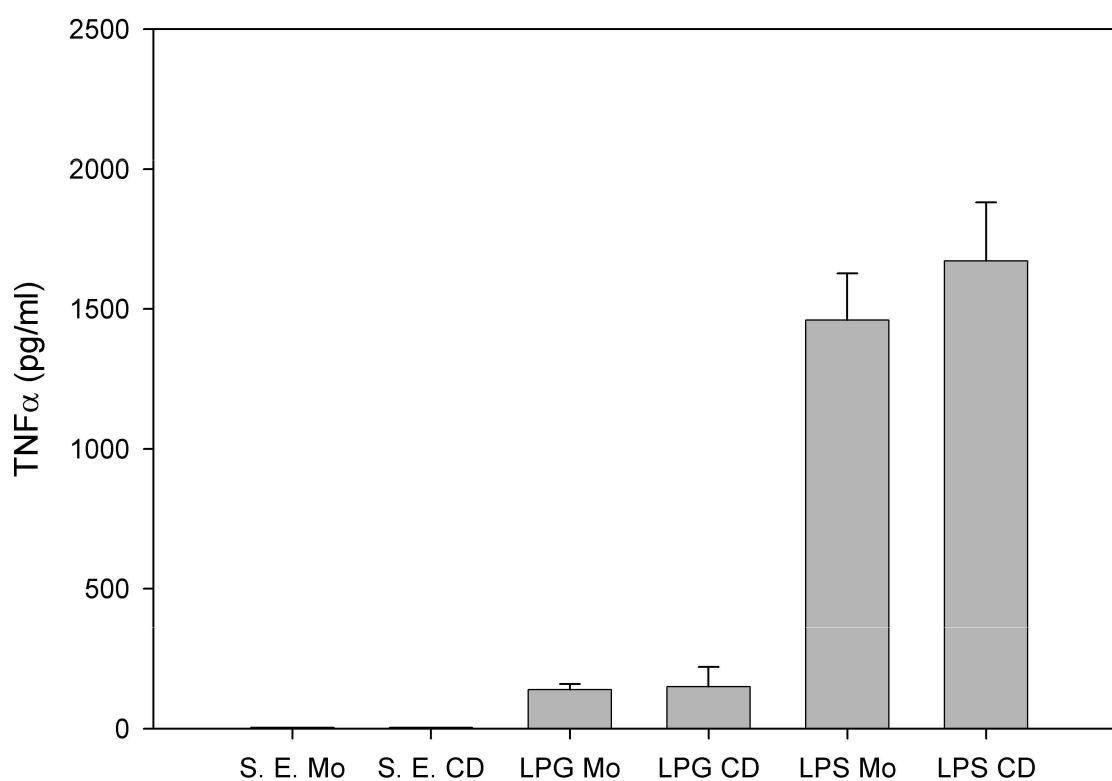


Figura 14. Efecto del LPG en la secreción de $\text{TNF}\alpha$ en monocitos (Mo) y células dendríticas (CD). La gráfica muestra el promedio de 4 experimentos independientes. S. E. (sin estímulo), LPG (lipofosfoglicano) y LPS (lipopolisacárido).

En la figura 15 se muestra la secreción de IL-12p40 en monocitos estimulados con LPG donde se observó una producción de 468 pg/ml y con LPS de 1601 pg/ml. Cuando las CD fueron estimuladas con LPG se obtuvo una

concentración de 1105 pg/ml y en las estimuladas con LPS se obtuvieron 11385 pg/ml (figura 15). Se observó que las CD secretaron 2.4 veces más IL-12p40 con respecto a los monocitos, lo que fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

