



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD
INMUNOESTIMULADORA QUE EJERCE EL DNA DE
Leishmania mexicana SOBRE EL RECEPTOR TLR9
PRESENTE EN MACRÓFAGOS MURINOS”**

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 :

MARÍA BERENICE MARTÍNEZ SALAZAR



Tutora: Ingeborg Dorotea Becker Fauser

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.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

División de Estudios Profesionales

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Análisis de la capacidad inmunoestimuladora que ejerce el DNA de Leishmania mexicana
sobre el receptor TLR9 presente en macrófagos murinos"

realizado por Martínez Salazar María Berenice

con número de cuenta 09517181-4 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a)
Propietario

Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser

Propietario

Dra. Patricia Margarita Tato Zaldivar

Propietario

Dra. María del Carmen Maldonado Bernal

Suplente

Dr. Armando Pérez Torres

Suplente

Dra. Laila Gutierréz Kobeh

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 08 de noviembre
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE Biología

del 2006

FACULTAD DE CIENCIAS

DR. ZENON CANO SANTANA



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ingeborg Becker por todo el apoyo que me dio y por confiar en mí para la realización de este proyecto. Pero especialmente, por todos los conocimientos que me transmitió y que me han ayudado a crecer como Profesionista y como persona. Muchas Gracias Dra. Inge.

A la Dra. Miriam Berzunza Cruz, por todo el apoyo técnico en la realización de esta Tesis. Miriam sin tu ayuda habría sido muy difícil, gracias por todo y por tu amistad.

A las M. en C. Adriana Ruiz Remigio y Rocely Cervantes Sarabia, por el apoyo técnico para la realización de este proyecto y por su invaluable amistad.

A la Dra. Magdalena Aguirre García, por su apoyo y sus valiosos consejos durante el desarrollo de esta Tesis.

A todo el departamento de Inmunoparasitología por hacer más ameno el trabajo.

Al Jurado que reviso mi tesis y que con sus consejos ayudaron a mejorarla. Dra. Patricia Tato Z., Dra. Ma. Del Carmen Maldonado B., Dr. Armando Pérez T. y Dra. Laila Gutiérrez K.

Al Ingeniero Agni Omar García Hernández y al Técnico Marco E. Gudiño Zayas por su ayuda técnica y por su amistad.

A las Secretarias, Lucía Álvarez y Rosa Delgado por su disposición para ayudarme siempre.

A todos mis maestros de la Facultad de Ciencias y a la UNAM, de la que me siento muy orgullosa de pertenecer. Gracias por todas sus enseñanzas y los conocimientos que me dieron.

Este proyecto fue financiado por **CONACYT 47256-M** y por **PAPIIT IN 221806-3**

DEDICADA ESPECIALMENTE A:

TOÑA:

Abuelita, con tu entereza y tu sabiduría has sabido guiar a la familia en todo momento. Con tu alegría iluminas nuestras vidas. Nos has entendido siempre y nos has amado con tu gran corazón. Abu, eres un ejemplo para todos.

MAGOS:

Mamá, admiro toda tu fortaleza. Sacaste fuerzas de flaqueza en los momentos más difíciles para hacer de mi hermana y de mi las mujeres que ahora somos, cuando sea grande quiero ser como tú. Te admiro profundamente y este trabajo es tan tuyo como mío, mami Margara.

ROSALBA:

Por que no conforme con una madre, a mí me tocaron 2. Tía, gracias por toda tu ayuda, por todo tu amor y por tus consejos que son sólo, los que una madre puede dar.

MARIBEL:

Hermana, siendo tan diferentes tenemos la misma familia en común. Te agradezco todos los momentos, incluyendo los de enojo, que me ayudaron a ser la persona que soy. Te agradezco también toda la ayuda que me diste y los momentos de alegría con tus ocurrencias. Que nunca se apague tú chispa.

DONAXI Y VALERIA:

Mis niñas, otras dos hermanas más que me inspiran a seguir adelante. Donaxi, no lo sabes, pero llegaste a mi vida en el momento que más lo necesitaba, me diste una razón para vivir y me llenaste de mucho amor con tu infinita ternura. Valeria, llenas de luz cada rincón donde te apareces con esa sonrisa y con esos ojos con los que expresas todo tu amor. Nunca dejen de sonreír.

“Sin ustedes, la vida sería muy triste. Las AMO a todas”

DEDICATORIAS

A mi Abu **Jacinto**, mi hermano **José Miguel** y mi tío **Abraham**, por todos los momentos de felicidad que me han dado. Y a toda la Familia, Tíos, primos, sobrinos, con los que he vivido buenos momentos.

A **Nifelheim**, por su infinito amor, por todas las palabras de aliento, por sus porras y por hacerme sentir la mujer más especial del mundo. TE AMO mucho, llenas mi vida de esperanza y por enseñarme que no es tan difícil ser feliz.

A mi amiga **Ely**, por todos los momentos felices y las cosas que vivimos juntas. Te quiero mucho.

A mis amigos de la Facultad, **Yuko**, **Etienne**, **Josué**, **Lorena**, **Carmen**, **Gran Gus**, y **Zuemy**, por las fiestas, prácticas de campo y demás momentos de felicidad y de tensión que compartimos juntos.

A mis amigos del laboratorio de Inmunoparasitología, **Cris**, **Alma**, **Edith**, **Araceli**, **Arturo**, **Perla**, **Vane**, **Jenny**, **Agni**, **Juan**, **Daniel**, **Iraís**, **Jesús**, **Mariana**, **Joselin**, **Leonardo** y **Abril**. Y los que me faltaron... gracias por esos momentos en el laboratorio.

Y a todos mis amigos, en especial a: **Dulce**, **Betza**, **Cristian**, **Bardo**, **Karla**, **Lalo**, **Raúl** (enano), **Rogelio** (diva?) y **Jorge** (mosco).

| CONTENIDO | PÁGINA |
|---|---------------|
| I. INDICE | i |
| II. INDICE DE FIGURAS | iv |
| III. ABREVIATURAS | vi |
| IV. RESUMEN | viii |
| | |
| • CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN | |
| ▪ 1.1. LEISHMANIASIS | 1 |
| A) Generalidades | 1 |
| B) Cuadros Clínicos | 2 |
| ▪ 1.2. EL VECTOR | 7 |
| ▪ 1.3. RESERVORIOS | 8 |
| ▪ 1.4. EL PARÁSITO | 9 |
| A) Taxonomía | 9 |
| B) Morfología y ciclo de vida | 9 |
| C) Metaciclogénesis | 11 |
| D) Factores de virulencia | 12 |
| ▪ 1.5. RESPUESTA INMUNE A LA ENFERMEDAD | 14 |
| ▪ 1.6. EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR <i>Leishmania</i> | 16 |
| ▪ 1.7 RECEPTORES TIPO TOLL (TLR) | 17 |
| ▪ 1.8. TLR9 (Toll – like receptor 9) y CpG DNA | 22 |
| | |
| • CAPITULO 2. JUSTIFICACIÓN | 28 |
| | |
| • CAPITULO 3. HIPÓTESIS | 29 |
| | |
| • CAPÍTULO 4. OBJETIVOS | 29 |
| ▪ 4.1. OBJETIVO GENERAL | 29 |
| ▪ 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES | 30 |

| | |
|--|----|
| • CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA | 31 |
| ▪ 5.1. Esquema Metodológico | 31 |
| ▪ 5.2. Obtención de parásitos de <i>Leishmania mexicana</i> | 32 |
| ▪ 5.3. Purificación de DNA de <i>Leishmania mexicana</i> | 32 |
| ▪ 5.4. Purificación de DNA de Linfocitos humanos | 33 |
| ▪ 5.5. Digestión con <i>Hpa</i> II | 33 |
| ▪ 5.6. Análisis de la presencia de proteínas contaminantes | |
| ▪ en el DNA de <i>L. mexicana</i> | 34 |
| ▪ 5.7. Reconstitución de CpG | 35 |
| ▪ 5.8. Ratones | 35 |
| ▪ 5.9. Obtención de Macrófagos de Medula Ósea | 36 |
| ▪ 5.10. Estimulación de Macrófagos Derivados de Medula Ósea | 36 |
| ▪ PARA EL RT- PCR | 37 |
| ▪ PARA CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS | 37 |
| ▪ 5.11. Purificación del RNA Total | 38 |
| ▪ 5.12. RT-PCR | 38 |
| ▪ 5.13. Cuantificación de citocinas por ELISA | 39 |
| | |
| • CAPÍTULO 6. RESULTADOS | |
| ▪ 6.1. Digestión con <i>Hpa</i> II y presencia de motivos CpG en el DNA de <i>L. mexicana</i> | 41 |
| ▪ 6.2. Análisis de presencia de proteínas contaminantes en el DNA de <i>L. mexicana</i> por el método de Tinción con plata | 42 |
| ▪ 6.3. Cinética de la activación de TLR9 | 44 |
| ▪ 6.4. Concentración óptima para la activación de TLR9 | 48 |
| - Resultados de la concentración de CpG óptima | 49 |
| - Resultados de la concentración de DNA de <i>L. mexicana</i> | 50 |
| - Curva de concentración | 51 |
| - Confirmación de la especificidad de la Expresión de TLR9 inducida por la estimulación con DNA de <i>L. mexicana</i> | 53 |
| ▪ 6.5. Producción y secreción de citocinas | 55 |

| | |
|--|----|
| - Producción de IL-10 | 55 |
| - Producción de IL-12 _{p40} . | 57 |
| - Producción de TNF- α | 59 |
| • CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN | 61 |
| • CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES | 68 |
| • CAPÍTULO 9. REFERENCIAS | 69 |
| • Apéndice I. Soluciones | 77 |
| • Apéndice II. Reactivos y Equipo | 79 |

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | Pág. | |
|----------|--|----|
| Fig. 1) | Mapa de Leishmaniasis en México | 2 |
| Fig. 2) | Lesión de Leishmaniasis Cutánea localizada | 5 |
| Fig. 3) | Paciente con Leishmaniasis Cutánea Diseminada | 5 |
| Fig. 4) | Paciente con Leishmaniasis mucocutánea | 5 |
| Fig. 5) | Niño con Leishmaniasis Visceral | 5 |
| Fig. 6) | Mosquito hembra de la subfamilia Phlebotominae | 8 |
| Fig. 7) | Perro con Leishmaniasis | 8 |
| Fig. 8) | Diferencias morfológicas del parásito <i>Leishmania</i> | 10 |
| Fig. 9) | Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> | 11 |
| Fig. 10) | Representación de los factores de virulencia en <i>Leishmania</i> | 13 |
| Fig. 11) | Representación de un TLR | 19 |
| Fig. 12) | Los TLR's y sus ligandos | 21 |
| Fig. 13) | Diferencias del TLR9 humano y murino | 23 |
| Fig. 14) | Internalización de los CpG | 25 |
| Fig. 15) | Mecanismos de acción de los CpG en la activación de las células inmunes | 26 |
| Fig. 16) | DNA de <i>L. mexicana</i> y de linfocitos humanos, digeridos con la enzima <i>Hpa</i> II | 41 |
| Fig. 17) | Gel SDS-PAGE al 10% teñido con plata | 43 |
| Fig. 18) | Producto del RT-PCR de células estimuladas a diferentes tiempos | 45 |
| Fig. 19) | Densitometría de las células estimuladas a diferentes tiempos | 46 |
| Fig. 20) | Producto del RT-PCR de las células estimuladas durante 6, 7 y 18 h. | 47 |
| Fig. 21) | Producto del RT-PCR de las células estimuladas con diferentes concentraciones de DNA de <i>L. mexicana</i> | 49 |
| Fig. 22) | Análisis de la densidad de las bandas producto de la RT-PCR de las células estimuladas con diferentes concentraciones de CpG | 49 |
| Fig. 23) | Producto de la RT-PCR de las células estimuladas con diferentes concentraciones de DNA de <i>L. mexicana</i> | 50 |

| | | |
|----------|--|----|
| Fig. 24) | Densitometría de las bandas del producto de la RT-PCR de las células estimuladas con diferentes concentraciones de DNA de <i>L. mexicana</i> | 50 |
| Fig. 25) | Producto de la RT-PCR de la curva de concentración visualizado en un gel de agarosa al 1.5% | 51 |
| Fig. 26) | Densitometría del producto de la RT-PCR de la curva de concentración. | 52 |
| Fig. 27) | Producto de la RT-PCR del análisis de la especificidad de TLR9. | 53 |
| Fig. 28) | Densitometría de las bandas producto de la RT-PCR de células estimuladas con DNA de <i>L. mexicana</i> . | 54 |
| Fig. 29) | Resultados de la cuantificación de IL-10. | 56 |
| Fig. 30) | Resultados de la cuantificación de IL-12 | 58 |
| Fig. 31) | Resultados de la cuantificación de TNF- α | 60 |
| Tabla 1) | Receptores Tipo Toll y sus ligandos | 20 |
| Tabla 2) | Promedio de la cuantificación de IL-10 | 56 |
| Tabla 3) | Promedio de la cuantificación de IL-12 | 57 |
| Tabla 4) | Promedio de la cuantificación de TNF- α | 59 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| μg | Microgramos |
| μl | Microlitros |
| APC | Célula presentadora de antígenos |
| CD | Célula Dendrítica |
| CDm | Célula dendrítica mieloide |
| CDp | Célula dendrítica plasmacitoide |
| CpG | Citocina fosfato Guanina |
| Fig. | Figura |
| GIPL | Glicosil-inositolfosfolípido |
| H | Horas |
| hrs | Horas |
| IFN | Interferón |
| IL | Interleucina |
| iNOS | Óxido nítrico sintetasa inducible |
| L | Litros |
| L. mex | <i>Leishmania mexicana</i> |
| LPG | Lipofosfoglicano |
| LPS | Lipopolisacárido |
| LRR | Regiones ricas en leucina |
| MAC | Complejo de ataque a la membrana |
| M-CSF | Factor estimulador de colonias de monocitos |
| MDMO | Macrófagos derivados de médula ósea |
| MHC | Complejo Mayor de Histocompatibilidad |
| min | minutos |
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| MM | Marcador de tamaño molecular |
| Mpm | Marcador de peso molecular |
| ng | Nanogramos |

| | |
|--------------|--|
| NO | Óxido Nítrico |
| ODN | Oligodeoxinucleótido |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPS | Organización Panamericana de la Salud |
| PAMP | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PBS | Buffer salino de fosfatos |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PKC | Proteína cinasa C |
| PPG | Proteofosfoglicano |
| PRR | Receptores de reconocimiento patrón |
| rORFF | Antígeno recombinante de <i>Leishmania</i> |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| sAP | Fosfatasas ácidas secretadas |
| SLA | Antígeno soluble de <i>Leishmania</i> |
| TCR | Receptor de células T |
| TLR | Receptor tipo Toll (Toll-like receptors) |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |

RESUMEN

La leishmaniosis es una enfermedad causada por un parásito protozoario intracelular obligado del género *Leishmania*. Éste se transmite a través de la picadura de un mosquito hembra del género *Lutzomyia*. La enfermedad presenta diversos cuadros clínicos que dependen tanto de la especie de *Leishmania* que infecta, como de la respuesta inmunológica del hospedero.

Las células de la respuesta inmune innata se caracterizan por poseer una variedad de receptores que reconocen moléculas conservadas presentes en los microorganismos y no en la célula hospedera. Estas moléculas son conocidas como patrones moleculares asociados a organismos patógenos (PAMPs) y que son esenciales para la sobrevivencia de éstos. Los receptores encargados de reconocer estos PAMPs son los PRR (receptores de reconocimiento patrón). Entre estos están los receptores tipo Toll (TLR). La unión de estos receptores con su ligando desencadena una cascada de señalización que conlleva a la producción de citocinas. TLR9 es un receptor presente en los macrófagos, que reconoce motivos CpG del DNA no metilado. Al unirse los CpG con TLR9 se potencia una respuesta inmune caracterizada por la producción de citocinas tipo Th1 tales como TNF- α e IL-12. Hasta ahora no hay informes de que el DNA de *Leishmania* o de otro parásito sea reconocido por TLR9. Existen informes de que el DNA de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Babesia bovis* inducen la producción de IL-12 y TNF- α en macrófagos bovinos aunque no se ha descrito el mecanismo mediante el cual ocurren estos eventos (Shoda *et al* 2001). En la leishmaniasis se ha informado que una respuesta inmune Th1 ayuda a controlar la proliferación del parásito promoviendo la curación del enfermo, en tanto que, una respuesta Th2 promueve la proliferación del parásito y exacerba la enfermedad. Este trabajo propone que el DNA de *Leishmania* puede ser reconocido por TLR9, lo que induciría una respuesta inmune caracterizada por la producción de citocinas que dirigen la respuesta inmune hacia tipo Th1 como TNF- α e IL-12. Si ésta hipótesis es correcta, el DNA del parásito podría usarse como adyuvante en pruebas de vacunas para leishmaniasis.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. LEISHMANIOSIS

A) Generalidades

La leishmaniosis es una enfermedad causada por un parásito protozooario flagelado, intracelular obligado, perteneciente al género *Leishmania* que infecta principalmente macrófagos del mamífero hospedero. Los parásitos son transmitidos a su hospedero por la picadura de un mosquito infectado (hembra) del género *Phlebotomus* en el viejo mundo o *Lutzomyia* en el nuevo mundo (Handman, 2000). Esta enfermedad posee distintas manifestaciones clínicas observables desde úlceras cutáneas en la zona de picadura del mosquito que sanan rápidamente, hasta una destrucción masiva de tejido que puede causar la muerte. Estas dependen tanto de la respuesta inmune del hospedero como de la especie del parásito que lo está infectando. La leishmaniosis humana está distribuida principalmente en las regiones tropicales de África y América, en la India, en el Mediterráneo y en el sureste de algunas regiones asiáticas. En México, se distribuye en al menos 17 entidades, desde Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas por el norte, hasta la península de Yucatán y Chiapas al sur-sureste (Fig.1), (Velasco 1994). Los últimos informes sobre leishmaniasis en México son los escritos por Velasco en 1994 y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en 1999. Estas son las referencias que se usaron para escribir los datos sobre leishmaniasis.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima una prevalencia de 12 millones de casos y un estimado adicional de 2 millones de personas infectadas cada año en el mundo. En países o zonas endémicas, se estima que existen 500 mil casos de leishmaniosis visceral y 1.5 millones de casos de leishmaniosis cutánea. Esta enfermedad posee una baja tasa de mortalidad pero una alta tasa de morbilidad, que deja a las personas incapacitadas, ya sea por el tipo de

lesiones que presentan o por los estigmas sociales asociados a las deformidades y desfiguraciones causadas por la enfermedad.

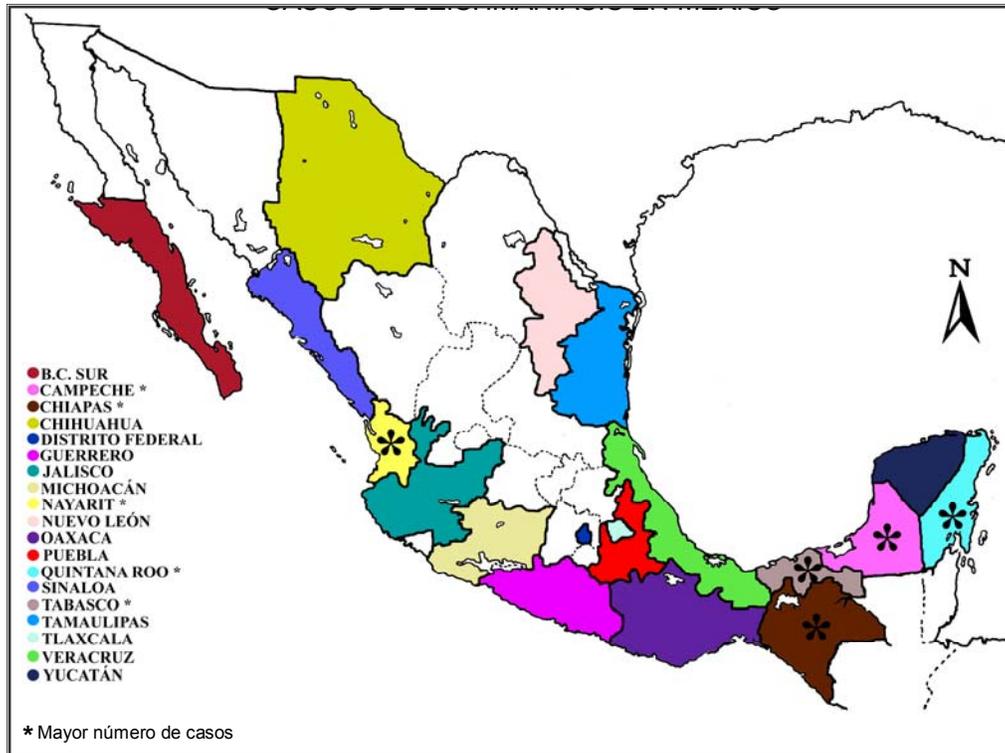


Fig.1) Mapa de leishmaniosis en México.

B) Cuadros Clínicos

Las leishmaniosis han sido clasificadas en diferentes tipos dependiendo de sus características clínicas y geográficas. Las principales formas son la leishmaniosis cutánea localizada, visceral (kala-azar) y mucocutánea, que se desarrollan en la dermis, en sistema fagocítico mononuclear y en el tracto de la mucosa nasoro-faríngea, respectivamente. La leishmaniosis cutánea es la forma más común del padecimiento y puede presentarse en distintas formas clínicas con diferentes características inmunológicas y de pronósticos opuestos. Los métodos de identificación de especies como hibridación de DNA y cariotipo cromosomal, entre otros, han sido utilizados también para demostrar la capacidad de diferentes

especies para causar cuadros clínicos similares de la enfermedad. (Velasco, 1994).

- **Leishmaniosis Cutánea Localizada (LCL).**

Conocida en México como úlcera de los chicleros, es causada principalmente por cuatro especies, *L. major* y *L. tropica* en el viejo mundo y *L. mexicana* y *L. braziliensis* en el nuevo mundo. Sin embargo, no se excluye que otras especies puedan causarla. La LCL comienza como una pequeña pápula roja que evoluciona hacia una ulceración pequeña y única que puede llegar a ser grande e incluso múltiple si el transmisor pica en forma repetida o cuando el hospedero es simultáneamente picado por varios vectores infectantes. El sitio de picadura del mosquito generalmente se da en zonas expuestas como los brazos, el cuello o la cara. Posee un periodo de incubación de 2 a 6 semanas. La ulceración es generalmente redondeada, de bordes indurados y elevados, fondo limpio e indoloro. La LCL tiende a la curación espontánea en 6 meses a 2 años según el agente etiológico, excepto cuando se localiza en orejas, donde es crónica y mutilante o si es causada por *L. braziliensis*, que origina úlceras muy persistentes y más resistentes al tratamiento con antimoniales (Fig. 2). En México se distribuye desde la frontera con los Estados Unidos hasta la península de Yucatán por el Golfo y desde Chiapas a Nayarit por el Pacífico. (Velasco, 1994; OPS, 1999; Herwaldt, 1999).

- **Leishmaniosis Cutánea Difusa (LCD)**

Las especies asociadas a esta forma de la enfermedad son *L. amazonensis* y *L. mexicana*. Es una forma diseminada que afecta la mayor parte del cuerpo del paciente. Todas las lesiones son ricas en parásitos y se inicia habitualmente con un nódulo que no se ulcera y se disemina por vía linfática, dando múltiples

nódulos. Los parásitos se diseminan por el líquido tisular, por la linfa o por la sangre llegando a colonizar prácticamente todo el tegumento con la excepción del cuero cabelludo, la región axilar, inguinal, genitales externos y palmas de las manos y plantas de los pies (Fig. 3). Los macrófagos de las lesiones no están rodeados por linfocitos, como en las lesiones clásicas caracterizadas de borde elevado y por este motivo no se ulceran a no ser que sean traumatizadas. De esta manera, los parásitos no están restringidos y pueden dispersarse. Dos características importantes de la LCD son que la persona afectada es anérgica hacia antígenos del parásito y la enfermedad es crónica recidivante para la cual no existe cura. Según los informes de 1994 y 1999 la incidencia es baja, pero se encuentran casos desde México hasta Brasil. En México se extiende desde el sur de Texas y Coahuila a Chiapas; no ha sido encontrada hasta ahora en Yucatán y Quintana Roo (Velasco, 1994; OPS, 1999).

- **Leishmaniosis Mucocutánea (LMC) o Espundia**

Las especies que causan este espectro son *L. braziliensis* y *L. panamensis*. La leishmaniosis mucocutánea, también llamada “espundia” se manifiesta por la presencia de lesiones muy destructivas de las mucosas nasal y orofaríngea, causando degeneración del cartílago y tejidos suaves, con desfiguración de labios, nariz, paladar y cuerdas bucales que pueden entorpecer la fonación y la deglución e incluso causan inanición debido al intenso dolor (Fig.4) (Velasco, 1994).

Esta forma de leishmaniosis normalmente no responde bien al tratamiento con medicamentos antimoniales y muchas veces requiere varias series de aplicaciones múltiples. Las metástasis a las mucosas pueden ocurrir simultáneamente con una lesión crónica de leishmaniasis cutánea o puede presentarse hasta 24 años después de la infección original. En México se han observado casos en Veracruz, Tabasco, Chiapas y Oaxaca (Velasco, 1994; OPS, 1999).



Fig. 2) Lesión de leishmaniosis cutánea en la mano de un paciente. www.ars.usda.gov.



Fig. 3) Paciente con leishmaniosis cutánea diseminada. En la foto se observan las lesiones características en toda la piel. Tomada en el laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Medicina UNAM.



Fig. 4) Paciente con leishmaniosis mucocutánea.
<http://www.stanford.edu/class/umbio103/ParaSites2003/Leishmania/leish%20web.html>



Fig. 5) Niño con leishmaniosis visceral.
<http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2003/Leishmania/leish%20web.html>

- **Leishmaniosis Visceral (LV) o kala-azar**

Es causada por *L. donovani* y subespecies en el viejo mundo y por *L. chagasi* o *L. infantum* en el nuevo mundo. Se presenta desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el norte de Argentina. Su mayor incidencia se manifiesta en el Noreste de Brasil, pero se encuentra en la mayoría de las zonas semiáridas de la región. La LV es común en América Latina, afecta primordialmente a los niños de entre 1 y 4 años y predomina en el sexo masculino. Esta enfermedad se asocia sobre todo con la desnutrición y en zonas rurales, con la presencia de perros. Los amastigotes de 2 a 3 μm residen en las células del sistema fagocítico mononuclear de las vísceras incluyendo bazo, ganglios linfáticos e hígado. Normalmente el periodo de incubación es entre 2 y 4 meses. La sintomatología incluye un bajo grado de fiebre, malestar general y abdomen protuberante debido a hepato-esplenomegalia (Fig.5). Esta enfermedad no cura espontáneamente y con frecuencia lleva a la muerte del paciente, si no se trata adecuadamente. El kala-azar o enfermedad negra puede presentarse en tres modalidades: endémica, esporádica y epidémica. El periodo de incubación oscila de 10 días a más de un año. Los signos y síntomas más frecuentes son fiebre, malestar general, anorexia y pérdida de peso que puede progresar hasta la caquexia. Así como, la hepato-esplenomegalia, linfadenopatía, pancitopenia y palidez de mucosas. El oscurecimiento de la piel, particularmente de cara, abdomen y manos es común en la India de ahí el nombre kala-azar, en tanto que en Latinoamérica es ligero y esporádico. En México, esta modalidad afecta tanto a niños como a adultos. La forma esporádica de LV se observa en individuos no nativos que penetran en un área endémica. El cuadro clínico comienza de 3 semanas a 2 años después de la exposición a la picadura de la *Lutzomyia* infectante. La forma epidémica ocasionalmente se observa en las áreas endémicas y puede involucrar todos los grupos etáricos particularmente del sexo masculino. Habitualmente cursa en forma crónica (Velasco, 1994; OPS, 1999).

1.2. EL VECTOR

La leishmaniosis es transmitida por pequeños dípteros pilosos de las especies de *Phlebotomus* en Europa, Asia y África, y por especies de *Lutzomyia* en América. Su hábitat se encuentra en lugares húmedos y de bastante vegetación. Cuando el ser humano vive en zonas con estas características o ingresa en estas áreas por motivos de trabajo corre el riesgo de enfermarse de leishmaniosis cuando es picado por el mosquito vector.

Los artrópodos se distribuyen por todo el país pero son importantes sólo en las áreas de endemia de la leishmaniosis. Tienen de 2 a 3 mm de longitud, con cuerpo y alas muy pilosos las que mantienen erectas durante el reposo y cuando se alimentan (Fig. 6). Las hembras son las únicas hematófagas y se infectan al ingerir sangre de un hospedador parasitado. Esta contiene macrófagos o monocitos con el parásito en forma de amastigote en el interior. En el vector se lleva a cabo una parte del ciclo de vida del parásito donde pasa por la metacicloogénesis y adquiere la capacidad infectiva y son regurgitados en el transcurso de la próxima ingesta de sangre. (Velasco, 1994; Gállego, 2004).

En este país, el único transmisor comprobado es *Lutzomyia (Nyssomyia) olmeca*. Se sospecha que *Lu. longipalpis*, *Lu. diabólica* y *Lu. cruciata* transmiten respectivamente, el kala-azar en la cuenca del Balsas y Chiapas, la leishmaniosis cutánea localizada y difusa en el norte de México, así como la úlcera de los chicleros en Oaxaca y Nayarit. (Velasco, 1994).



Fig. 6) Mosquito hembra de la subfamilia *phlebotominae*.

1.3. RESERVORIOS

El reservorio de una enfermedad es aquel animal que garantiza la existencia y supervivencia del agente etiológico y es la fuente de infección del hombre en un área endémica. Se ha reportado una gran variedad de animales como reservorios de *Leishmania*, pertenecen a distintos grupos taxonómicos y son tanto silvestres como domésticos, entre ellos el perro (Fig. 7).



Fig. 7) Perro con leishmaniosis, se observa la caquexia y algunas lesiones ocasionadas por la enfermedad. Puede actuar como reservorio para el parásito. www.liv.ac.uk.

En México, los roedores silvestres que podrían servir de reservorio para *L. mexicana* podrían ser: *Ototylomis phyllotis*, *Heteromys desmarestianus*, *Nyctomys sumichrasti* y *Sigmodium hispidus*, pero aún no ha sido comprobado. En 1987, Velasco y Lebrija aislaron *Leishmania sp* de un coatí o tejón (*Nassua narica*) con lesiones mucocutáneas nasales (Velasco 1994).

1.4. EL PARÁSITO

A) Taxonomía

En la familia *Trypanosomatidae* se encuentra el género *Leishmania* al que pertenecen todas las diferentes especies del agente causal de la leishmaniosis. El género *Leishmania* ha sido dividido en dos subgéneros. En el subgénero *Leishmania* el desarrollo de estos organismos está restringido a la porción anterior del tracto alimentario del mosquito y en el subgénero *Viannia* el parásito se desarrolla en el intestino medio y posterior del mosquito (García, 2001). Aunque es considerable la diversidad dentro del género, solo ciertas especies de *Leishmania* son patogénicas para el humano, algunas de ellas son: *L. tropica*, *L. major*, *L. donovani*, *L. braziliensis* y *L. mexicana* (Cunningham, 2002).

B) Morfología y Ciclo de vida

El parásito se encuentra en dos formas distintas durante su ciclo de vida, el amastigote y el promastigote (Fig.8). En vertebrados, los parásitos existen como amastigotes, éstos son pequeños, miden de 3 a 5 µm de diámetro, son ovoides, intracelulares, no motiles y proliferan dentro del fagolisosoma del macrófago hospedero. En invertebrados, se encuentran en la forma de promastigotes, que son alargados, móviles y extracelulares. Es la forma introducida por el mosquito en de la piel del mamífero hospedero (Cunningham, 2002).

Durante los procesos de alimentación el mosquito inyecta saliva dentro de la piel del hospedero mamífero. La saliva del mosquito contiene compuestos vasodilatadores que presumiblemente incrementan el flujo de sangre hacia la zona de la picadura, facilitando la localización oportuna de vasos sanguíneos al evitar la coagulación de la sangre (Handman, 2000).

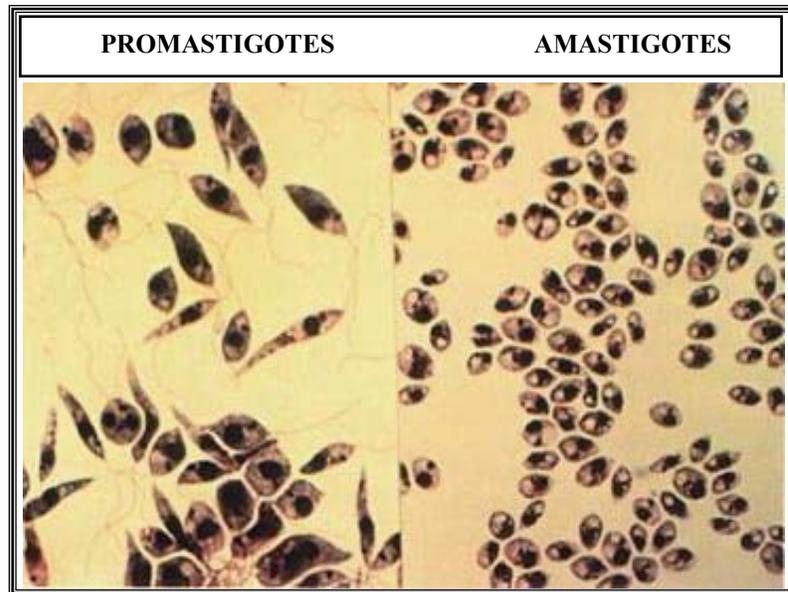


Fig. 8) Diferencias morfológicas del parásito *Leishmania*. Los promastigotes se desarrollan en el insecto vector y los amastigotes dentro del macrófago hospedero. www.ohsu.edu

En la ingesta de sangre, el mosquito ingiere los macrófagos infectados y los amastigotes son liberados en el estómago del insecto, donde se diferencian en promastigotes procíclicos. El promastigote pasa por un proceso llamado “metaciclogénesis”. Estos promastigotes metacíclicos se separan del epitelio estomacal y migran a la faringe y cavidad bucal. Durante la próxima ingesta de sangre, los promastigotes metacíclicos infectivos, serán transferidos dentro de un hospedero vertebrado. Los promastigotes son incorporados dentro de fagolisosomas donde se diferencian a la forma de amastigotes. Los amastigotes proliferan y eventualmente la membrana del macrófago infectado es destruida y

son liberados para ser ingeridos por células vecinas o por otro mosquito y el ciclo dentro del mosquito comienza de nuevo (Fig. 9) (Cunningham, 2002).

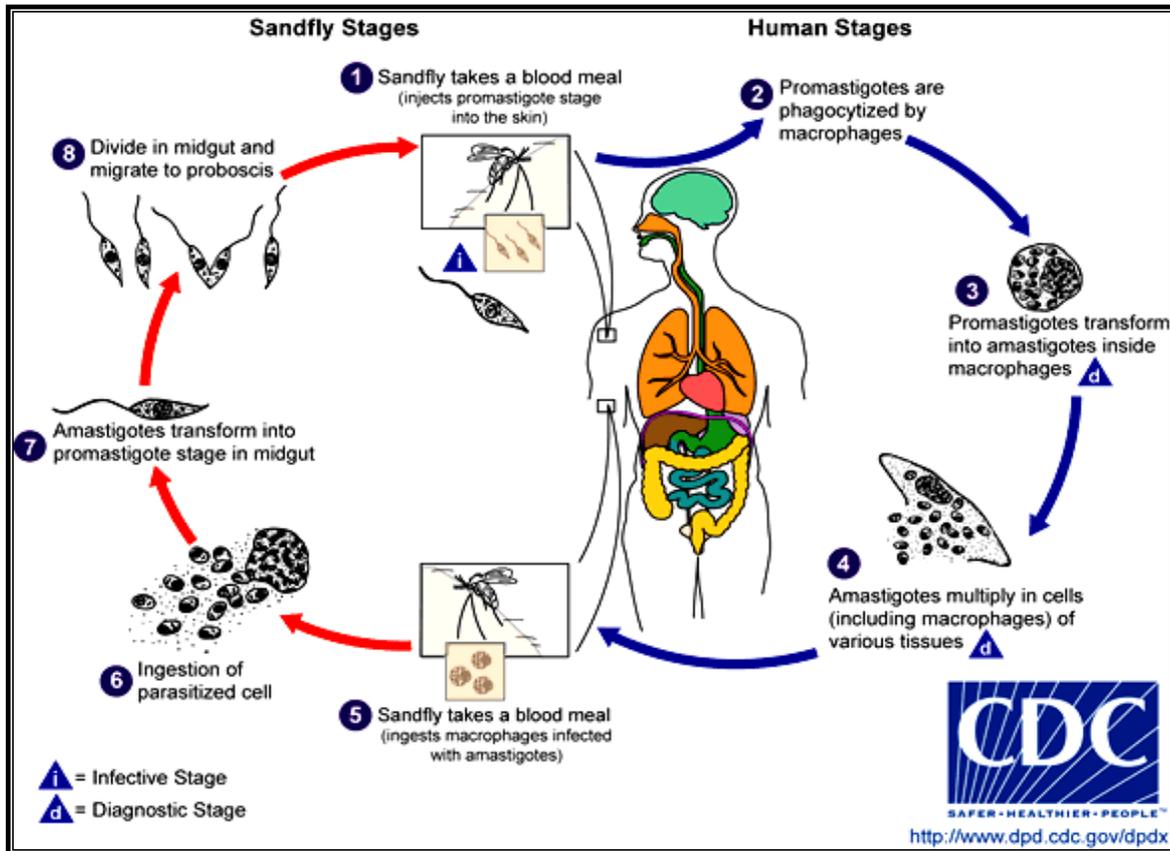


Fig. 9) Ciclo de vida de *Leishmania* que es ingerido por un mosquito hembra del género *Lutzomyia*.

C) Metaciclologénesis

Dentro del mosquito el parásito atraviesa una serie de cambios en un proceso llamado “metaciclologénesis” donde el promastigote procíclico no virulento desarrolla moléculas que le confieren la capacidad infectiva (promastigote metacíclico). La metaciclologénesis está acompañada de cambios bioquímicos y estructurales en el parásito, en particular en su superficie celular. Uno de los cambios más importantes tiene lugar en el glicocálix en la estructura del

lipofosfoglicano (LPG) y en la proteasa gp 63 (Handman, 2000; McConville *et al*, 1992).