IL-12p40 liberada por Mo y CD humanas

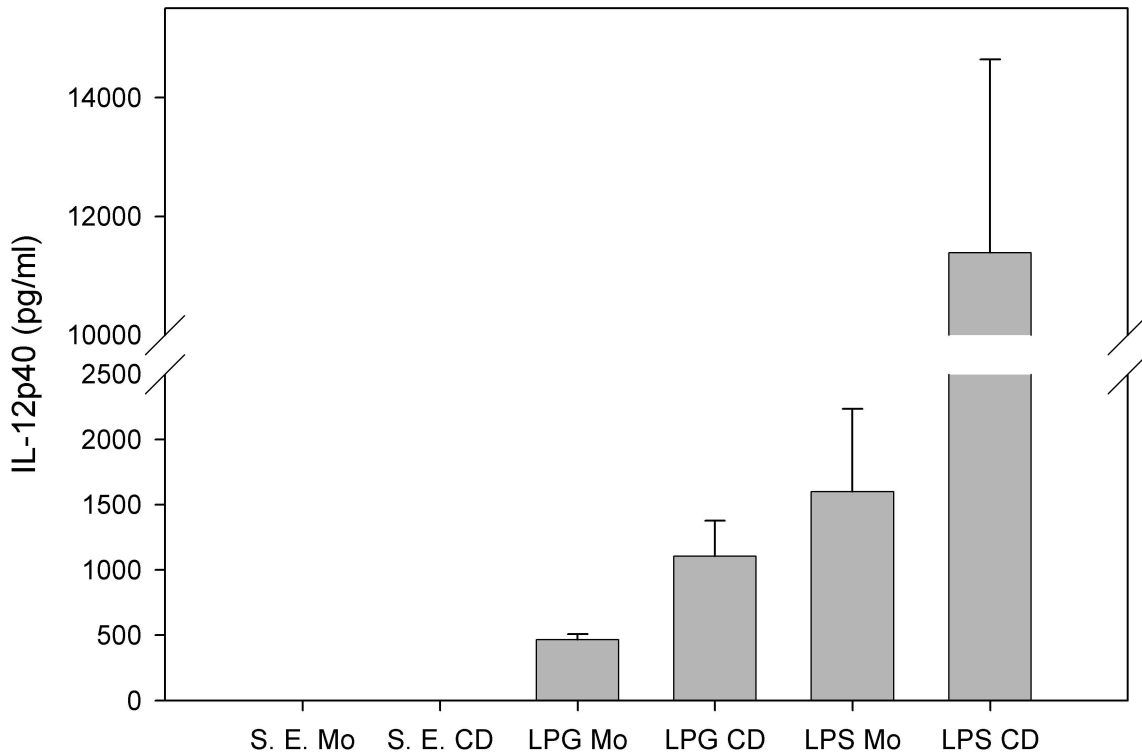


Figura 15 Efecto del LPG en la secreción de IL-12p40 en monocitos (Mo) y células dendríticas (CD). La gráfica muestra el promedio de 4 experimentos independientes. S. E. (sin estímulo), LPG (lipofosfoglicano) y LPS (lipopolisacárido).

Los resultados de la secreción de IL-10 en monocitos se muestran en la figura 16. Se obtuvo una concentración de 288 pg/ml para los monocitos estimulados con LPG y para los que fueron estimulados con LPS se obtuvo una concentración de 1713 pg/ml. En CD se obtuvo una concentración de 132 pg/ml en las células estimuladas con LPG y una concentración de 585 pg/ml en las células estimuladas con LPS (figura 16). Se observó que los monocitos secretaron

el doble de IL-10 con respecto a las CD, siendo esto estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

IL-10 liberada por Mo y CD humanas

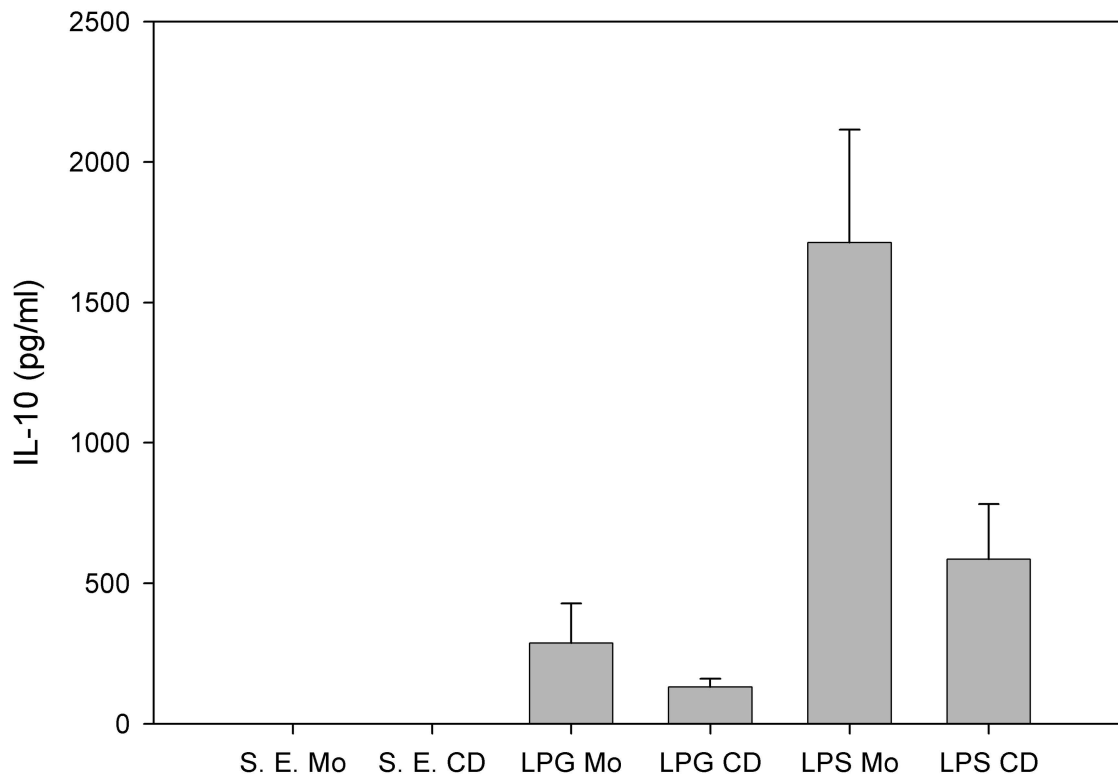


Figura 16. Efecto del LPG en la secreción de IL-10 en monocitos (Mo) y células dendríticas (CD). La gráfica muestra el promedio de 4 experimentos independientes. S. E. (sin estímulo), LPG (lipofosfoglicano) y LPS (lipopolisacárido).