D) Factores de virulencia

En su ciclo de vida, el parásito debe proliferar y sobrevivir a ambientes altamente hostiles. Para esto ha desarrollado mecanismos eficaces que le permiten combatir las agresiones del medio que le rodea. Estos mecanismos incluyen un denso glicocálix compuesto por lipofosfoglicanos (**LPG**), glicosilinositolfosfolipidos (**GIPL's**) y además secreta glicoconjugados, proteofosfoglicanos (**PPG's**) y fosfatasas ácidas (**sAP**) (Fig. 10) (Guha-Niyogi *et al*, 2001).

Dentro del macrófago, un **PPG** contribuye a la formación de la vacuola parasitófora que participa en el mantenimiento de la infección del mamífero hospedero. Existe evidencia también de que puede contribuir a la unión de *Leishmania* con las células hospederas y jugar un papel en la modulación del macrófago infectado en un estadio temprano de la infección. La **GP63** es una metaloproteasa abundante en la superficie de los promastigotes, que ha mostrado ser proteolíticamente activa sobre diferentes sustratos y puede estar incluida en la degradación de diferentes macromoléculas del hospedero. Puede servir también como un ligando para los receptores de complemento en el macrófago y protege al parásito de la lisis mediada por complemento. Los **GIPLs** están incluidos en la modulación de los eventos de señalización en el macrófago como la síntesis de Oxido Nítrico (NO) y en el estallido oxidativo (Guha-Niyogi *et al*, 2001).

El lipofosfoglicano (**LPG**) se encuentra localizado cubriendo la superficie entera del parásito incluyendo el flagelo formando un denso glicocálix y aparece en todas las especies de *Leishmania* que infectan humanos. El LPG es un factor de virulencia esencial para la sobrevivencia del parásito tanto en el insecto vector

como en el mamífero hospedero. Es la molécula que interactúa directamente con los macrófagos del mamífero al actuar como un PAMP y ser reconocido por receptores celulares como el receptor de manosa, los receptores de complemento (CR3,CR1) y el TLR2 de células NK (Handman, 2000; Guha-Niyogi *et al*, 2001). Recientemente, Becker y colaboradores (2003) demostraron en este laboratorio, que las células NK reconocían específicamente el LPG de *L. major* por medio del TLR2 y activaban los genes de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-12. Aebischer y colaboradores (2005) mostraron que la respuesta transcripcional proinflamatoria de las células dendríticas a *L. mexicana* es dependiente de la expresión de LPG, ésto fue apoyado por el hallazgo de que la infección con parásitos mutantes en LPG, cuya expresión fue restaurada reprodujeron los patrones de expresión de los mismos genes.

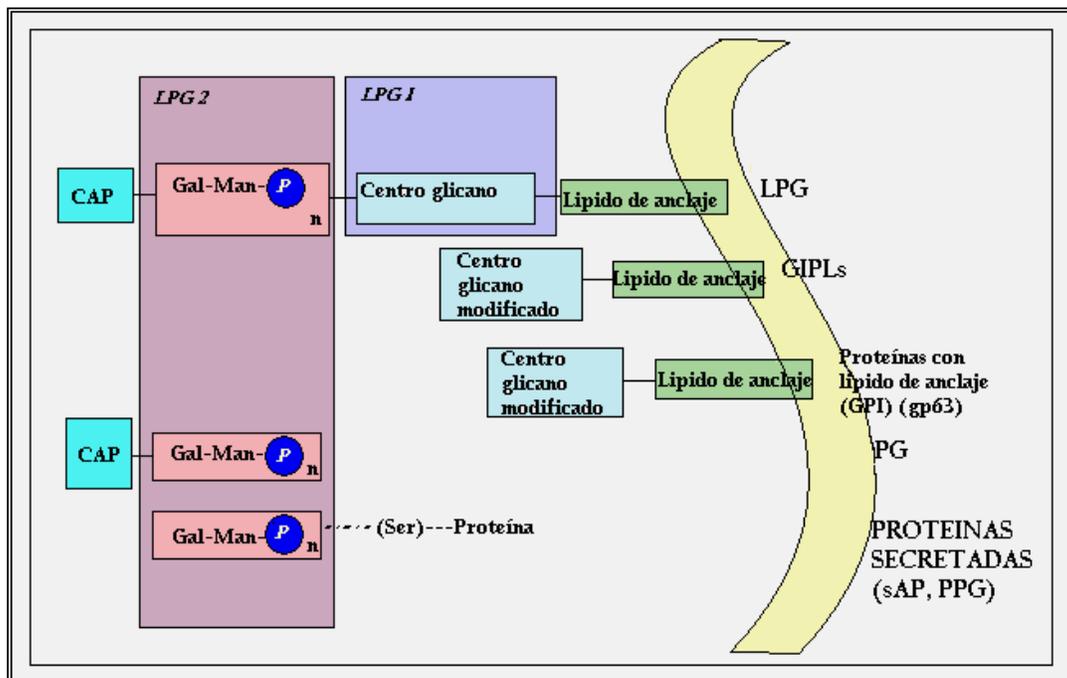


Fig.10) Factores de virulencia en el parásito *Leishmania*. Sacks *et al*, 2000.

1.5. RESPUESTA INMUNE A LA ENFERMEDAD

La respuesta inmune en la leishmaniosis empieza desde la picadura del mosquito que lacera la piel y los vasos sanguíneos superficiales del hospedero vertebrado produciendo un pequeño hematoma o un lago de sangre donde los promastigotes son introducidos. La saliva del mosquito posee poderosos agentes como el maxadilan, que inhibe los eventos proinflamatorios en el hospedero, incluyendo proliferación de esplenocitos. Estas propiedades sugieren un papel para la patogénesis de la leishmaniosis inhibiendo la respuesta inmune en el sitio de inoculación del parásito. La saliva también contiene otras moléculas como adenosina, factores antiplaquetarios, apirasa y prostaglandina E2 con acción vasodilatadora e inmunosupresiva así como moléculas que son quimioattractantes para las células de la respuesta inmune innata como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas (Vannier-Santos *et al*, 2002). Estas células son las primeras en responder ante una infección y de alertar al sistema inmune adaptativo. Las células reconocen al parásito gracias a los factores de virulencia que posee en su superficie y ante la unión de éstos con los receptores celulares, se desata una cascada de señalización desde los receptores involucrados hasta los factores de transcripción que termina en la producción de citocinas (Mc de Almeida *et al*, 2003).

Para estudiar la respuesta inmune en la leishmaniosis y su impacto en el hospedero, se han utilizado modelos animales susceptibles y resistentes a la enfermedad. Los modelos más usados son los ratones de la cepa C57BL/6 y BALB/c. Los ratones de la cepa BALB/c responden a la infección produciendo citocinas tipo Th2 como IL-4, IL-10 y TGF- β . Estos ratones no curan y la enfermedad progresa rápidamente dañando tejidos llegando a ser mortal. Por el contrario, los ratones de la cepa C57BL/6 resisten la enfermedad, pudiendo incluso sanar; esta cepa se caracteriza por producir citocinas que dirigen la respuesta inmune hacia tipo Th1 como IL-12, TNF- α e IFN- γ . Así, el modelo

murino ejemplifica el paradigma de la respuesta Th1/Th2 que influye en el trasfondo de la enfermedad por la naturaleza y magnitud de la respuesta de las células T y la producción de citocinas en el comienzo de la infección (Awashti *et al*, 2004; Sacks y Sher 2002; von Stebut y Udey, 2004).

Los parásitos carecen de la maquinaria necesaria para la invasión activa y son confinados por fagocitos profesionales. La fagocitosis es un arma importante en el sistema inmune innato; es llevada a cabo por fagocitos profesionales que engloban al microorganismo dentro de un compartimento celular donde son aniquilados. El principio fundamental de la inmunoregulación en la leishmaniosis es que el parásito que se replica en macrófagos quiescentes es matado por macrófagos activados. El macrófago es considerado un fagocito profesional por la gran cantidad de receptores fagocíticos que posee y por su enorme capacidad para reconocer partículas ajenas y englobarlas para su eliminación. Paradójicamente, el macrófago es la célula hospedera del parásito así como la célula efectora de su destrucción. La fagocitosis de *Leishmania* por el macrófago está mediada por receptores que incluyen los que reconocen patrones moleculares (PRR) por ejemplo CR3, CR1, receptores de manosa-fucosa, TLR2, etc. Esta fagocitosis resulta en activación de la NADPH oxidasa, la cual transfiere protones a oxígeno molecular formando superóxido altamente reactivo, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y radicales hidroxilos al fagosoma que interactúa con la membrana del parásito. Los macrófagos activados producen diferentes citocinas como TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-18. La IL-12 es un adjuvante efectivo y un prerequisite para una respuesta inmune tipo Th1. La producción de IFN- γ por células Th1 y células NK (natural killer) ayuda a la resistencia mientras la expansión de células Th2 productoras de IL-4 confieren susceptibilidad (Herwaldt, 1999; Cunningham, 2002; Awashti *et al*, 2004; Handman y Bullen, 2002).

La infección por *Leishmania* produce una estimulación de la respuesta inmune celular mediada por los linfocitos T con la participación de las células B. El

macrófago también actúa como célula presentadora de antígenos para células T, los macrófagos infectados procesan y presentan antígenos de *Leishmania* desde el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) al TCR (receptor de células T) de células T CD4+. La interacción CD40-CD40L también es necesaria para incrementar la respuesta Th1. Datos experimentales sugieren que las células T CD4+ pueden transferir pasivamente resistencia o exacerbación de la enfermedad, correlacionada con la producción de citocinas Th1 o Th2, respectivamente. Algunas investigaciones proponen que la respuesta inmune protectora o no-protectora en leishmaniosis depende del tipo de antígeno leishmanial reconocido por las células T (Awashti *et al*, 2004).

1.6. EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR *Leishmania*

Leishmania ha desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero y así asegurar su sobrevivencia. Las moléculas que posee en su superficie y las que secreta le son de gran ayuda para evitar ser eliminado por el sistema inmune. El parásito disminuye la actividad de PKC (proteína cinasa C) del macrófago para potenciar su supervivencia. Los GIPLs encontrados en los amastigotes también pueden inhibir la producción de óxido nítrico (NO) reduciendo la actividad leishmanicida del macrófago. El uso de los receptores de complemento CR1 y CR3 para entrar al macrófago hace que falle la activación del estallido respiratorio. El LPG contribuye a la capacidad de los promastigotes metacíclicos para resistir a la lisis mediada por complemento en el mamífero hospedero al evitar la inserción del complejo de ataque (MAC) C5-9 dentro de la membrana del promastigote e inhibe el estallido oxidativo del macrófago. Tanto promastigotes como amastigotes han mostrado ser capaces de regular la producción de IL-12 del macrófago, que es necesaria para el desarrollo y mantenimiento de una respuesta Th1. La unión del parásito en cualquiera de sus formas con los receptores del macrófago durante la fagocitosis suprime la

producción de IL-12. *Leishmania* también utiliza inmunoglobulinas como opsoninas para facilitar su entrada al macrófago. El enlace con el receptor Fc γ también induce la producción de IL-10, citocina que ha sido asociada con la supresión de la actividad antimicrobial del macrófago. TGF- β es una citocina que inhibe la activación del macrófago. Las células productoras de TGF- β son más prominentes en las lesiones de ratones BALB/c susceptibles comparados con los ratones resistentes C57BL/6 y los niveles de TGF- β parecen correlacionarse inversamente con los niveles de iNOS dentro de las lesiones parasitadas (Handman, 2000; Guha-Niyogi *et al*, 2001; Cunningham, 2002; Stafford *et al*, 2002).

1.7. RECEPTORES TIPO TOLL (TLR)

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra organismos patógenos. La estrategia del reconocimiento de la inmunidad innata está basada en la detección de estructuras altamente conservadas y esenciales presentes en muchos tipos de microorganismos y ausentes de la célula hospedera. Los blancos de la inmunidad innata se conocen como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP), los receptores del sistema inmune innato que reconocen estos PAMPs son llamados Receptores de Reconocimiento Patron (PRR) (Ashkar *et al*, 2002). Los PAMPs poseen tres características importantes:

1. Son producidos sólo por microorganismos y no por la célula hospedera. Así pueden distinguir entre lo propio y lo no-propio.
2. Son conservados entre los microorganismos de una clase dada. Esto permite un número muy limitado de PRRs para detectar la presencia de un amplio tipo de microorganismos.
3. Son esenciales para la sobrevivencia del microorganismo y alguna mutación o pérdida del PAMP es letal o reduce la adaptatividad del microorganismo.

Así el sistema inmune innato usa una variedad de PRRs que pueden ser expresados en la superficie celular o en compartimentos intracelulares. Estos receptores generalmente poseen funciones diferentes, ya sea de fagocitosis o de señalización. Los receptores de fagocitosis median la internalización de patógenos por medio del reconocimiento de moléculas del microorganismo para su destrucción. Los receptores de señalización o activación celular como los TLRs desencadenan la producción de citocinas, quimiocinas o moléculas co-estimuladoras dependiendo del tipo de antígeno reconocido y del receptor que lo reconoce. Los receptores Toll fueron descritos primero en *Drosophila* como un receptor Tipo I transmembranal que controla el patrón dorso-ventral del desarrollo embrionario en la mosca. Estos receptores han sido estudiados tanto en el entorno del desarrollo embrionario como en la respuesta inmune. La señalización en los receptores Toll ha sido identificada como elemento esencial de una efectiva respuesta inmune anti-hongos (fungicida) en la mosca. Las moscas mutantes en Toll mueren después de una exposición a *Aspergillus fumigatus*, debido a un crecimiento incontrolado del hongo (Takeda *et al*, 2003).

Estudios recientes han identificado homólogos de Toll en los mamíferos, proteínas ahora referidas como TLRs. En los humanos, la familia de los TLRs consta de 10 miembros (TLR1 – TLR10), mientras que en los mamíferos hay 11 TLRs, y no se duda que en un futuro sean descubiertos más. Los miembros de la familia de TLR están caracterizados estructuralmente por la presencia de un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina (LRR) y un dominio TIR intracelular similar al dominio intracelular del receptor de IL-1 (IL-1 R). Esas regiones son llamadas Toll/IL-1R (Fig. 11) (Takeda *et al*, 2003).

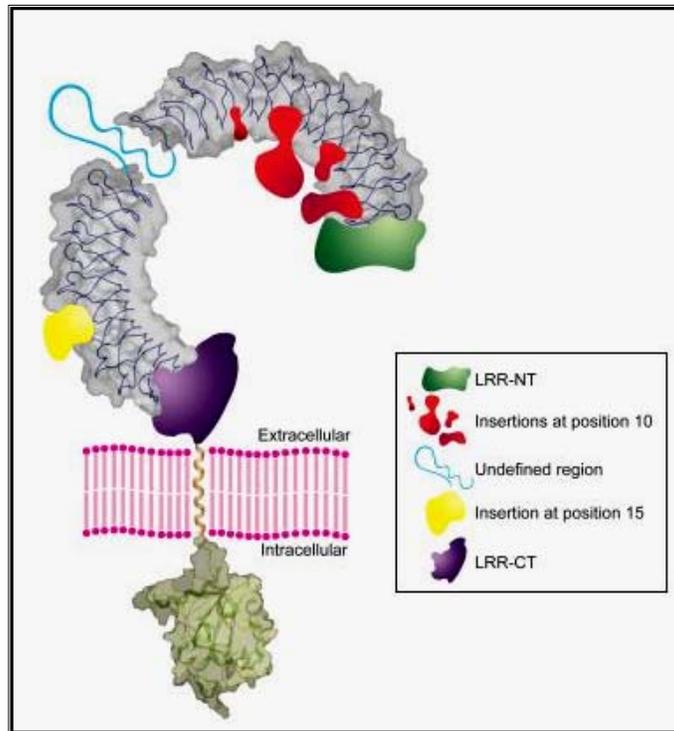


Fig. 11) Representación de un TLR. Se observa el dominio extracelular con repeticiones de leucina, el dominio transmembranal y un dominio intracelular o TIR. Trends in Immunology, 2003.

Los TLRs participan en la respuesta inmune, especialmente en la activación de la inmunidad innata. En 1998, se demostró que TLR4 está involucrado en el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS), el mayor componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. Subsecuentemente, otros miembros de la familia TLR han mostrado ser esenciales para el reconocimiento de varios componentes microbianos (Fig. 12) (Tabla 1). En humanos y otros vertebrados examinados, la activación de NF- κ B por la vía de TLR ayuda a la producción de varios mediadores importantes de la inmunidad innata como citocinas y quimiocinas. Al mismo tiempo, esta señalización induce la producción de moléculas que son esenciales para la respuesta inmune adaptativa conocidas como moléculas co-estimuladoras como B7-1(CD80) y B7-2(CD86) (Takeda *et al*, 2003).

| TLR | LIGANDO |
|-------|---|
| TLR1 | Tri-acil lipopeptidos (bacteria, mycobacteria) Factores solubles (<i>Neisseria meningitides</i>) |
| TLR2 | Lipoproteínas/lipopeptidos (de una variedad de patógenos) Peptidoglicanos (Bacterias Gram-positivas) Ácido lipoteicoico (Bacterias Gram-positivas) Lipoarabinomanano (mycobacteria) Lipofosfoglicano LPG (<i>Leishmania major</i>) Modulina fenol-soluble (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) Glicoinositolfosfolipidos (<i>Trypanosoma cruzi</i>) Glicolípidos (<i>Treponema maltophilum</i>) Porinas (Neisseria) Zimozan (hongos) LPS atípico (<i>Leptospira interrogans</i>) LPS atípico (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) HSP70 (Del hospedero) |
| TLR3 | RNA de doble cadena (virus) |
| TLR4 | LPS (Bacterias Gram-negativas) Taxol (plantas) Proteínas de fusión (RSV) Proteínas de cubierta (MMTV) HSP60 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) HSP60 (hospedero) HSP70 (hospedero) Type III repeat extra domain A of fibronectin (hospedero) Oligosacaridos de ácido hialurónico (hospedero) Fragmentos polisacaridos de sulfato de heparina (hospedero) Fibrinogeno (hospedero) |
| TLR5 | Flagelina (Bacteria) |
| TLR6 | Di-acil lipopeptidos (mycoplasma) |
| TLR7 | Imidazoquinolina (compuesto sintético) Loxoribina (compuesto sintético) Bropirimina (compuesto sintético) |
| TLR8 | RNA de cadena sencilla (virus y sintético) RNA de interferencia rico en U |
| TLR9 | CpG ODN, DNA no metilado (bacterias) |
| TLR10 | ? |

TABLA 1. Receptores tipo Toll y sus ligandos. Takeda *et al*, 2003.

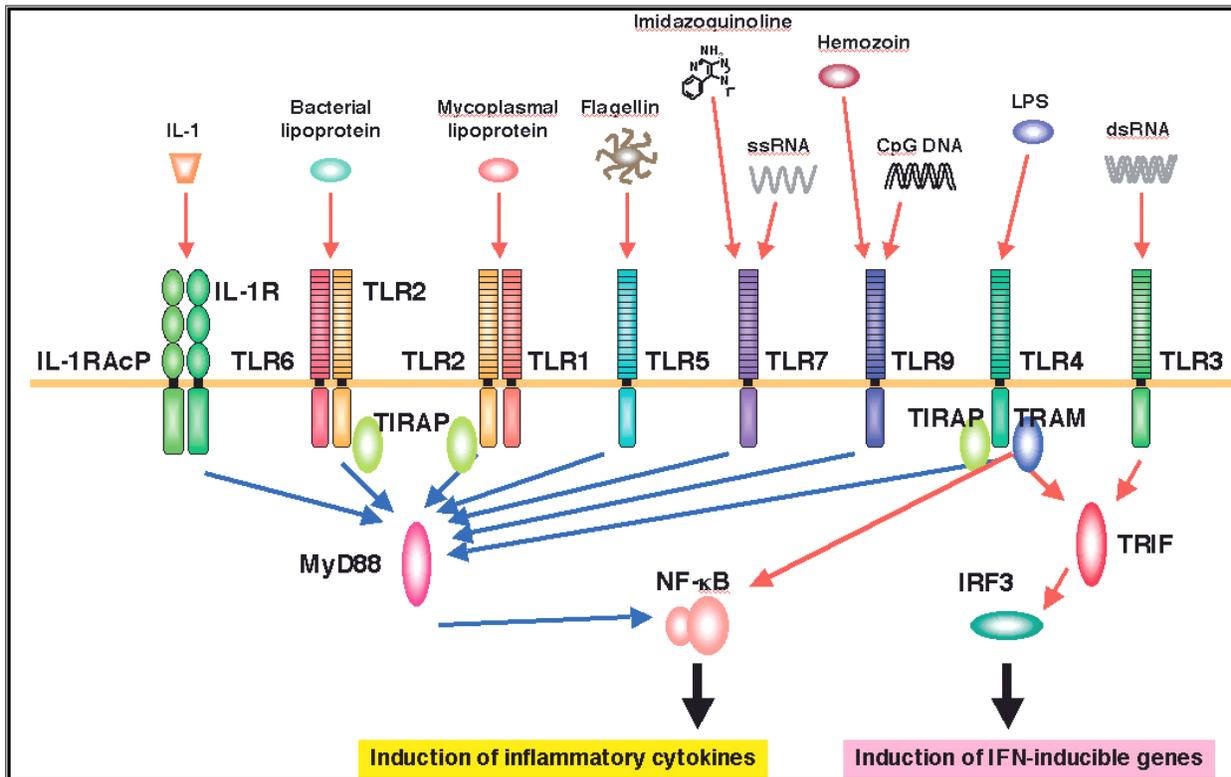


Fig. 12) Los TLRs y sus respectivos ligandos. La unión de éstos produce la activación de la célula y la producción de citocinas. www.biken.osaka-u.ac.jp

La expresión de la familia de TLRs ha sido elucidada en varios grupos celulares. La serie monocitos/macrófagos expresa mRNA para muchos TLRs excepto TLR3. La expresión de los TLRs en CDs difiere entre sus diferentes subtipos. En los humanos, la sangre contiene dos subtipos de CDs, mieloides (CDm) y plasmacitoides (CDp). CDm expresan TLR1, 2, 4, 5, 7 y 8, mientras que las CDp expresan exclusivamente TLR7 y TLR9. Así los TLRs son diferencialmente expresados en subtipos. Otros estudios han mostrado que los fagocitos en particular muestran expresión abundante de todos los TLRs conocidos. Los mastocitos expresan TLR2, 4, 6 y 8 pero no TLR5. Además de las células del sistema inmune, los TLRs son expresados en otros tipos de células que contribuyen a la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, el modelo de superficie del

epitelio intestinal con el ligando de TLR5, flagelina, induce una respuesta inflamatoria. Las proteínas TLR pueden activar vías de señalización similares. La unión de IL-1R con su ligando induce dimerización del receptor y el reclutamiento de la proteína accesoria IL-1 RAP, la unión de la proteína adaptadora MyD88 con activación de la cinasa IRAK, seguida por la fosforilación y activación de TRAF6, que subsecuentemente resulta en la activación de la cinasa inductora de NF- κ B (NIK) seguida por la cinasa I- κ B (IKK). IKK fosforila a I κ B, esta ubiquitinación favorece su degradación liberando al factor de transcripción NF- κ B, permitiendo así su translocación al núcleo donde interacciona con promotores y elementos mediadores de los genes de citocinas inflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-12 (Takeda *et al*, 2003).

1.8. TLR9 (Toll-like receptor 9) y CpG DNA

Las primeras observaciones del potencial del DNA bacteriano para activar a las células inmunes surgió cuando fueron utilizados extractos bacterianos como agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer y lo llamaron “Toxina de Coley” (Coley’s Toxin) por el Dr. William Coley quien fue el primero en establecer el uso de estos extractos. Décadas después de las observaciones de Coley, el efecto antitumoral fue atribuido a una endotoxina. En 1984, Tokunaga y colaboradores fueron los primeros en establecer que podía ser el DNA genómico solo el que podía actuar en la actividad y en los efectos antitumorales de la toxina Coley. Después, a mediados de los 90, Krieg y su equipo hicieron el descubrimiento crucial que identificó al DNA bacteriano y a los oligodeoxinucleótidos (ODN) sintéticos como responsables de los efectos inmunoestimuladores. Sintetizaron y probaron cientos de ODN y esclarecieron que una secuencia era elemento suficiente para la inducción de células B y la activación fue por un dinucleótido CpG no metilado en un contexto particular. Posteriormente, en el año 2000, Hemmi y colaboradores demostraron que el receptor que reconocía

específicamente los motivos CpG y el DNA no metilado de las bacterias era el receptor TLR9 presente en varios tipos celulares (Ashkar y Rosenthal, 2002; Wagner, 2001).

La estructura del TLR9 humano (hTLR9) es diferente del murino (mTLR9). Difieren en un 24% a nivel de aminoácidos, aunque contienen las mismas características de los otros TLRs. El número y distribución de las repeticiones ricas en leucina en el ectodominio de hTLR9 y mTLR9 no son idénticos. En el mTLR9 faltan las regiones 4, 7 y 11 del dominio LRR encontradas en el hTLR9. En contraste la región 16 del dominio LRR en el mTLR9 está ausente en el hTLR9 (Fig. 13) (Chuang *et al*, 2002).

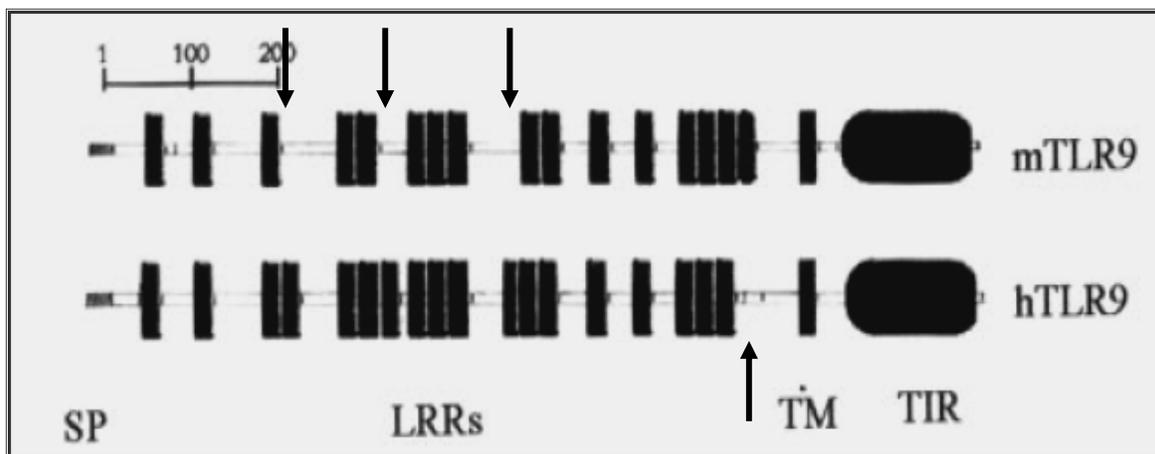


Fig. 13) Diferencias entre el TLR9 humano y murino, las principales se encuentran en el dominio de las repeticiones ricas en leucina. Chuang et al, 2002.

Las diferencias de TLR9 entre especies podría ser la causa del efecto selectivo en el reconocimiento de su ligando. TLR9 reconoce CpG de forma especie-específica. Así el motivo CpG para activar el hTLR9 difiere del mTLR9. En el humano, el motivo óptimo para la expresión, es el GTC**G**TT, mientras que para el TLR9 murino es el GAC**G**TT. Esto pudiera elucidar un posible uso en

inmunoterapia definida para una especie, ya sea en inmunizaciones o como adyuvante (Bauer *et al*, 2001; Chuang *et al*, 2002).

El TLR9 se encuentra localizado en el retículo endoplásmico del macrófago y otros tipos celulares y es aquí donde se une a su ligando en vesículas endocíticas. A diferencia de otros receptores que reconocen componentes de la pared celular bacterianos, este receptor reconoce específicamente motivos CpG presentes en el DNA no metilado de bacterias, el cual también puede actuar como un PAMP (Latz *et al*, 2004; Hemmi *et al*, 2000; Leifer *et al*, 2004). El DNA y los motivos CpG son internalizados rápidamente por las células inmunes en una vía endocítica dependiente de clatrina dentro de un compartimiento subcelular, probablemente con la participación de fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K). Esto es seguido por la aparente translocación para su unión con el receptor dentro del mismo compartimiento. Como el CpG es internalizado, la distribución de TLR9 cambia con una porción de la proteína total moviéndose primero al inicio de la formación del endosoma y más tarde dentro de compartimientos tubulares lisosomales. La importancia del movimiento de TLR9 a los compartimientos ricos en CpG es que esto hace posible la unión entre ambos y desencadena la señal de transducción para la producción de citocinas y activación celular (Latz *et al*, 2004). La interacción TLR9-CpG ayuda a la acidificación de las vesículas endocíticas y a la generación de especies reactivas de oxígeno (Fig. 14). Este evento puede ser bloqueado por wortmanina o cloroquina, que inhiben la maduración endosomal o la acidificación (Klinman, 2004).

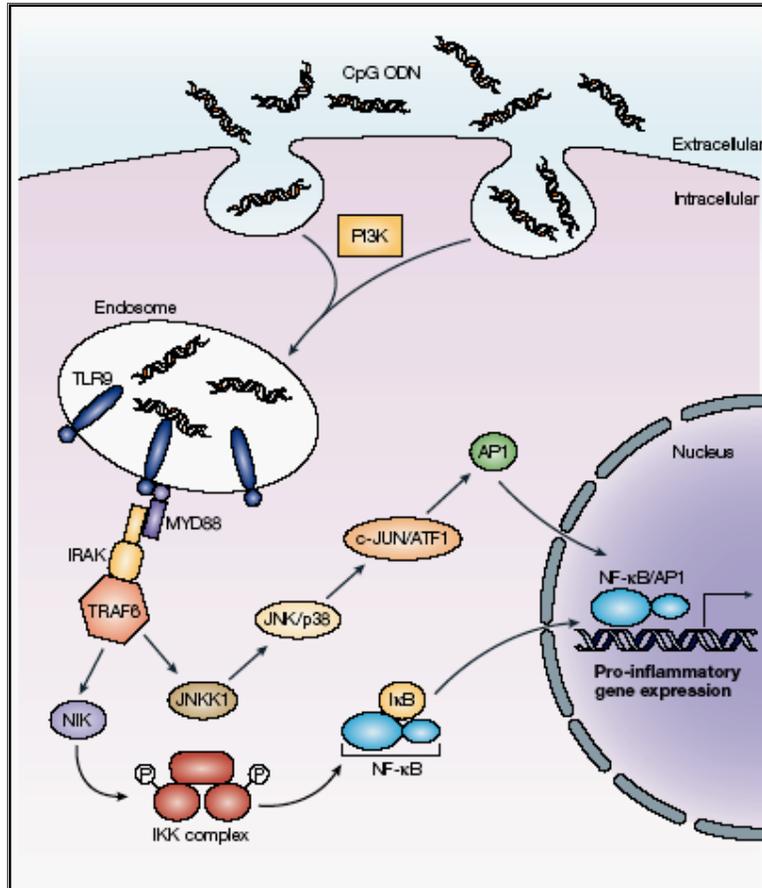


Fig. 14) Internalización de los CpG y su unión con TLR9 en vesículas endocíticas. Este reconocimiento activa a la célula y desencadena una cascada de señalización dependiente de MyD88 que concluye con la producción y secreción de citocinas pro-inflamatorias. Klinman, 2004.

Los motivos CpG tienen un efecto estimulador y mitogénico en células B humanas y murinas, induciendo secreción de inmunoglobulinas y resistencia a apoptosis inducida o espontánea. Los macrófagos son también fuertemente activados para producir citocinas tipo Th1. Los CpGs estimulan la activación y maduración de las células dendríticas a células presentadoras de antígeno, activan células NK humanas y murinas de forma indirecta para inducir la secreción de IFN- γ ; preferencialmente inducen la producción de IFN- γ por células T que apoya la secreción de anticuerpos IgG2a y facilitan el desarrollo de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno (CTLs) (Fig.15) (Krieg y Wagner, 2000; Klinman, 2004; Chu *et al*, 1997).

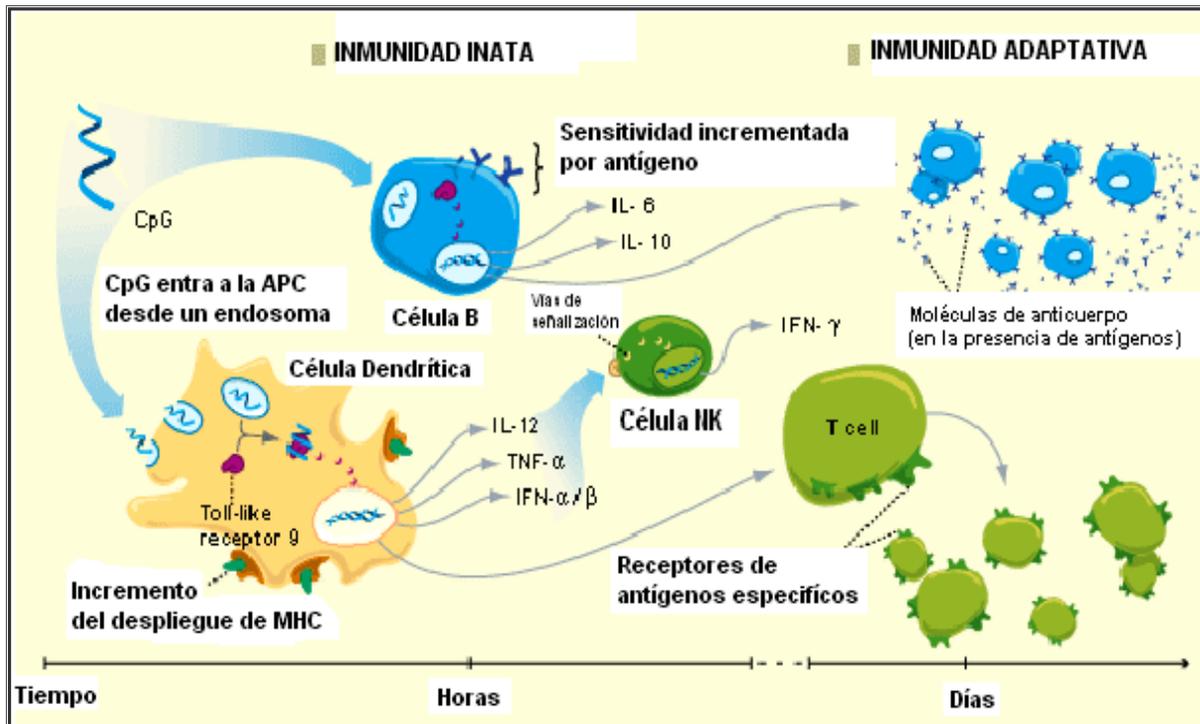


Fig. 15) Mecanismos de acción de los CpG en la activación de las células inmunes, y su participación tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. La mayor contribución es la activación celular que culmina con la producción y subsecuente secreción de citocinas tipo Th 1.

Los motivos CpG activan macrófagos y células dendríticas *in vitro* e *in vivo* para producir citocinas proinflamatorias como son TNF- α , IL-12, IL-1. Además activan a las células presentadoras de antígeno inmaduras (APC) para que maduren a células presentadoras de antígeno profesionales, capaces de activar células T “naive” para potenciar la respuesta inmune, con la secreción de citocinas que dirigen la respuesta inmune hacia Th1 se enriquece el microambiente y se orienta la respuesta inmune hacia la producción de citocinas Th1(Krieg, 2002). En ratones, la potente activación celular inmune innata por los CpG es suficiente para proteger y erradicar infecciones establecidas por patógenos intracelulares incluido *L. major* (Stacey y Blackwell, 1999). Probablemente los CpG influyen en la inmunidad adaptativa vía activación de las células dendríticas que proveen un ambiente polarizado Th1 en los órganos linfoides secundarios donde las células T son expuestas a las APCs en presencia de niveles altos de citocinas como IL-12 (Wagner, 2001).

En la leishmaniosis se ha encontrado que el uso de CpG-ODN como adyuvante conlleva a una protección, consiguiendo que su efecto inmunoestimulador potencie la respuesta inmune en modelos de vacunas. Stacey y Blackwell (1999) informaron que los CpG promovían la resistencia a la infección por *Leishmania* en ratones previamente inmunizados con los CpG y el antígeno soluble leishmanial (SLA). Por otra parte, Tewary y colaboradores (2004) informaron que células incubadas con CpG y antígeno recombinante leishmanial (rORFF) incrementan la producción de óxido nítrico, IFN- γ y de IgG2a, modulando así la infección por *L. donovani*. Sin embargo, no se ha estudiado si el DNA de *Leishmania* contiene motivos CpG capaces de estimular TLR9 y llevar a la activación celular, y si estos motivos poseen las mismas características atribuidas a los CpG – ODN; de ser así, el DNA del parásito podría ser utilizado como adyuvante en la leishmaniosis.

CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN

Existen pocos antecedentes de que el DNA de un parásito posea actividad inmunoestimuladora. Hasta ahora solo se ha analizado el DNA de los parásitos *Babesia bovis*, *T. cruzi* y *T. brucei*. Los resultados muestran que el DNA de estos parásitos posee propiedades mitogénicas para linfocitos B bovinos, que tiene capacidad para activar macrófagos bovinos y desencadenar la producción y secreción de citocinas como IL-12 y TNF- α , y que también impulsa la producción de óxido nítrico (NO) (Shoda *et al*, 2001).

Por otra parte, en los modelos murinos de la leishmaniosis, ha sido reportado que una respuesta inmune predominante tipo Th1 ayuda a la curación de la enfermedad, en tanto que una respuesta inmune de tipo Th2 está asociada con el progreso y severidad de la misma. Los CpG han mostrado revertir una respuesta Th2 inducida con HEL (lizosima de huevo de gallina) a una respuesta Th1 (Chu *et al*, 1997) lo que lo hace un excelente candidato para ser utilizado como adyuvante en enfermedades donde una respuesta Th1 sea benéfica para el enfermo.

En este trabajo se analizó si el DNA de *L. mexicana* posee la cantidad suficiente de CpG para activar al receptor TLR9 y llevar a cabo la producción de citocinas tipo Th1. Si el DNA de *Leishmania* es capaz de estimular esta respuesta se podría ir elucidando una posible vía mediante la cual este DNA pudiera ser utilizado como adyuvante para potenciar una respuesta celular Th1 y probablemente revertir una respuesta Th2 en la Leishmaniosis.

CAPITULO 3. HIPÓTESIS

El DNA de *L. mexicana* posee motivos CpG y al no estar metilados pueden ser reconocidos y activar al receptor TLR9 de macrófagos murinos. La activación de este receptor puede desencadenar una respuesta inmune caracterizada por la producción de citocinas como TNF- α e IL-12, que dirigen la respuesta inmune hacia Th1.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

- ❖ Analizar si el DNA de *L. mexicana* posee la cantidad suficiente de motivos CpG que sean capaces de activar al receptor TLR9 presente en macrófagos murinos.