V. 3. “Western blot”

Se realizó la técnica de “western blot” para detectar la presencia de NF- κ B p65 (figura 17) y NF- κ B c-Rel (figura 18) en el núcleo. En las células estimuladas con LPG, las proteínas no fueron detectadas en los núcleos de los monocitos, mientras que en las CD no se encontraron diferencias entre las células sin estímulo y las células estimuladas con LPS (control positivo).

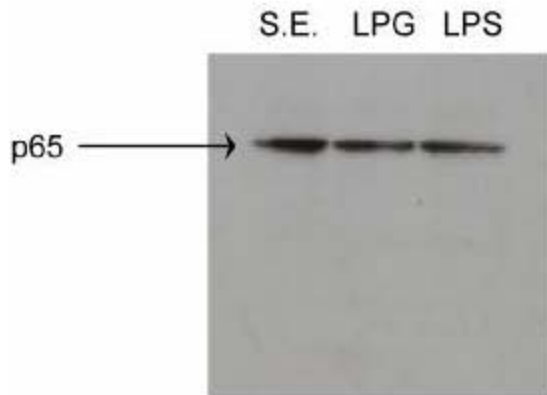


Figura 17. Western blot de p65 de las muestras nucleares de células dendríticas, se muestran 3 condiciones, sin estímulo (S. E.), LPG y LPS.

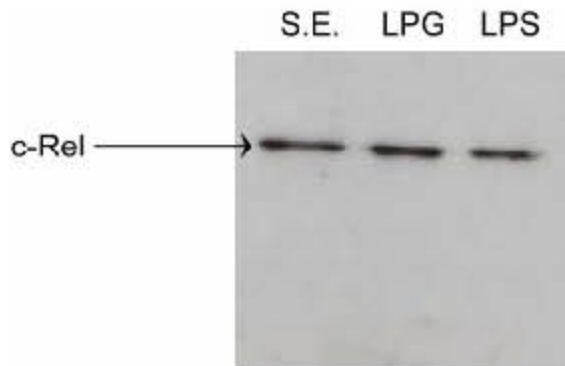


Figura 18. Western blot de c-Rel de las muestras nucleares de células dendríticas, se muestran 3 condiciones, sin estímulo (S. E.), LPG y LPS.

V .4. EMSA

Se purificaron los núcleos de monocitos y CD estimulados por 30 min con LPG y LPS (control positivo). La proteína obtenida se utilizó para realizar el ensayo de retardo de movilidad electroforética para NF- κ B. En la densitometría se muestra que la expresión de NF- κ B en monocitos estimulados aumenta 50% con respecto a su basal (figura 19A y B). En las CD se observó que cuando fueron estimuladas con LPG hubo un aumento del 100% en la translocación de NF- κ B

con respecto al basal (figura 20A y B). Se observó que existe 50% más translocación de NF- κ B en CD que en monocitos cuando son estimulados con LPG.