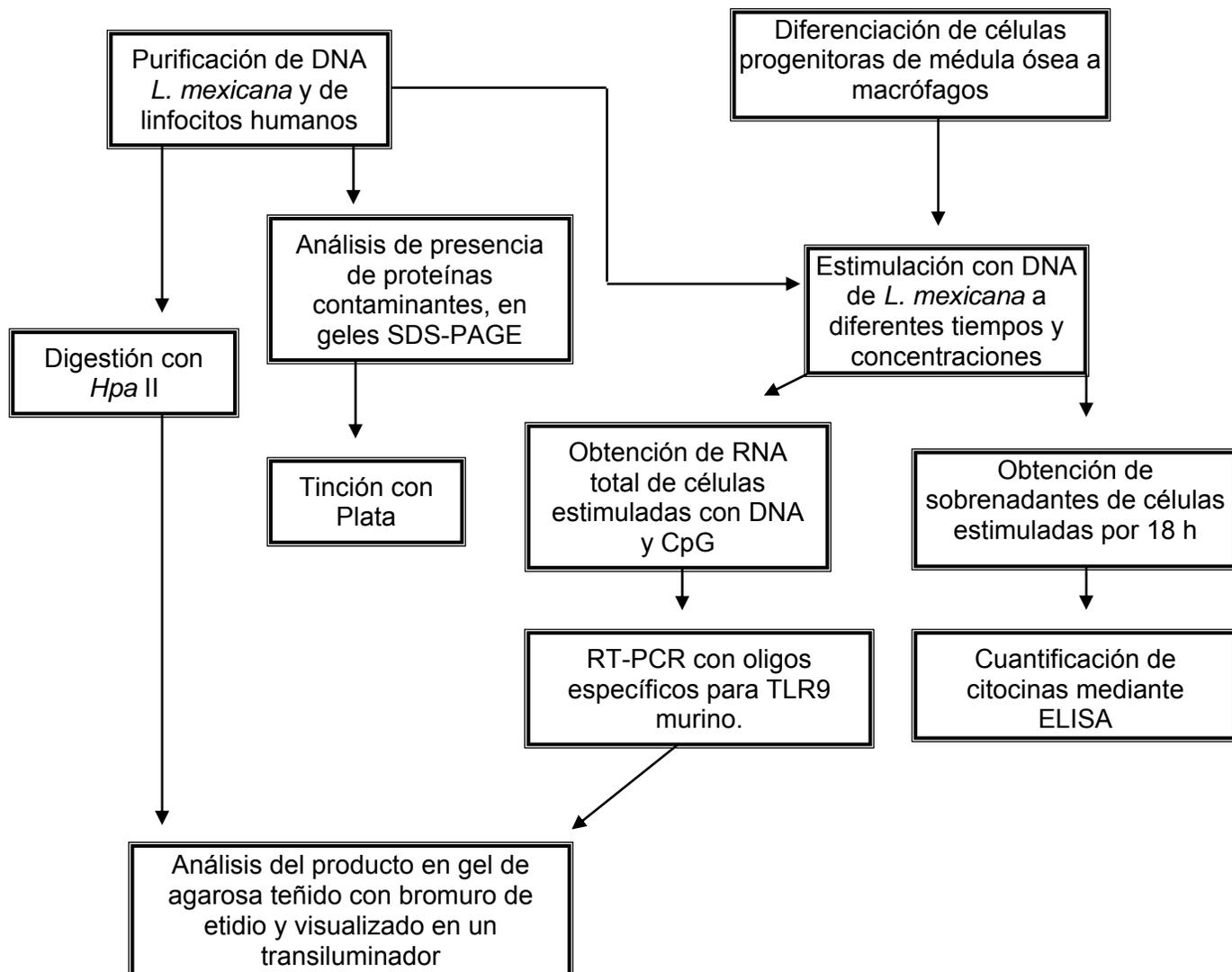
4.2. PARTICULARES

- Purificar DNA de *L. mexicana* para estimular la respuesta inmune innata a partir del receptor TLR9 en macrófagos murinos derivados de médula ósea.
- Analizar la presencia de motivos CpG en el DNA de *L. mexicana* mediante el uso de la enzima *Hpa* II.
- Analizar la posible presencia de proteínas contaminantes en el DNA extraído del parásito.

- Diferenciar células progenitoras de médula ósea de ratón a macrófagos.
- Buscar el tiempo y dosis óptima para la estimulación de TLR9 de macrófagos murinos.
- Analizar la sobreexpresión del RNA mensajero de TLR9 en macrófagos murinos estimulados con DNA del *Leishmania* mediante RT-PCR.
- Analizar la especificidad del receptor TLR9 utilizando como control negativo DNA de linfocitos humanos.
- Analizar si la activación del receptor TLR9 presente en macrófagos murinos por medio de los CPPS presentes en el DNA de *L. mexicana* lleva a la producción de citocinas que dirigen la respuesta hacia Th1 como TNF- α e IL-12 o del tipo Th2 como IL-10.

CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA

5.1. ESQUEMA METODOLÓGICO



- PARA CONOCER EL EQUIPO Y LOS REACTIVOS UTILIZADOS CONSULTAR LOS APÉNDICES CORRESPONDIENTES.

5.2. Obtención de Parásitos de *L. mexicana*.

Se utilizaron parásitos de *Leishmania mexicana mexicana* de la cepa "68" procedente de un paciente de Campeche con leishmaniosis cutánea localizada. Los parásitos fueron mantenidos en agar sangre y cultivados por 5 días en medio Schneider. Todos los parásitos utilizados fueron recuperados en forma de promastigotes y en fase metacíclica. Se lavaron con PBS y se lisaron con Trizol para extraer el DNA, el método se describe más adelante.

5.3. Purificación de DNA de *L. mexicana*[^].

Los parásitos fueron lavados con PBS y lisados con 1ml de Trizol por cada 5×10^5 parásitos. Se agitó 15 segundos y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 μ l de cloroformo por cada mililitro de Trizol y se agitó con vortex durante 45 segundos. Se dejó reposar durante 3 min y se centrifugó durante 15 min, 13,500 rpm a 4^oC. Se retiró la fase líquida y a la fase orgánica se le agregaron 500 μ l de etanol absoluto. Se agitó con vortex y se centrifugó a 13,500 rpm a 4^oC durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de una solución de citrato de sodio ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) 0.1M en etanol al 10%. Se dejó agitando durante 30 min a temperatura ambiente, se centrifugó durante 5 min a 4,500 rpm y 4^oC. El sobrenadante se decantó y el precipitado se resuspendió en EDTA 5 mM y proteinasa K a una concentración de 100 μ g/ml y se incubó toda la noche a 55^oC. Al siguiente día se dejó a temperatura ambiente durante 10 min, después se centrifugó a 4,500 rpm y 4^oC durante 10 min. El sobrenadante se retiró y el precipitado se resuspendió en 1ml de la solución de citrato de sodio 0.1 M en etanol al 10% y se dejó agitando durante 30 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 min a 4,500 rpm y 4^oC. Se eliminó el

[^]Todo el método se llevo a cabo bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo y utilizando reactivos libres de contaminantes, siguiendo las instrucciones de manufactura.

sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1.5 ml de etanol al 75%. Se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 min a 4,500 rpm y 4°C. Se decantó el sobrenadante y se secó el precipitado al vacío. Se resuspendió en 30 µl de agua destilada estéril y se calentó durante 15 min a 60°C. Se cuantificó en un espectrofotómetro para determinar la concentración total. Se guardó a -20°C para su uso posterior.

5.4. Purificación de DNA de linfocitos humanos.

Las células se obtuvieron de sangre periférica humana de sujetos sanos. Se pasó la sangre por un gradiente de Ficoll. Se obtuvieron las células de la interfase y se lavaron dos veces con PBS y se contaron. Se lisaron las células con Trizol, 10 millones de células por 1 ml de Trizol para extraer el DNA utilizando el mismo método con el que se extrajo el DNA del parásito. El DNA de estos linfocitos se utilizó como control negativo en los experimentos.

5.5. Digestión con *Hpa* II.

Para verificar la presencia de CpG en el DNA de *L. mexicana*, se realizó una digestión mediante una enzima de restricción que corta el DNA en regiones que contienen la secuencia CC↓GG. Una vez que se obtuvo el DNA, se tomaron 5 µl, tanto del DNA de linfocitos humanos como del DNA del parásito y se le adicionó 1 µl de buffer, 1 µl de la enzima *Hpa* II y 3 µl de agua inyectable estéril. Se dejó 18 h a 37°C, después se analizó el producto de la digestión en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio al 10% y se visualizó en un transiluminador.

5.6. Análisis de la presencia de proteínas en el DNA de *L. mexicana*.

- **Preparación del gel**

Para descartar la presencia de proteínas en el DNA extraído de *L. mexicana* se realizó una prueba por el método de tinción con plata. Se limpiaron: vidrios, peines, separadores con alcohol. Se levantaron ambas placas y se colocaron en la cámara de electroforesis. Se agregó agua para verificar que estuviera bien ensamblada y después se secó con papel filtro. Se preparó el gel SDS-PAGE al 10%. Se agregó rápidamente el gel separador con la ayuda de una pipeta Pasteur limpia, una vez agregado se colocaron unas gotas de alcohol isopropílico para deshacer las burbujas que se hicieron al colocarlo y se dejó polimerizar. Una vez que el gel polimerizó, se lavó con H₂O bidestilada para retirar el alcohol y se dejó secar. Después se adicionó el gel concentrador rápidamente y se colocó el peine. Una vez que el gel concentrador polimerizó se retiró el peine. Se lavó con agua bidestilada y se secó. Se colocó el gel en la cámara. Se agregó el amortiguador de corrida 1X. Se colocaron los marcadores de peso molecular en el primero y en el último carril y en los carriles siguientes las muestras a analizar. Se conectó a la fuente de poder a 70 voltios hasta que las muestras se alinearon en el gel concentrador. Después se incrementó el voltaje hasta 100-120 voltios.

- **Preparación de las muestras**

Se descongelaron las muestras de DNA, del lisado del parásito y la proteinasa K. Se colocaron en tubos Eppendorf limpios y estériles 20 µl del DNA, 1 µl de proteínas del parásito que correspondían a 11 µg, 10 µl de la proteinasa K. A todas las condiciones se les adicionaron 5 µl del buffer de muestra 2X y en otro tubo se colocaron 5 µl del amortiguador de muestra solo. Las muestras se pusieron a hervir a 96°C durante 3 min.

- **Tinción con plata.**

Una vez corrido el gel se colocó en una solución fijadora por 30 min. Posteriormente se lavó 3 veces con agua bidestilada a intervalos de 10 min. Se preparó la solución de tinción, la cual se mezcló en un vortex durante unos segundos. Se retiró el agua bidestilada y se agregó la solución de tinción con plata. Se mezcló durante algunos minutos hasta que aparecieran las proteínas en el control, teniendo mucho cuidado de que no se sobretiera el gel. Una vez que todas las muestras eran visibles se detuvo la reacción con ácido acético.

5.7. Reconstitución de CpG.

Como control positivo se utilizaron CpG ODN (oligodeoxinucleótidos) sintéticos de HyCult Biotechnology (Mouse CpG DNA, Catalog No.HC4033). Los CpG ODN se encontraban liofilizados. Se reconstituyeron en 100 µl de agua inyectable y se hicieron alícuotas de 5 µl y se guardaron a -70⁰C. Las alícuotas se usaron una sola vez, ya que el congelamiento repetido favorece que los CpGs pierdan su actividad inmunoestimuladora.

5.8. Ratones.

Se utilizaron ratones sanos de la cepa BALB/c de ocho semanas de edad. Los ratones fueron provistos por el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. Hospital General de México.

5.9. Obtención de Macrófagos de Médula Ósea.

Para la obtención de macrófagos se sacrificó un ratón por dislocación cervical, se cortaron las extremidades inferiores y se colocaron en una solución de PBS/Gentamicina. Se limpiaron quitando la piel y retirando todo el músculo con ayuda de una navaja de bisturí, dejando solo los huesos. Se colocó el fémur y la tibia en otra caja Petri que contenía también solución de PBS/Gentamicina. En una campana de flujo laminar estéril se cortaron los extremos de los huesos y la médula ósea se extrajo por presión mediante inyección de PBS. Las células obtenidas se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min a 4⁰C. Se sembraron en cajas Falcón con medio DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino, L-Glutamina y M-CSF murino recombinante para diferenciar las células progenitoras a macrófagos. Se mantuvieron durante 7 días a 37⁰C y 5% de CO₂. Después las células adheridas a las cajas Falcon se desprendieron con PBS frío, se contaron en una cámara de Neubauer y se colocaron en placas de 24 y 6 pozos para ser estimuladas en proporción de un 1 x 10⁶ células por mililitro de medio para cada condición.

5.10. Estimulación de Macrófagos de Médula Ósea.

Para observar el momento en que el receptor presentaba mayor activación se realizó una cinética de tiempo con los macrófagos estimulados con 10 µg de DNA de *L. mexicana*, 3 µg de CpG ODN y una condición sin estimular. Los tiempos de estimulación utilizados fueron 1 hora, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h y 18 h. Con la finalidad de encontrar la concentración óptima para estimular al receptor TLR9, se realizó una curva de concentración estimulando durante 3 h con 100 ng, 1 µg, 10 µg y 50 µg de DNA de *L. mexicana* y 1 µg, 3 µg, 6 µg y 9 µg para los CpG ODN. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de sulfato de polimixina B para evitar respuesta por una posible contaminación con LPS.

- **PARA EL RT – PCR**

Se colocaron 1×10^6 macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) por mililitro para cada condición en medio RPMI completo con 10 μg de sulfato de polimixina B. Se estimularon con 10 μg de DNA de *L. mexicana*, 3 μg de CpG como control positivo, 10 μg de DNA humano (como control negativo) y una condición sin estimular. Después de 3 h se retiró el sobrenadante y las células adheridas fueron lisadas con 1 ml de Trizol. Se extrajo el RNA total de las células y se hizo el RT-PCR con oligonucleotidos específicos para TLR9 murino. El producto se analizó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y fue visualizado en un transiluminador.

- **PARA CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS**

Se estimularon 1×10^6 células/ml y se colocaron en placas de 24 pozos para cada condición adicionando 10 μg de sulfato de polimixina B, con 10 μg de DNA de *L. mexicana*, 3 μg de CpG ODN como control positivo, 10 μg de DNA humano como control negativo y una condición sin estimular. Se dejaron durante 18 h a 37°C y 5% de CO_2 . Después los sobrenadantes fueron recolectados y puestos en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se guardaron a -70°C hasta hacer el análisis para su cuantificación por ELISA.

5.11. Purificación del RNA total.

Las células fueron lisadas con 1 ml de Trizol, el cual fue puesto en un tubo Eppendorf de 1.5 ml para cada condición. Los tubos se agitaron y se dejaron 5 min a temperatura ambiente. Después se adicionaron 200 μl de cloroformo a cada tubo y se agitaron con vortex. Se dejaron 3 min a temperatura ambiente y se

centrifugaron durante 15 min a 13,500 rpm y 4⁰C. La fase orgánica se desechó y la fase acuosa se pasó a otro tubo nuevo al cual se adicionaron 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA. Se dejaron durante 10 min a temperatura ambiente. Después se centrifugaron 10 min a 13,500 rpm y 4⁰C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el RNA con 1 ml de etanol al 75%. Se agitaron con vortéx y se centrifugaron durante 10 min a 10,600 rpm y 4⁰C. Se secaron al vacío y después se resuspendieron en 20 µl de agua inyectable estéril. Se calentaron durante 10 min a 60⁰C, después se pusieron en hielo y se tomaron 2 µl los cuales se colocaron en 98 µl de agua inyectable para cuantificarlos en el espectrofotómetro.

5.12. RT-PCR

Para observar las diferencias de expresión de TLR9 a través del RNA mensajero se realizó RT-PCR (Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa) con el kit SuperScript III One-Step RT-PCR System. Este sistema permite hacer la transcripción reversa y el PCR en un solo paso ya que posee las enzimas para ambos pasos, Super Script (RT) y la Taq DNA polimerasa (PCR). Se colocaron en tubos de 100 µl nuevos y estériles:

- 25 µl del Buffer 2X Reaction Mix
- 1 µl del Oligo para TLR9 sentido (5´)
- 1 µl del Oligo para TLR9 anti-sentido (3´)
- 1 µl del Oligo para HPRT sentido (5´)
- 1 µl del Oligo para HPRT anti-sentido (3´)
- "X" µl de RNA (correspondiente a 1 µg)
- 1 µl de la enzima SuperScript III RT/ Platinum *Taq* Mix
- Agua bidestilada (para aforar a 50 µl)

Los tubos se mezclaron con vortex y se centrifugaron 30 segundos a 13,000 rpm, después se colocaron en el termociclador en el programa que consiste del siguiente ciclo:

| | | | | | | |
|--|------|----------|------|------|------|----------|
| | | 35 veces | | | | |
| 50.0 | 94.0 | 94.0 | 60.0 | 72.0 | 72.0 | 4.0 |
| 30:00 | 2:00 | 0:40 | 1:00 | 1:00 | 7:00 | α |
| } RT (pre PCR) | | | | | | |

OLIGOS UTILIZADOS:

TLR9 sentido: 5' GCA CAG GAG CGG TGA AGG T 3'

TLR9 antisentido: 5': GCA GGG GTG CTC AGT GGA G 3'

HPRT sentido: 5': GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G 3'

HPRT antisentido: 5': GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT 3'

5.13. Cuantificación de citocinas por ELISA

Para el análisis de secreción de las citocinas TNF- α , IL-12_{p40} e IL-10 en los sobrenadantes, se utilizó un kit comercial. Para cada citocina se utilizaron las siguientes concentraciones de anticuerpo de captura: 2 μ l/ml para TNF-alfa a pH 6, 1 μ l/ml para IL-12_{p40}, 2.5 μ l/ml para IL-10 a pH 9. El anticuerpo se diluyó en el buffer de unión con el pH correspondiente. Se colocaron 50 μ l por pozo, se tapó la placa y se dejó a 4⁰C toda la noche. Se lavaron las placas cuatro veces con una solución PBS 1X y 0.01% de Tween 80. Se bloqueó la placa agregando 200 μ l por pozo de la solución bloqueadora dejándola 30 min a temperatura ambiente. Después se lavó la placa 3 veces. Se colocaron 100 μ l por pozo tanto de la curva estándar con la citocina recombinante, como de las muestras de los sobrenadantes a analizar y se incubó a 4⁰C toda la noche. La curva estándar consiste de una serie de diluciones al doble de la citocina recombinante y sirve como control positivo. Se lavó la placa 4 veces y se colocó el anticuerpo de

detección: 2 μ l/ml para TNF- α ; 0.5 μ l/ml para IL-12; 1 μ l/ml para IL-10. Se diluyeron en albúmina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20 y se agregaron 100 μ l por pozo. Se incubó 1 h a temperatura ambiente. Se lavó la placa 6 veces. Se colocaron 100 μ l de estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida 1:2000 en albumina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20 en cada pozo. Se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Se lavó la placa 8 veces. Después se agregaron 100 μ l de la solución reveladora compuesta por un regulador de sustrato y sustrato de fosfatasa. La placa fue leída en un lector de ELISA (312e BIO-TEK Instruments) a una longitud de onda de 405 nm.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS

6.1. Digestión con *Hpa* II y presencia de motivos CpG en el DNA de *L. mexicana*.

El DNA de *L. mexicana* fue digerido con la enzima de restricción *Hpa* II que corta en sitios específicos CCGG de DNA no metilado. Este experimento sirvió como control para saber si el DNA de *L. mexicana* posee motivos CpG que pudieran ser reconocidos por TLR9. En la figura 16 se puede observar que el DNA del parásito fue digerido por la enzima (carril 2), mientras que, el DNA de linfocitos humanos no (carril 4). Esto quiere decir que el DNA del parásito no está metilado y que contiene motivos CpG a diferencia del humano que al ser metilado no es reconocido por la enzima.

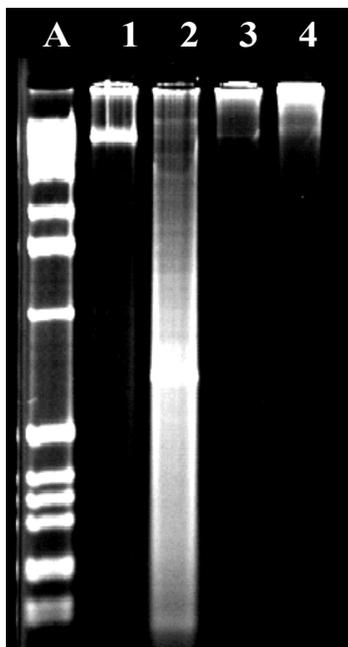


Fig. 16) DNA de *L. mexicana* y de linfocitos humanos, digeridos con la enzima de restricción *Hpa* II. En los carriles se observa: A) Marcador Molecular 1Kb ladder, 1) DNA del parásito sin digerir, 2) DNA del parásito digerido con la enzima *Hpa* II, 3) DNA humano sin enzima y 4) DNA humano con enzima.

6.2. Análisis de la presencia de proteínas contaminantes en el DNA de *L. mexicana* por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

Proteínas coloridas naturalmente tales como mioglobina, hemoglobina, ferritina y citocromo C pueden ser observadas directamente en geles iluminados con luz en el espectro visual. Sin embargo, la visualización de otras proteínas requiere del uso de colorantes o tinción. Las tinciones orgánicas fueron las primeras utilizadas para la detección de proteínas en geles. La tinción basada en metales, tal como la tinción con plata, es ampliamente usada por su alta sensibilidad. Esta tinción se requiere para estudios en los cuales la pureza de la proteína es importante o en la cual hay la necesidad de monitorear trazas de proteínas.

Para el análisis de proteínas contaminantes en el DNA de *Leishmania* se utilizaron geles SDS-PAGE al 10% y se realizó la tinción con plata para verificar que la activación del receptor TLR9 y la producción de citocinas únicamente se debían al estímulo con DNA del parásito y no por la presencia de proteínas. En la figura 17 se observa en el carril 2 que el DNA de *L. mexicana* no contiene proteínas que pudieran estar estimulando la producción de citocinas, ni restos de la proteinasa K (carril 3) que se utilizó para la extracción del DNA, por lo que podemos decir que la pureza del DNA utilizado fue alta y satisfactoria. El carril posee un color amarillo posiblemente por la reacción inespecífica de los reactivos que se utilizaron, sin embargo, no se detectan trazas de proteínas.

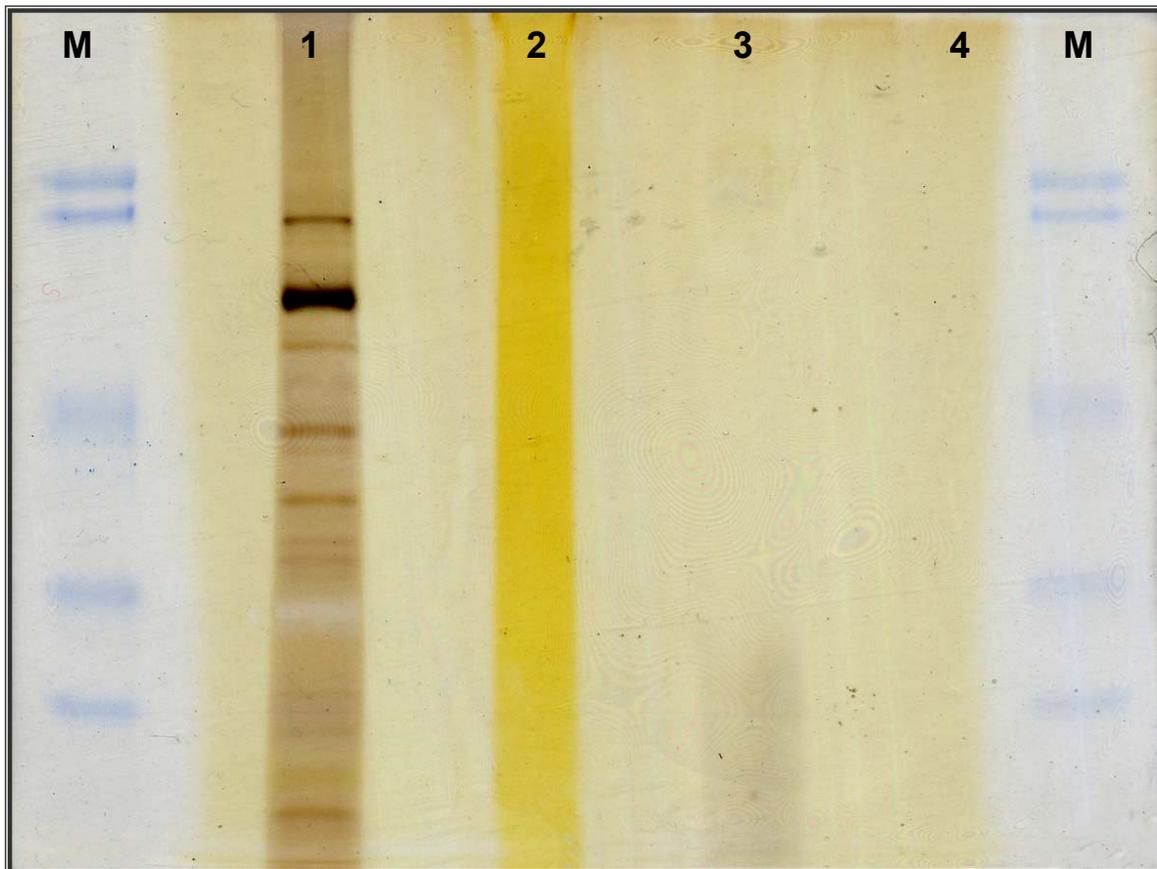


Fig. 17) Gel SDS-PAGE al 10% teñido con plata. Carriles: M) Marcador de peso molecular de bajo rango de BIO-RAD, 1) Lisado de *L. mexicana*, 2) DNA de *L. mexicana*, 3) Proteinasa K, 4) Amortiguador de muestra.

6.3. Cinética de la activación de TLR9.

Con el propósito de optimizar la expresión del mRNA de TLR9 se realizó una cinética para observar el mejor momento en la activación del receptor. Macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) de ratones BALB/c sanos fueron estimulados con 10 µg de DNA de *L. mexicana*, 3 µg de CpG, y una condición sin estimular, durante 1 hora, 2 h, 3 h, 4 h (Fig 18), 6 h, 7 h y 18 h (Fig. 20). Las concentraciones utilizadas fueron escogidas de reportes previos (Krieg *et al*, 1998; Kerkmann *et al*, 2003; Hornung *et al*, 2002; Yi *et al*, 2001). Después de la estimulación, las células fueron lisadas con Trizol y se realizó RT-PCR. El producto se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% y se realizó densitometría a las bandas observadas para analizar las diferencias de expresión.

En los resultados (Fig. 18) se observa que el mejor tiempo para estimular a las células con el DNA del parásito es de 2 a 4 horas, ya que la expresión del mRNA de TLR9 se mantiene durante ese tiempo, pero empieza a decaer después de la cuarta hora. En la figura 20, no se observan diferencias en las células estimuladas con DNA de *L. mexicana* durante 6, 7 y 18 h. Mientras que la expresión del mRNA de TLR9 en las células estimuladas con los CpG ODN decae a partir de la tercera hora, por lo que el mejor tiempo para estimular con los CpG resultó ser el de 2 horas. En estas células, la expresión del mRNA de TLR9 permanece igual a partir de la cuarta y hasta las 18 h oras de estímulo (Fig. 19 y 20).

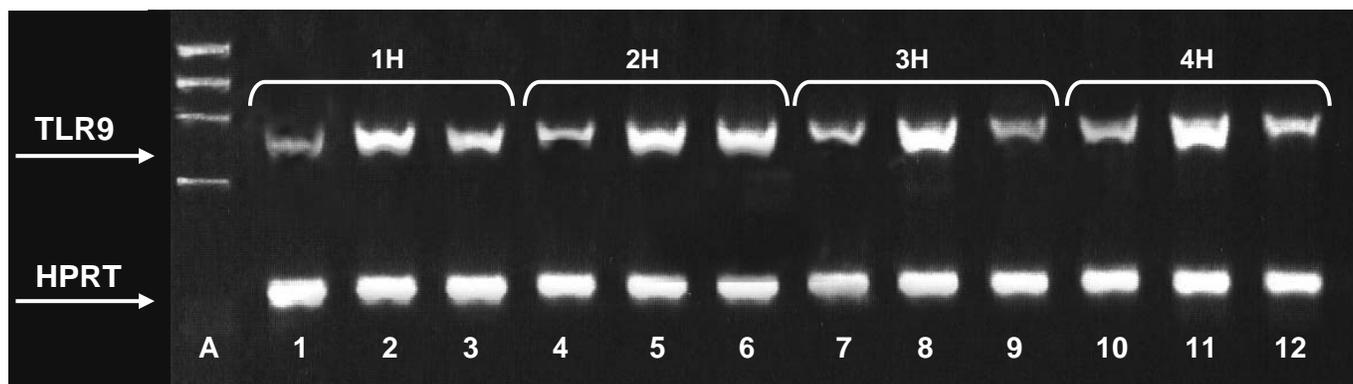


Fig. 18) Producto de la RT-PCR de las células estimuladas a diferentes tiempos. En los carriles se observa: A) Marcador molecular Φ X174, 1) Basal (medio), 2) 10 μ g de DNA de *L. mexicana*, 3) 3 μ g de CpG ODN, 4) Medio, 5) 10 μ g de DNA de *L. mexicana*, 6) 3 μ g de CpG ODN, 7) Medio, 8) 10 μ g de DNA de *L. mexicana*, 9) 3 μ g de CpG ODN, 10) Medio, 11) 10 μ g de DNA de *L. mexicana*, 12) 3 μ g de CpG ODN.

En la densitometría se pueden observar más claramente las diferencias ante ambos estímulos a diferentes tiempos de estímulo (figura 19). El tiempo óptimo para la expresión del receptor con el estímulo de DNA del parásito fue de 2 a 4 h, mientras que para los CpG fue de 1 a 2 h. El resultado y la densitometría mostrados ejemplifican un experimento representativo de 3 con los que se obtuvo el mismo resultado. En la figura. 20 se muestra el resultado del estímulo durante 6, 7 y 18 h, donde ya no se observan diferencias entre los tiempos de ambos estímulos, por lo que ya no se realizó la densitometría.

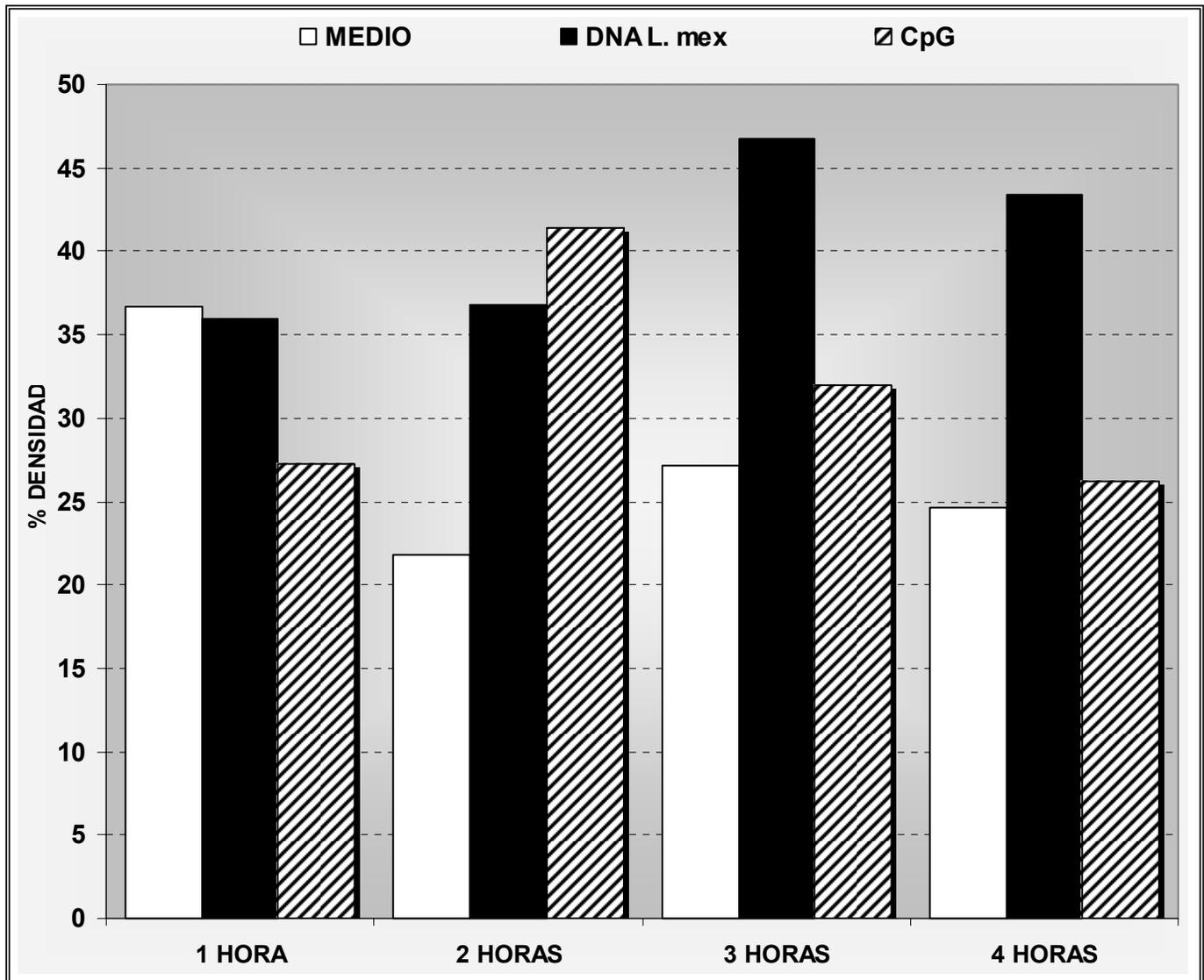


Figura 19) Densitometría del producto de la expresión de la RT-PCR de las células estimuladas a diferentes tiempos. Se observa el porcentaje de densidad de las bandas producto de la RT-PCR (figura 18). Las barras blancas corresponden a las células sin estimular; las barras negras, a las células estimuladas con DNA del parásito y las barras rayadas a las células estimuladas con los CpG ODN. Debajo de cada grupo de barras se muestran los tiempos de estimulación.

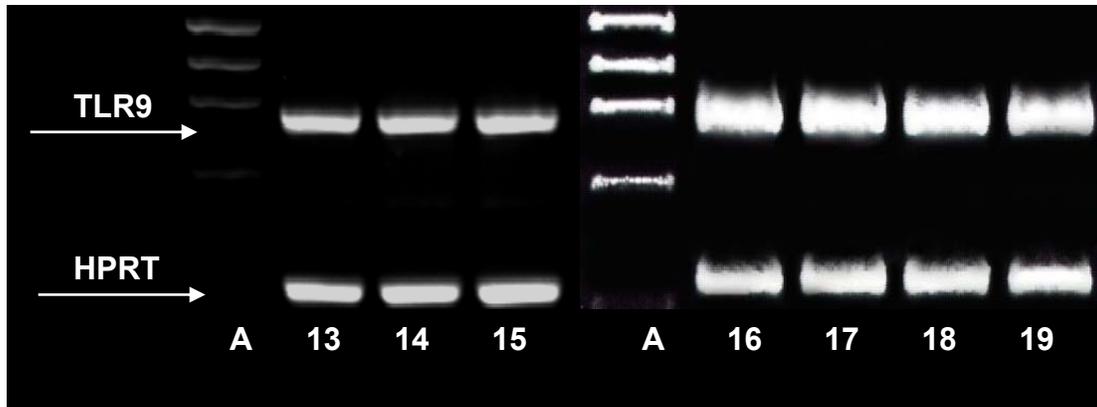


Fig. 20) Producto de la RT-PCR de las células estimuladas durante 6, 7 y 18 h. En los carriles se observa: A) MM Φ X174, 13) Medio, 14) 10 μ g de DNA de *L. mexicana*, 15) 3 μ g de CpG, 16) Medio, 17) 10 μ g de DNA de *L. mexicana*, 18) Medio, y 19) 10 μ g de DNA de *L. mexicana*.

Estos resultados demuestran que después de las 4 h, la expresión del mRNA de TLR9 se mantiene al mismo nivel que el de las células no estimuladas. Como el estímulo con los CpG empieza a decaer después de las 4 h, no se utilizó para el estímulo de 7 y 18 h. Por esto se concluye que el tiempo óptimo de estimulación con DNA de *L. mexicana* para la expresión de TLR9 es de 2 a 3 h.

6.4. Concentración óptima de DNA de *L. mexicana* y CpG ODN para la activación del receptor TLR9.

Una vez conocido el tiempo de estimulación óptimo se realizó una curva de concentración para encontrar la mejor concentración de DNA de *Leishmania mexicana* y de CpG para activar la expresión del receptor TLR9, con los diferentes estímulos durante 3 h con 100 ng, 1 µg, 10 µg y 50 µg de DNA de *L. mexicana* y con 1 µg, 3 µg, 6 µg y 9 µg de CpG ODN. El producto se analizó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y se visualizó en el transiluminador.

La concentración óptima para estimular a las células con los CpG ODN, fue de 1 y 3 µg (Fig. 21). Si bien todas las concentraciones activaron la expresión de TLR9 con respecto a las células que no fueron estimuladas, en la densitometría de los resultados se observa que a mayor concentración de CpG disminuye la expresión del mRNA de TLR9 (Fig. 22). Esto podría deberse a que las concentraciones mayores de CpG posiblemente son un sobreestímulo para la célula y ésta entra en anergia. En la figura 23, los resultados muestran que la concentración óptima para activar la expresión del mRNA de TLR9 es de 10 µg de DNA de *L. mexicana*, sin embargo, se nota una clara estimulación desde 1 µg de DNA (Fig. 24). Esto quiere decir que 1 µg de DNA de *L. mexicana*, posee la cantidad suficiente de motivos CpG para activar al receptor TLR9.