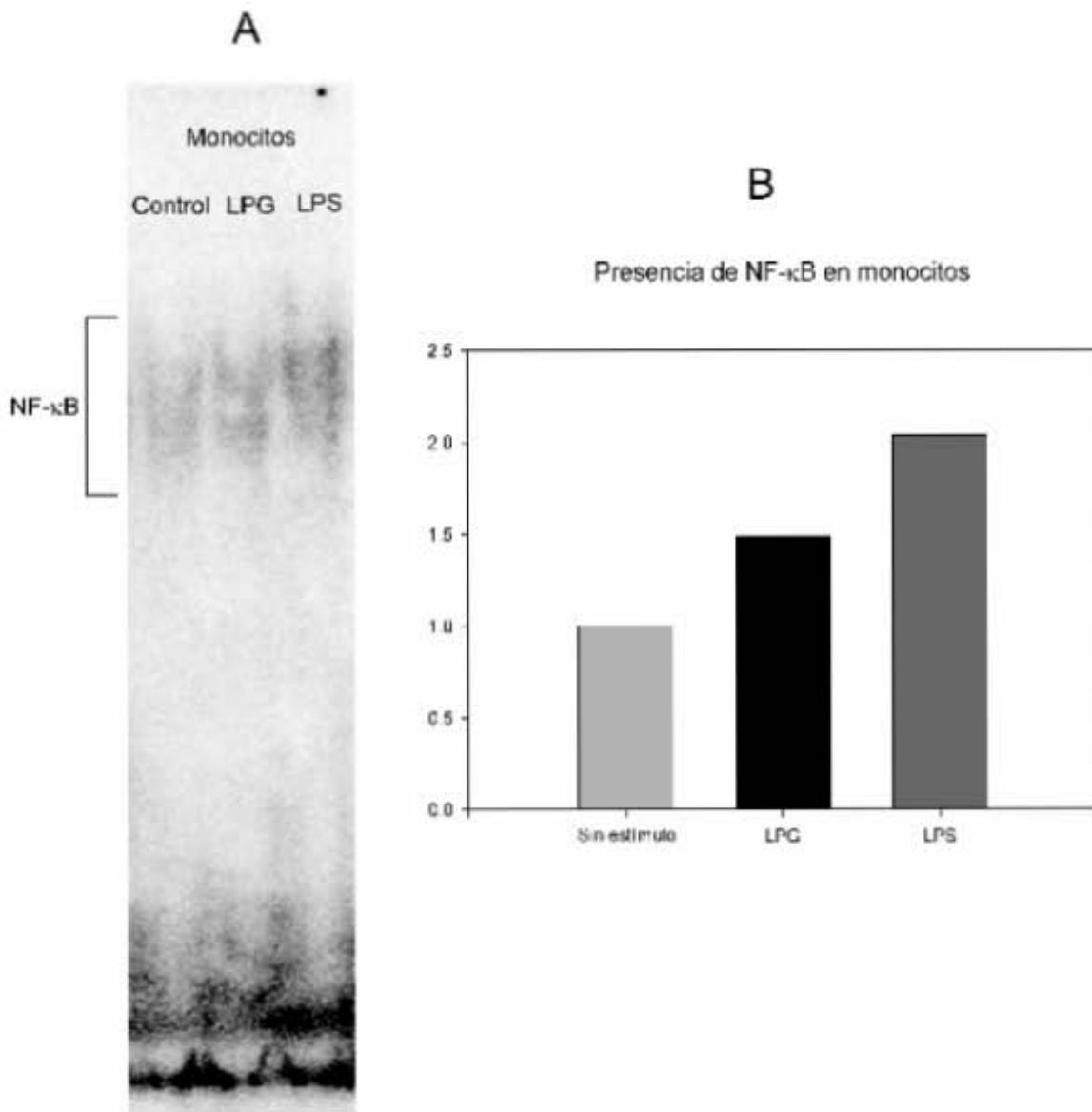


Figura 19. A). Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA). Se estimularon los monocitos durante 30 min con 10 μ g/ml de LPG y 50 ng/ml de LPS. Se muestra la autorradiografía de la proteína nuclear NF- κ B en monocitos unida a una región de ADN (marcado con 32 P) específica para NF- κ B. B). Densitometría de las bandas de NF- κ B.