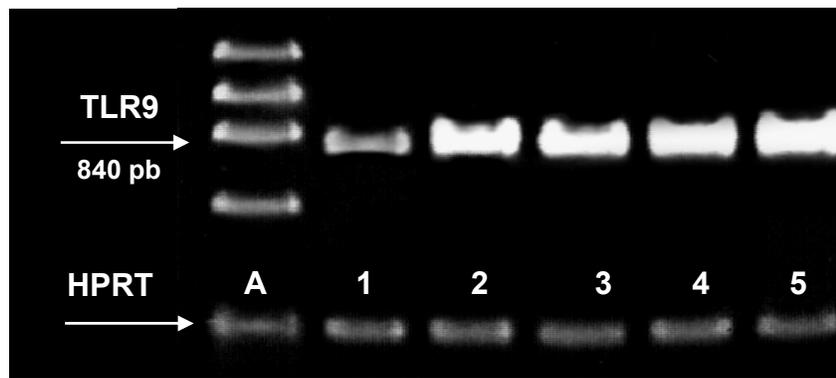


Fig. 21) Producto de la RT-PCR de las células estimuladas con diferentes concentraciones de CpG. En los carriles se observa: A) MM Φ X174, 1) Medio, 2) 9 μ g de CpG, 3) 6 μ g de CpG, 4) 3 μ g de CpG, y 5) 1 μ g de CpG. Las bandas de arriba corresponden a TLR9 (840 pb), mientras que las de abajo son las del control de carga HPRT:

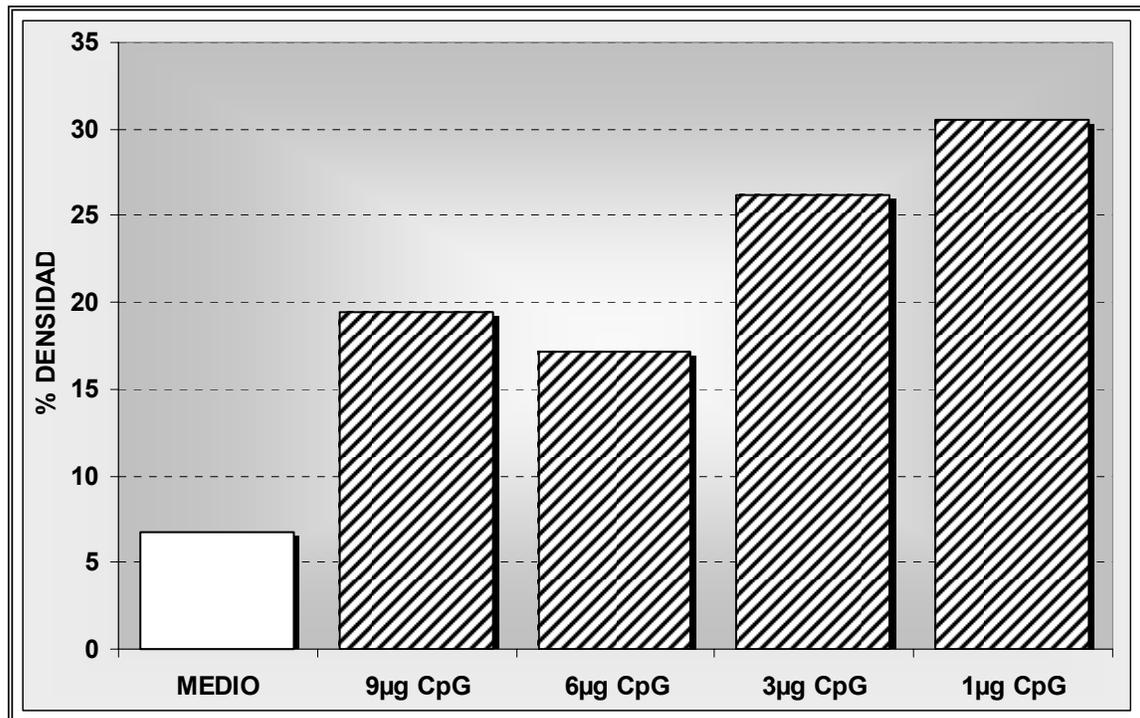


Fig. 22) Análisis de la densidad de las bandas producto de la RT-PCR de las células estimuladas con diferentes concentraciones de CpG. La barra blanca representa a las células sin estimular, las barras rayadas representan a las células estimuladas con diferentes concentraciones de CpG. Las concentraciones utilizadas fueron: 9 μ g, 6 μ g, 3 μ g y 1 μ g respectivamente, y se muestran debajo de cada barra.

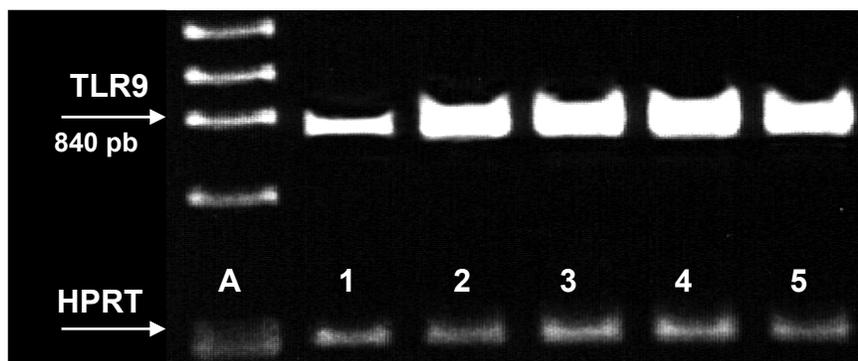


Fig. 23) Producto de la RT-PCR de las células estimuladas con diferentes concentraciones de DNA de *L. mexicana*. En los carriles del gel se observa: A) MM Φ X174, 1) Medio, 2) 100 ng de DNA, 3) 1 μ g de DNA, 4) 10 μ g de DNA, y 5) 50 μ g de DNA de *L. mexicana*.

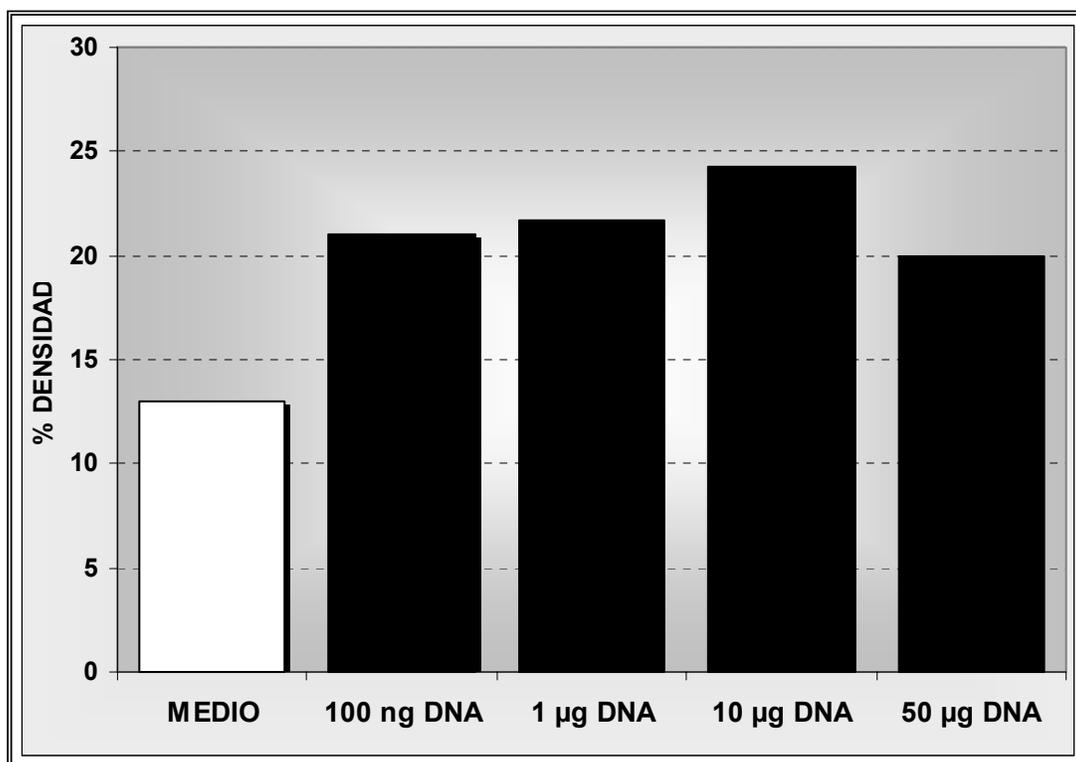


Fig. 24) Densitometría de las bandas del producto de la RT-PCR de las células estimuladas con diferentes concentraciones de DNA de *L. mexicana*. La barra blanca corresponde a las células sin estimular, las barras negras a las células estimuladas con 100 ng, 1 μ g, 10 μ g y 50 μ g de DNA del parásito. Las concentraciones se muestran debajo de cada barra.

Para fortalecer los resultados anteriores, se realizó otro experimento con las condiciones anteriores juntas en un mismo experimento para poder comparar los estímulos.

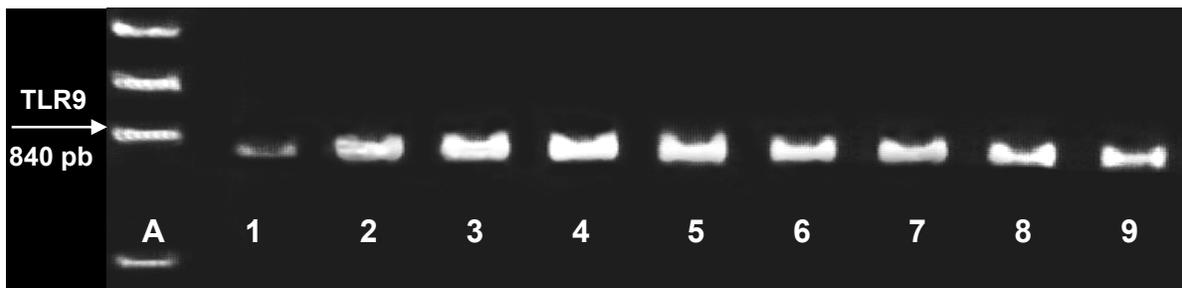


Fig. 25) Producto de la RT-PCR de la curva de concentración visualizado en un gel de agarosa al 1.5 %. En los carriles se observa: A) MM Φ X174, 1) Medio, 2) 100 ng de DNA de *L. mexicana*, 3) 1 μ g de DNA de *L. mexicana*, 4) 10 μ g de DNA de *L. mexicana*, 5) 50 μ g de DNA de *L. mexicana*, 6) 1 μ g de CpG ODN, 7) 3 μ g de CpG ODN, 8) 6 μ g de CpG ODN, 9) 9 μ g de CpG ODN.

En los resultados se demuestra nuevamente que el DNA de *L. mexicana* estimula la expresión del mRNA de TLR9 presente en los macrófagos murinos (Fig. 25). Esta expresión es notoria desde 100 ng de DNA pero es mayor con 10 μ g de DNA del parásito. Las diferencias entre los estímulos se observan con más claridad en la densitometría de las bandas del producto de la RT-PCR (Fig. 26). También se observa nuevamente que en el estímulo con los CpGs, a mayor concentración disminuye la expresión del mRNA de TLR9 (Fig. 26).

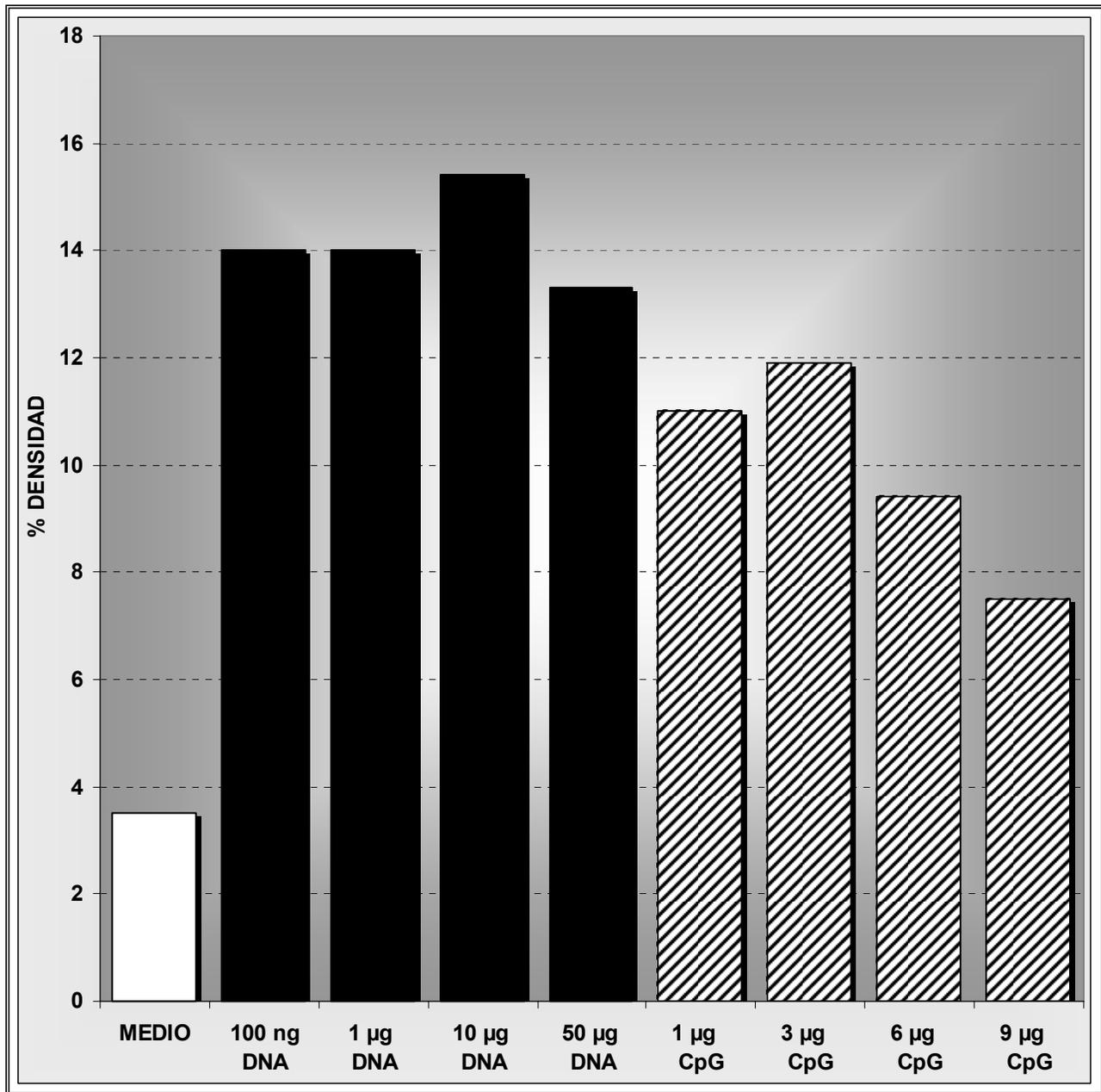


Fig. 26) Densitometría del producto de la RT-PCR de la curva de concentración. Se analizó la densidad de las bandas de la figura 25. La barra blanca corresponde a las células sin estimular; las barras negras, a las células estimuladas con 100 ng, 1 µg, 10 µg y 50 µg de DNA del parásito respectivamente. Las barras rayadas corresponden a las células estimuladas con 1 µg, 3 µg, 6 µg y 9 µg de CpG, respectivamente. Las concentraciones se muestran debajo de cada barra.

6.5. Confirmación de la especificidad de la expresión TLR9 inducida por el DNA de *L. mexicana*.

Para comprobar la especificidad de TLR9 con respecto a su ligando, se estimularon células con 10 µg de DNA del parásito como control positivo y con 10 µg de DNA de linfocitos humanos como control negativo. Las células se estimularon durante 3 horas y después se realizó RT-PCR y el producto se visualizó en un gel de agarosa al 1.5%.

En los resultados se observa que el DNA del parásito induce la expresión del receptor TLR9 y que el DNA humano prácticamente no modifica ésta expresión (Fig. 27). En la densitometría se observa la mayor expresión en las células estimuladas con los CpG que es el ligando específico de TLR9, sin embargo, el estímulo con el DNA del parásito es muy similar al del ligando reconocido para TLR9 (Fig. 28). Con este resultado se confirma que el DNA de *L. mexicana* es reconocido por el TLR9 presente en los macrófagos murinos.

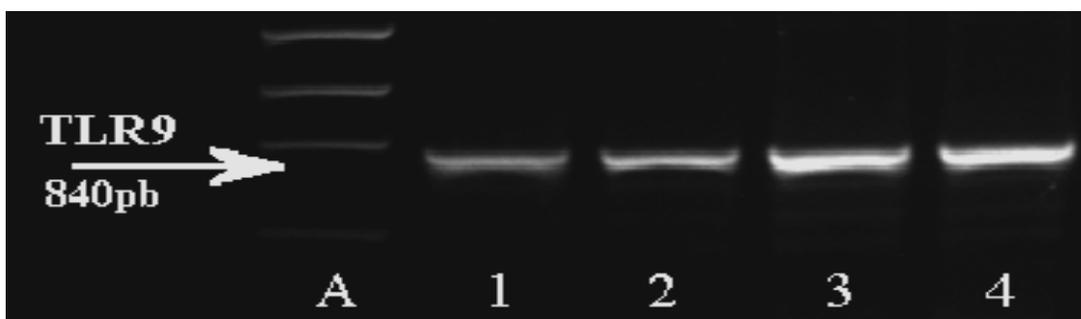


Fig. 27) Producto de la RT-PCR del análisis de la especificidad de TLR9. En los carriles se observa: A) MM ΦX174, 1) Medio, 2) 10 µg de DNA de linfocitos humanos, 3) 3 µg de CpG, 4) 10 µg de DNA de *L. mexicana*.

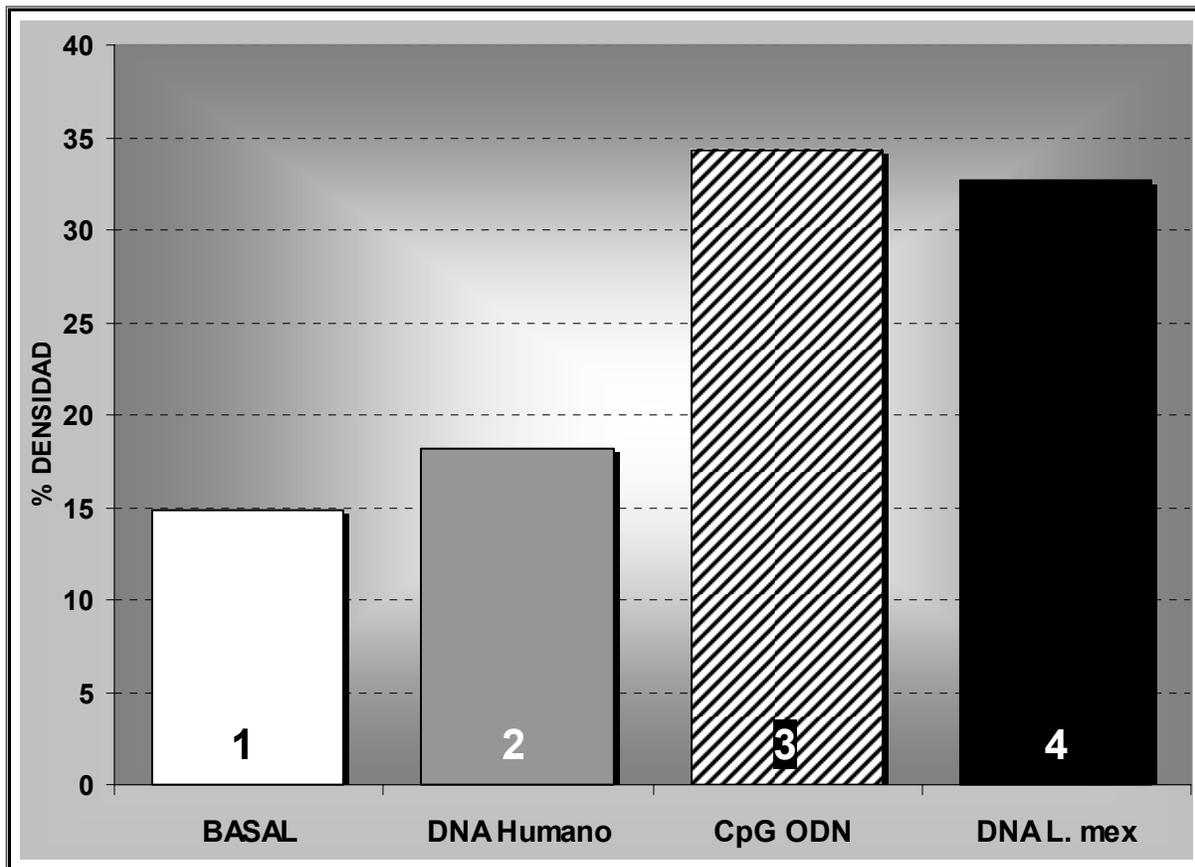


Fig. 28) Densitometría de las bandas producto de la RT-PCR de células estimuladas con DNA de *L. mexicana*. La barra Blanca (1) representa a las células sin estimular; la barra Gris (2) a las células estimuladas con DNA humano; la barra Rayada (3) a las células estimuladas con CpG, y la barra Negra (4) a las células estimuladas con DNA de *L. mexicana* Los números corresponden a las bandas del producto de la RT-PCR de la figura 27.