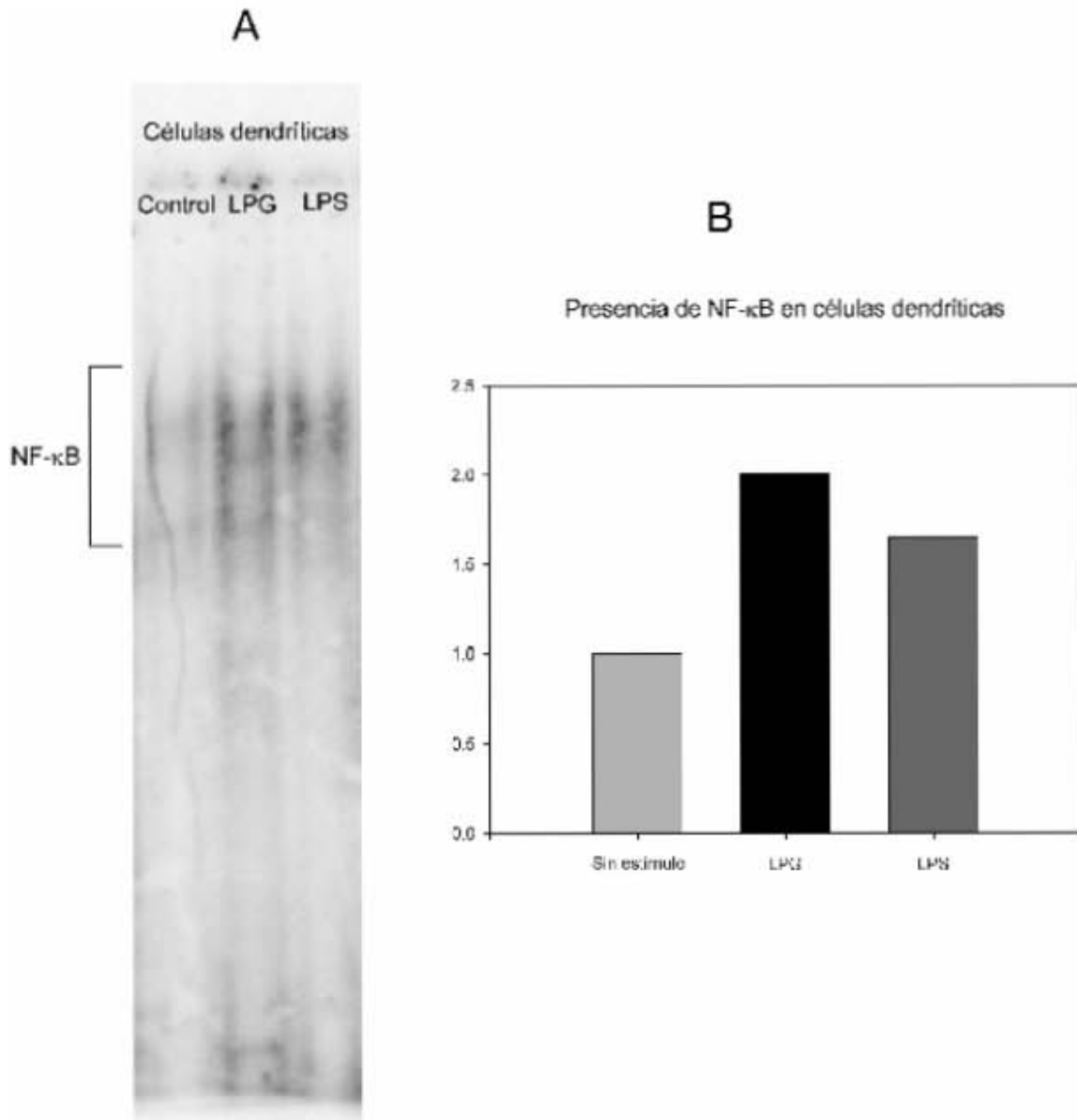


Figura 20. A). Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA). Se estimularon las células dendríticas (CD) durante 30 min con 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPG y 50 ng/ml de LPS. Autorradiografía de la proteína nuclear NF- κB en CD unida a una región de ADN (marcado con ^{32}P) específica para NF- κB . B). Densitometría de las bandas de NF- κB .

VI. DISCUSIÓN

Leishmania es un parásito intracelular que infecta monocitos/macrófagos y CD. Estos dos tipos celulares tienen una participación muy importante en la respuesta inmune. Son células capaces de reconocer y fagocitar organismos patogénicos en la respuesta inmune innata y de presentarlos en la respuesta inmune adaptativa. Aunque presentan similitudes funcionales, la interacción de estas células con *Leishmania* presenta diferencias. Una de estas diferencias radica en las citocinas que se producen posteriormente a la interacción del parásito con las células. Se sabe que *Leishmania* inhibe la producción de IL-12 en macrófagos (50) (51) pero no en CD (60) (61), por otro lado, estimula la producción de IL-10 en macrófagos. Se piensa que esta producción diferencial de citocinas ejercida por *Leishmania* juega un papel importante en el desenvolvimiento de la enfermedad, ya que el desarrollo de un tipo de respuesta celular Th1 o Th2 depende, entre otros factores, del ambiente de citocinas. No se conocen los mecanismos moleculares involucrados en la modulación diferencial ejercida por *Leishmania* sobre CD y macrófagos. (56) (62).

En este trabajo investigamos si la diferencia en la producción de IL-12 entre monocitos y CD humanas posteriormente a la interacción con LPG de *L. mexicana* correlaciona con una diferente translocación al núcleo de NF- κ B. Para esto se obtuvieron monocitos humanos con una pureza del 85% (figura 7). La pureza de esta población celular se determinó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo dirigido contra el receptor para LPS (CD14), ya que este receptor se expresa

abundantemente en esta población celular y no así otras células mononucleares que se obtienen de la separación por Histopaque (figura 8).

Las CD se diferenciaron a partir de los monocitos humanos por la incubación por siete días con las citocinas GM-CSF e IL-4 de acuerdo al método descrito por Sallusto y Lanzavecchia (21). Las CD se caracterizaron por citometría de flujo analizando diferentes moléculas que se presentan en esta población celular. Esta técnica permite analizar de manera rápida y eficiente diversas poblaciones celulares. La diferenciación de los monocitos a CD se analizó en dos periodos de cultivo (tres y siete días) ya que Obermaier *et al.* reportaron la obtención de CD en máximo 72 horas (63), mientras que Sallusto y Lanzavecchia (22) obtuvieron CD a los siete días de cultivo. Para demostrar el desarrollo de monocitos a CD se analizaron por citometría de flujo algunos marcadores que presentan estas células (tabla 1). Se observó que las células a los tres días de cultivo expresaron abundantemente CD14 (figura 10) mientras que a los siete días de cultivo la expresión de CD14 disminuyó en un 70% (figura 10), lo cual indica que en este tiempo de cultivo los monocitos se han diferenciado a CD por la disminución del marcador CD14. Sallusto y Lanzavecchia (22) observaron a los siete días la presencia de CD1a, que es un marcador de las CD. Nosotros observamos que a los tres días las células no presentaron CD1a, sin embargo, a los siete días hubo un aumento del 67% en la expresión de esta molécula. Adicionalmente se analizó la expresión de dos moléculas coestimuladoras, CD80 y CD86. Las células a los de tres días de cultivo presentaron baja cantidad de CD86 y no presentaron CD80 a diferencia de las células de siete días en las que se observó un aumento la presencia de estas moléculas coestimuladoras. Debido a

los resultados anteriores se decidió trabajar con las CD de siete días en cultivo, ya que estas células presentan baja expresión de CD14 y elevada expresión de CD1a, CD80 y CD86.

Una vez purificadas y caracterizadas las CD, se analizó el efecto del LPG de *L. mexicana* sobre la producción de las citocinas proinflamatorias IL-12 p40, TNF α y la citocina reguladora IL-10. Se utilizó LPS como control positivo. Se observó que no existe diferencia en la secreción de TNF α en ambos tipos celulares al estimularlos con LPG de *L. mexicana* (figura 14). Otra de las citocinas analizadas fue la IL-12 que es muy importante porque es capaz de activar linfocitos T vírgenes y favorecer una respuesta tipo Th1. En el modelo murino de la leishmaniasis, (en el que se ha demostrado que los ratones C57BL/6 son resistentes a la infección por *L. major* y los ratones Balb/c son susceptibles (9)) se sabe que la respuesta dada por la IL-12 favorece la resistencia a esta enfermedad. Nuestros resultados muestran que la secreción de IL-12p40 por CD fue del doble respecto a la secretada por los monocitos (figura 15). Esto es relevante ya que una adecuada secreción de IL-12 favorece la secreción de IFN γ por células NK que es importante para la activación de macrófagos. Nuestros datos concuerdan con lo reportado por Bennett, *et al.* quienes demostraron que CD derivadas de médula ósea de ratón estimuladas con promastigotes de *L. mexicana* secretan IL-12p40 (61) Recientemente Aebischer *et al.* reportaron que la línea celular de CD inmaduras (D1) y CD derivadas de médula ósea de ratón estimuladas con *L. mexicana* aumentan la producción de IL-12p40 y la activación de distintos genes que codifican moléculas proinflamatorias, entre ellos los que codifican para IL-

12p40. Asimismo, demostraron que los parásitos que no presentan LPG (*lpg1^{-/-}*) no activan a las células. Estos experimentos demuestran la importancia de la molécula de LPG en la activación de las CD (55).

Cuantificamos también la secreción de IL-10, ya que esta citocina regula la secreción de IL-12 además de que existen evidencias de que en otras infecciones por parásitos como la malaria provocada por *Plasmodium berghei*, se presenta una disminución en la secreción de IL-12 debido a la secreción de IL-10 (58). Encontramos que la producción de IL-10 por los monocitos humanos estimulados con LPG de *L. mexicana* fue mayor que la secretada por CD (monocitos 288 pg/ml y CD 132 pg/ml, figura 16).

Existe evidencia de que en enfermedades como la toxoplasmosis, la inhibición en la secreción de IL-12 está dada por la baja o nula translocación de NF- κ B al núcleo, mientras que en la leishmaniasis se observó que en ratones la nula producción de IL-12 está a nivel de transcripción y no es debido a una falta de reconocimiento del antígeno por parte de las células. Partiendo de estos resultados, se realizaron ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA) para analizar la translocación de NF- κ B al núcleo y observamos que en monocitos estimulados con LPG hay translocación de NF- κ B. En CD se observó que de manera muy interesante la presencia de NF- κ B en el núcleo fue mayor con LPG que con LPS, esto puede estar dado por que posiblemente esta célula esté respondiendo por otra vía que activa NF- κ B que no es la misma a la activada por el LPS (control positivo). Si comparamos la presencia de NF- κ B en el núcleo en los monocitos con CD, la translocación es 50% mayor, lo que favorece la mayor

producción de IL-12 en CD que en monocitos cuando son expuestos al LPG. Nuestros resultados concuerdan con Piedrafita *et al.* quienes demostraron que la estimulación de macrófagos de ratón con fosfoglicano sintético no causó una disminución en la translocación de NF- κ B (p65/p50 y p50/p50) (52). Por otro lado, Cameron *et al.* demostraron que la inhibición en la secreción de IL-12 está dada, en parte, por la baja translocación de NF- κ B al núcleo (64). En este caso no se utilizó LPG sino peptidasas de cisteína lo que favorece la idea de que el parásito cuenta con varias posibilidades de asegurar su sobrevivencia en el hospedero.

Las células de la respuesta inmune innata son las primeras en tratar de controlar la infección causada por *Leishmania*. Una de las primeras células que entran en contacto con el parásito debido a su localización anatómica son las CD y posteriormente los monocitos (65). Las CD y los monocitos además de ser buenas presentadoras de antígenos, también son buenas productoras de IL-12, la cual desarrolla una respuesta inmune tipo Th1 que en leishmaniasis ayuda a resolver la infección. Se ha observado que la secreción de IL-12 ayuda a activar células NK y células T para que estas secreten IFN γ el cual potencia la actividad microbicida de los macrófagos.

En este trabajo observamos que las CD secretaron más IL-12 en comparación con los monocitos ante el estímulo de LPG, esto puede deberse a que la CD es la primera en entrar en contacto con el parásito *Leishmania* y trata de controlar la infección mediante la secreción de IL-12 que activa a células NK y células T. Mientras que los monocitos llegan poco tiempo después de migrar del torrente sanguíneo, en este trabajo observamos que los monocitos secretan IL-12

pero en menor cantidad que las CD, esto puede deberse a que los monocitos además de tratar de eliminar al parasito mediante la secreción de IL-12 también controlan de manera importante el proceso inflamatorio secretando IL-10. El parasito aprovecha esta regulación disminuyendo mecanismos microbicidas en el macrófago y exacerbando la enfermedad.

La secreción de citocinas puede correlacionarse con la translocación de NF- κ B la cual activa principalmente genes para citocinas proinflamatorias. En este trabajo se observó que las CD comparado con los monocitos en presencia de LPG, existe mayor activación de NF- κ B causando mayor secreción de IL-12. Sin embargo no hay diferencia en la producción de TNF α tanto en monocitos como en CD debido a que en estas células el LPG no induce producción de TNF α , sin embargo en otros tipos celulares existe aumento de esta citocina. Por lo tanto en este trabajo observamos que la molécula de LPG de *L. mexicana* tiene diferentes efectos tanto en la producción de citocinas como en la translocación de NF- κ B en monocitos y CD.

VII. CONCLUSIONES

Las CD producen mayor cantidad de IL-12 que los monocitos cuando son estimulados con LPG de *L. mexicana*.

Nuestros resultados sugieren que LPG regula la translocación de NF- κ B al núcleo, esto se correlaciona con la producción de IL-12.

Probablemente estén involucrados otros factores en la regulación de la respuesta inmune contra el parásito, entre ellos el papel de la citocina reguladora IL-10.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27:305-318.
2. Cunningham, A. C. 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp Mol Pathol* 72:132-141.
3. Handman, E., and D. V. Bullen. 2002. Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends Parasitol* 18:332-334.
4. Awasthi, A., R. K. Mathur, and B. Saha. 2004. Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res* 119:238-258.
5. Ho, J. L., H. K. Kim, P. M. Sass, S. He, J. Geng, H. Xu, B. Zhu, S. J. Turco, and S. K. Lo. 1996. Structure-function analysis of Leishmania lipophosphoglycan. Distinct domains that mediate binding and inhibition of endothelial cell function. *J Immunol* 157:3013-3020.
6. Ilgoutz, S. C., and M. J. McConville. 2001. Function and assembly of the Leishmania surface coat. *Int J Parasitol* 31:899-908.
7. Ilg, T., R. Etges, P. Overath, M. J. McConville, J. Thomas-Oates, J. Thomas, S. W. Homans, and M. A. Ferguson. 1992. Structure of Leishmania mexicana lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 267:6834-6840.
8. Descoteaux, A., and S. J. Turco. 2002. Functional aspects of the Leishmania donovani lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect* 4:975-981.
9. Sacks, D., and A. Sher. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 3:1041-1047.
10. Gordon, S., and P. R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953-964.
11. Passlick, B., D. Flieger, and H. W. Ziegler-Heitbrock. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74:2527-2534.
12. Ziegler-Heitbrock, H. W., G. Fingerle, M. Strobel, W. Schraut, F. Stelter, C. Schutt, B. Passlick, and A. Pforte. 1993. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 23:2053-2058.
13. Grage-Griebenow, E., R. Zawatzky, H. Kahlert, L. Brade, H. Flad, and M. Ernst. 2001. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur J Immunol* 31:48-56.
14. Stafford, J. L., N. F. Neumann, and M. Belosevic. 2002. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol* 28:187-248.
15. Larrengina, A. T., and L. D. Faló. 2005. Changing paradigms in cutaneous immunology: adapting with dendritic cells. *J Invest Dermatol* 124:1-12.
16. Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137:1142-1162.
17. Cavanagh, L. L., and U. H. Von Andrian. 2002. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 80:448-462.

18. Dzionek, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck, and J. Schmitz. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165:6037-6046.
19. Adams, S., D. W. O'Neill, and N. Bhardwaj. 2005. Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol* 25:87-98.
20. Nunez, R., N. Garay, A. Bruno, C. Villafane, E. Bruno, and L. Filgueira. 2004. Functional and structural characterization of two populations of human monocyte-derived dendritic cells. *Exp Mol Pathol* 77:104-115.
21. Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179:1109-1118.
22. Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin. 2005. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* 17:313-318.
23. Randolph, G. J., K. Inaba, D. F. Robbiani, R. M. Steinman, and W. A. Muller. 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11:753-761.
24. Brunda, M. J. 1994. Interleukin-12. *J Leukoc Biol* 55:280-288.
25. Steinman, R. M., and M. C. Nussenzweig. 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:351-358.
26. Albert, M. L., M. Jegathesan, and R. B. Darnell. 2001. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2:1010-1017.
27. Belz, G. T., W. R. Heath, and F. R. Carbone. 2002. The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol Cell Biol* 80:463-468.
28. Shortman, K., and Y. J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151-161.
29. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
30. Neumann, M., H. Fries, C. Scheicher, P. Keikavoussi, A. Kolb-Maurer, E. Brocker, E. Serfling, and E. Kampgen. 2000. Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood* 95:277-285.
31. Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3:133-146.
32. Stern, A. S., F. J. Podlaski, J. D. Hulmes, Y. C. Pan, P. M. Quinn, A. G. Wolitzky, P. C. Familletti, D. L. Stremlo, T. Truitt, R. Chizzonite, and et al. 1990. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6808-6812.
33. Abdi, K. 2002. IL-12: the role of p40 versus p75. *Scand J Immunol* 56:1-11.
34. Klinke, D. J., 2nd. 2006. The ratio of P40 monomer to dimer is an important determinant of IL-12 bioactivity. *J Theor Biol*.

35. Presky, D. H., H. Yang, L. J. Minetti, A. O. Chua, N. Nabavi, C. Y. Wu, M. K. Gately, and U. Gubler. 1996. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14002-14007.
36. Desai, B. B., P. M. Quinn, A. G. Wolitzky, P. K. Mongini, R. Chizzonite, and M. K. Gately. 1992. IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J Immunol* 148:3125-3132.
37. Cowdery, J. S., N. J. Boerth, L. A. Norian, P. S. Myung, and G. A. Koretzky. 1999. Differential regulation of the IL-12 p40 promoter and of p40 secretion by CpG DNA and lipopolysaccharide. *J Immunol* 162:6770-6775.
38. Armant, M., R. Armitage, N. Boiani, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1996. Functional CD40 ligand expression on T lymphocytes in the absence of T cell receptor engagement: involvement in interleukin-2-induced interleukin-12 and interferon-gamma production. *Eur J Immunol* 26:1430-1434.
39. Kang, B. Y., E. Kim, and T. S. Kim. 2005. Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells. *Cell Signal* 17:665-673.
40. Vaidyanathan, H., J. D. Gentry, A. Weatherman, S. D. Schwartzbach, and T. M. Petro. 2001. Differential response of the murine IL-12 p35 gene to lipopolysaccharide compared with interferon-gamma and CD40 ligation. *Cytokine* 16:1-9.
41. Ma, X., and G. Trinchieri. 2001. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *Adv Immunol* 79:55-92.
42. Zingarelli, B. 2005. Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med* 33:S414-416.
43. Hayden, M. S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18:2195-2224.
44. Rubtsov, A. M., and O. D. Lopina. 2000. Ankyrins. *FEBS Lett* 482:1-5.
45. Karin, M., and Y. Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663.
46. Bonizzi, G., and M. Karin. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25:280-288.
47. Huang, D. B., C. B. Phelps, A. J. Fusco, and G. Ghosh. 2005. Crystal structure of a free kappaB DNA: insights into DNA recognition by transcription factor NF-kappaB. *J Mol Biol* 346:147-160.
48. Reiner, N. E., W. Ng, and W. R. McMaster. 1987. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol* 138:1926-1932.
49. Kaye, P. M., N. J. Rogers, A. J. Curry, and J. C. Scott. 1994. Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *Eur J Immunol* 24:2850-2854.
50. Belkaid, Y., B. Butcher, and D. L. Sacks. 1998. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol* 28:1389-1400.
51. Carrera, L., R. T. Gazzinelli, R. Badolato, S. Hieny, W. Muller, R. Kuhn, and D. L. Sacks. 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin

- IL-12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 183:515-526.
52. Piedrafita, D., L. Proudfoot, A. V. Nikolaev, D. Xu, W. Sands, G. J. Feng, E. Thomas, J. Brewer, M. A. Ferguson, J. Alexander, and F. Y. Liew. 1999. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania phosphoglycans*. *Eur J Immunol* 29:235-244.
 53. Marovich, M. A., M. A. McDowell, E. K. Thomas, and T. B. Nutman. 2000. IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. *J Immunol* 164:5858-5865.
 54. Quinones, M., S. K. Ahuja, P. C. Melby, L. Pate, R. L. Reddick, and S. S. Ahuja. 2000. Preformed membrane-associated stores of interleukin (IL)-12 are a previously unrecognized source of bioactive IL-12 that is mobilized within minutes of contact with an intracellular parasite. *J Exp Med* 192:507-516.
 55. Aebischer, T., C. L. Bennett, M. Pelizzola, C. Vizzardelli, N. Pavelka, M. Urbano, M. Capozzoli, A. Luchini, T. Ilg, F. Granucci, C. C. Blackburn, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2005. A critical role for lipophosphoglycan in proinflammatory responses of dendritic cells to *Leishmania mexicana*. *Eur J Immunol* 35:476-486.
 56. Butcher, B. A., L. Kim, P. F. Johnson, and E. Y. Denkers. 2001. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J Immunol* 167:2193-2201.
 57. Scanga, C. A., J. Aliberti, D. Jankovic, F. Tilloy, S. Bennouna, E. Y. Denkers, R. Medzhitov, and A. Sher. 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol* 168:5997-6001.
 58. Xu, X., K. Sumita, C. Feng, X. Xiong, H. Shen, S. Maruyama, M. Kanoh, and Y. Asano. 2001. Down-regulation of IL-12 p40 gene in *Plasmodium berghei*-infected mice. *J Immunol* 167:235-241.
 59. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
 60. Gorak, P. M., C. R. Engwerda, and P. M. Kaye. 1998. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 28:687-695.
 61. Bennett, C. L., A. Misslitz, L. Colledge, T. Aebischer, and C. C. Blackburn. 2001. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Immunol* 31:876-883.
 62. Shapira, S., K. Speirs, A. Gerstein, J. Caamano, and C. A. Hunter. 2002. Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 185 Suppl 1:S66-72.
 63. Obermaier, B., M. Dauer, J. Herten, K. Schad, S. Endres, and A. Eigler. 2003. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online* 5:197-203.
 64. Cameron, P., A. McGachy, M. Anderson, A. Paul, G. H. Coombs, J. C. Mottram, J. Alexander, and R. Plevin. 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana*

amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol* 173:3297-3304.

65. MC. de Almeida, V. V., A. Barral, M. Barral-Netto. 2003. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:861-870.