6.5. Producción y secreción de citocinas.

Se analizó si el DNA de *L. mexicana* inducía la activación de una respuesta inmune caracterizada por la producción de citocinas que dirigen la respuesta inmune hacia Th1 como TNF- α e IL-12 y no de una respuesta tipo Th2, caracterizada por citocinas como IL-10. Se estimularon macrófagos derivados de médula ósea durante 18 h con 10 y 20 μ g de DNA de *L. mexicana*, 3 μ g de CpG, 10 μ g de DNA de linfocitos humanos y una condición sin estimular. Se recolectaron los sobrenadantes de las células estimuladas para cuantificar la secreción de las citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10 por el método de ELISA. Se hicieron varios experimentos, cada uno por triplicado para cada citocina. El número de experimentos se especifica en la gráfica correspondiente a cada citocina (Fig.29, 30 y 31). Todos los experimentos se hicieron al mismo tiempo en la misma placa para las 3 citocinas y por lo tanto se leían el mismo día obteniendo así el mínimo margen de error al manipular.

6.5.1 Producción de IL-10

En los modelos murinos de leishmaniosis se ha establecido que una respuesta Th2 favorece el deterioro del hospedero. Para comprobar que el DNA de *L. mexicana* no estimulaba una respuesta Th2 se analizó la producción de IL-10 proveniente de los macrófagos murinos estimulados. En la Figura 29 y tabla 2 se muestra la cuantificación de la citocina IL-10 en los sobrenadantes recolectados de las células estimuladas. En los resultados se observó que el DNA del parásito no induce la producción de IL-10 a una concentración de 10 μ g, sin embargo, una concentración de 20 μ g induce una mínima producción de la citocina, probablemente como regulador en respuesta a las concentraciones altas de TNF- α producidas por el macrófago en respuesta al estímulo (Fig. 31). Las células sin estímulo y las estimuladas con 10 μ g de DNA del parásito no se observan por que no hubo producción.

Tabla 2) Promedio de la cuantificación de IL-10

| | MEDIO | DNA HUMANO | CpG | 10 µg DNA L mex | 20 µg DNA L mex |
|-----------------|-------------|--------------|---------------|-----------------|-----------------|
| EXP1 | 0.00 | 0.00 | 193.29 | 0.00 | 0.00 |
| EXP2 | 0.00 | 65.54 | 126.58 | 0.00 | 164.14 |
| EXP3 | 0.00 | 113.13 | 369.89 | 0.00 | 177.32 |
| EXP4 | 0.00 | 0.00 | 229.79 | 0.00 | 0.00 |
| PROMEDIO | 0.00 | 44.67 | 229.89 | 0.00 | 85.36 |

Se muestran los promedios de la cuantificación de IL-10 en los sobrenadantes de 4 experimentos.

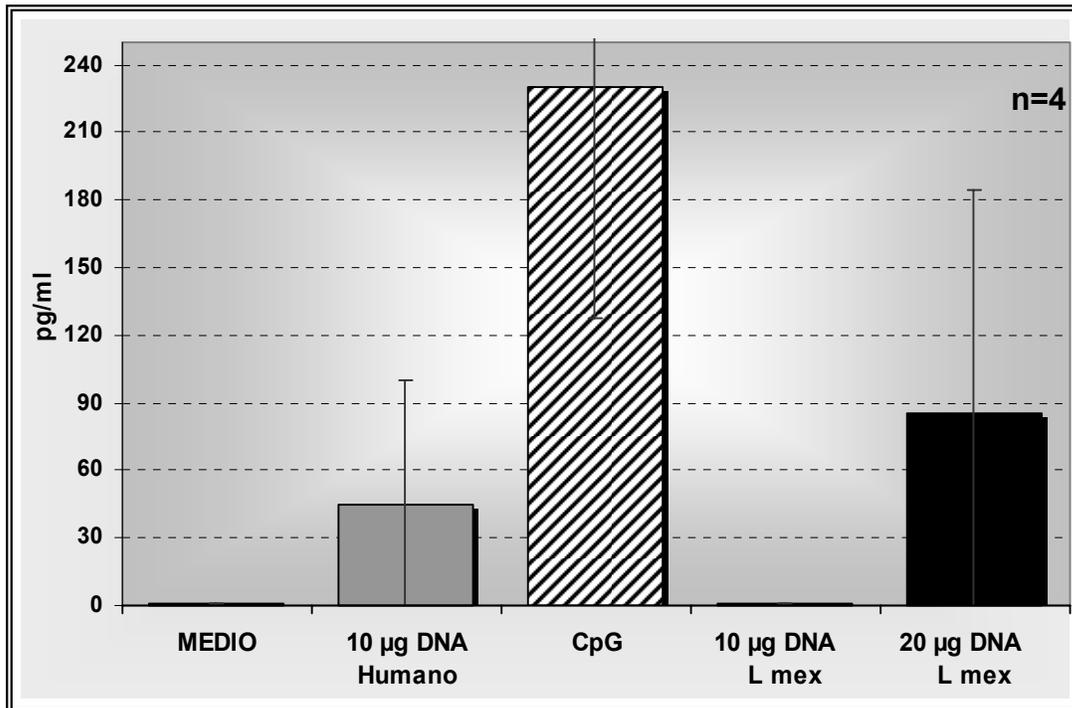


Fig. 29) Resultados de la cuantificación de IL-10. La barra Blanca (no visible) representa el resultado de las células sin estimular, la barra Gris a las células estimuladas con DNA humano; la barra Rayada, las células estimuladas con CpG; las barras Negras, a las células estimuladas con 10 µg (no visible) y 20 µg de DNA del parásito. La gráfica representa el promedio de los experimentos y \pm la desviación estándar.

6.5.2. Producción de IL-12_{p40}

Para verificar que la activación del receptor TLR9 por medio del DNA de *L. mexicana* inducía la producción de citocinas que dirigen la respuesta inmune hacia Th1, se analizaron los sobrenadantes de las células estimuladas durante 18 h con 10 y 20 µg de DNA de *L. mexicana*, 3 µg de CpG, 10 µg de DNA humano y una condición sin estimular. En la figura 30 y en la tabla 3 se muestran los resultados de la cuantificación.

En los resultados se observa que el DNA del parásito si induce la producción de la citocina IL-12_{p40}, aunque la mayor producción de IL-12_{p40} se encuentra en las células estimuladas con los CpG por ser el ligando reconocido para TLR9, sin embargo, hay una tendencia de incremento de producción de la citocina al aumentar la cantidad de DNA utilizado. (Fig. 30). En la tabla 3 se muestra la cuantificación de IL-12_{p40} en los sobrendantes de 5 experimentos, de los cuales, sólo en 3 se utilizó la concentración de 20 µg de DNA de *L. mexicana*, en los 2 primeros no se determino (ND).

TABLA 3) Promedios de la cuantificación de IL-12

| | MEDIO | 10 µg DNA Humano | CpG | 10 µg DNA L mex | 20 µg DNA L mex |
|-----------------|--------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| EXP1 | 0 | 0 | 1206.15 | 817.96 | ND |
| EXP2 | 90 | 230 | 4088.60 | 364.64 | ND |
| EXP3 | 0 | 0 | 3716.50 | 178.77 | 574.73 |
| EXP4 | 0 | 0 | 2349.87 | 154.93 | 196.53 |
| EXP5 | 0 | 0 | 4200.00 | 1949.47 | 1935.70 |
| PROMEDIO | 18.00 | 46.00 | 3112.22 | 693.15 | 902.32 |

En esta tabla se muestran los promedios de la cuantificación de IL-12_{p40} en los sobrenadantes de las células estimuladas con DNA de *L. mexicana*, CpG y DNA humano.

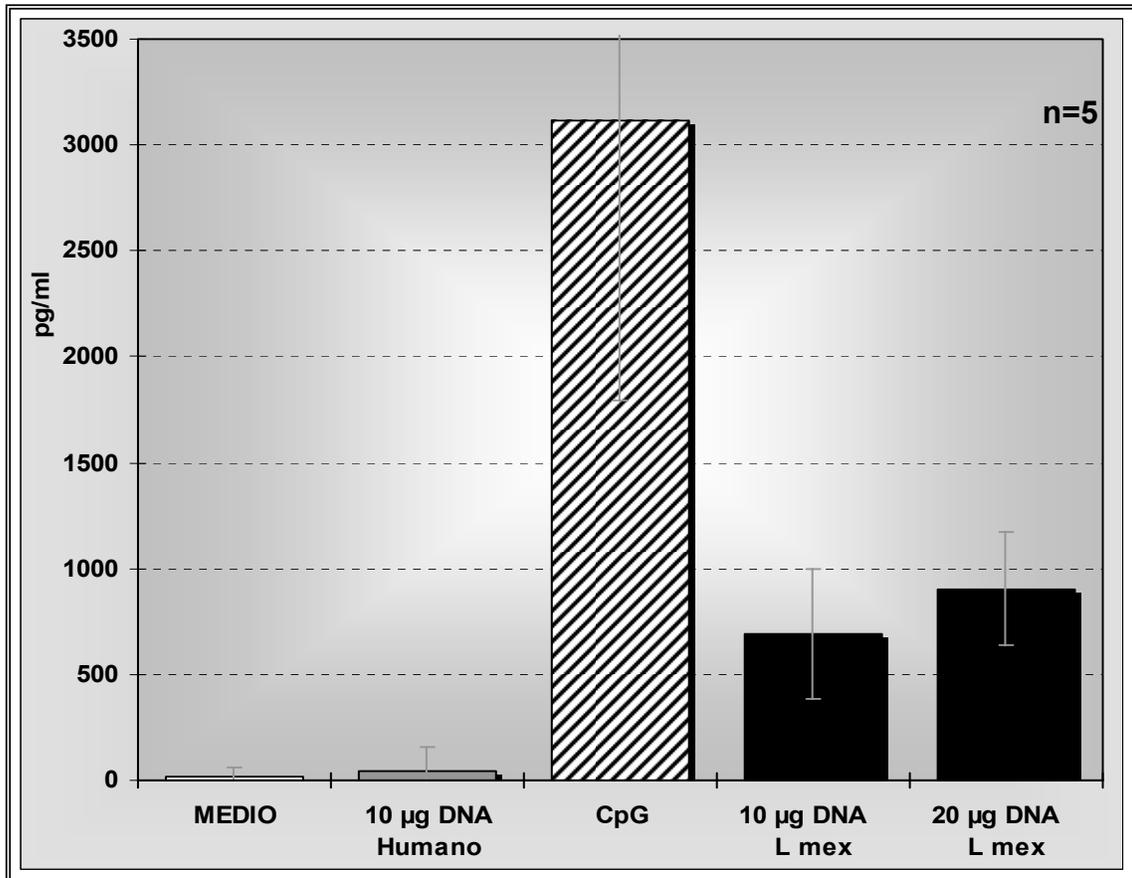


Fig. 30) Resultados de la cuantificación de IL-12_{p40} de los sobrenadantes de las células estimuladas. La barra blanca (no visible) corresponde a las células sin estimular; la barra Gris, a las células estimuladas con DNA humano; la barra Rayada, a las células estimuladas con CpG; y las barras negras, correspondes a las células estimuladas con 10 y 20 µg de DNA del parásito respectivamente. Sólo en 3 experimentos se utilizó la concentración de 20 µg de DNA del parásito. La gráfica representa el promedio de los experimentos y \pm la desviación estándar.

6.5.3. Producción de TNF- α

Una característica importante de la activación del macrófago es la producción de TNF- α . Para verificar que la estimulación con el DNA de *L. mexicana* activaba a los macrófagos, se cuantificó la producción de TNF- α en los sobrenadantes de las células estimuladas durante 18 h con 10 y 20 μ g de DNA de *L. mexicana*, 3 μ g de CpG, 10 μ g de DNA humano y una condición más sin estimular.

Los resultados mostraron que ambas concentraciones del DNA del parásito activó al macrófago produciendo grandes cantidades de TNF- α al igual que el control positivo (CpG), no así con el DNA humano, donde hubo poca producción de TNF- α , aunque al ser el control negativo, la cuantificación debió salir negativa. Esto se podría explicar por que el DNA que se uso era de humano y no de ratón (Fig. 31 y tabla 4).

TABLA 4) Promedio de la cuantificación de TNF- α .

| | MEDIO | 10 μ g DNA Humano | CpG | 10 μ g DNA L mex | 20 μ g DNA L mex |
|-----------------|-------------|-----------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| EXP1 | 0.00 | 407.33 | 2100.00 | 2100.00 | 2100.00 |
| EXP2 | 0.00 | 116.25 | 2100.00 | 2100.00 | 2100.00 |
| EXP3 | 0.00 | 116.25 | 2100.00 | 2100.00 | 2100.00 |
| EXP4 | 0.00 | 129.27 | 2100.00 | 2100.00 | 2100.00 |
| PROMEDIO | 0.00 | 192.27 | 2100.00 | 2100.00 | 2100.00 |

En la tabla se muestran los resultados de la cuantificación de TNF- α en los sobrenadantes de 4 experimentos. La concentración de 2100 pg es el máximo valor en la curva y es el valor detectado en las células estimuladas con CpG y con DNA de *L. mexicana*, para conocer el valor exacto sería necesario hacer diluciones de los sobrenadantes.

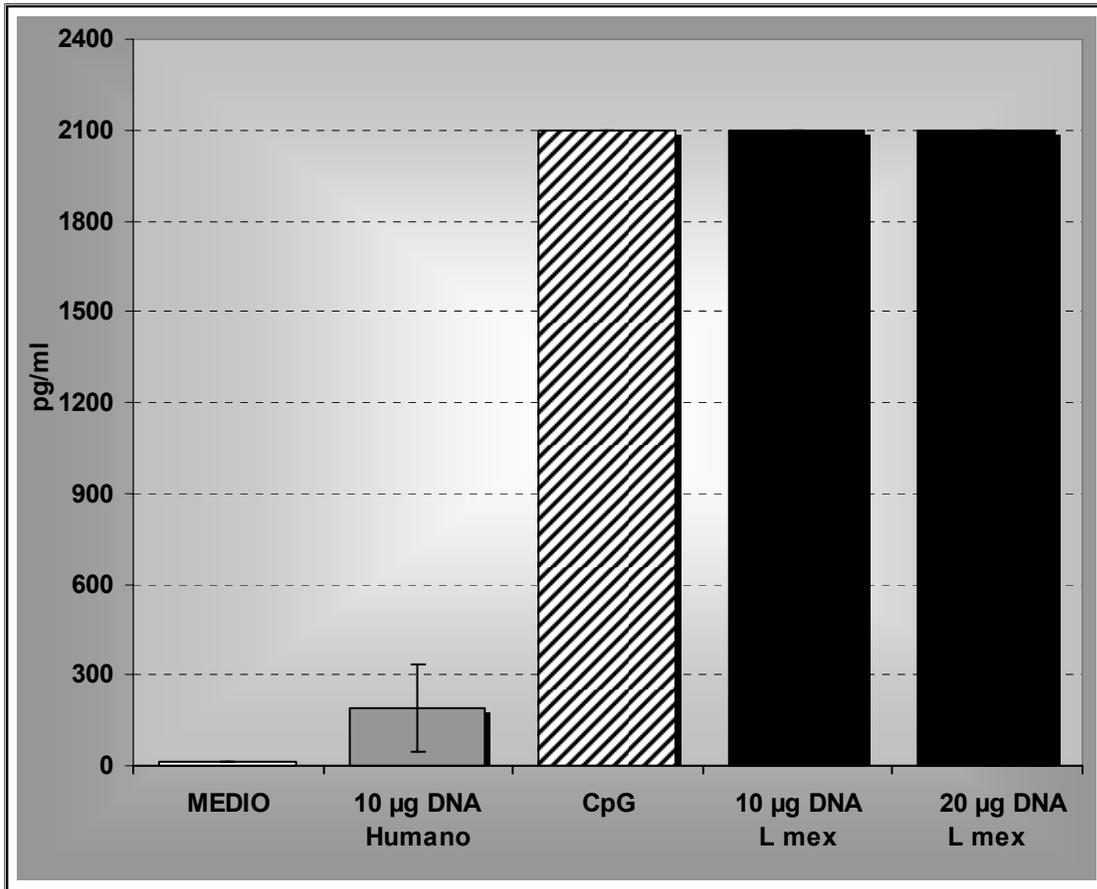


Fig. 31) Resultados de la cuantificación de TNF- α . La barra blanca representa a las células sin estimular (medio); la barra gris, a las células estimuladas con DNA humano; la barra rayada, a las células estimuladas con CpG; y las barras negras, a las células estimuladas con DNA del parásito. La gráfica representa los promedios de 4 experimentos y \pm la desviación estándar. No se gráfica la desviación estándar en todos los casos por que el resultado presenta el máximo valor detectado en la curva de cuantificación de TNF- α .

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad de difícil control, ya que no existen vacunas eficientes ni medicamentos seguros. Adicionalmente, el control se ha dificultado por la gran cantidad de reservorios de este parásito, por lo que también es considerada como una zoonosis. Entre estos reservorios se encuentran mamíferos silvestres y domésticos.

El tratamiento de elección para esta parasitosis sigue siendo el uso de antimoniales pentavalentes como el Pentosam y el Glucantime, que han sido ampliamente usados desde 1950. Actualmente se considera que del 10 al 25% de los tratamientos para leishmaniosis fallan o los pacientes tienen lapsos recurrentes, en cuyo caso se usan fármacos como pentamidinas y amfotericina B (Handman, 2001).

En México, la leishmaniosis cutánea es causada por *L. mexicana*, que puede causar cuadros clínicos severos y desfigurantes, por lo cual es muy relevante buscar nuevos métodos preventivos y curativos. Los avances obtenidos sobre receptores de la respuesta inmune innata han revolucionado el diseño de métodos preventivos (Janeway y Medzhitov, 2002)

Los avances sobre ligandos para receptores de la respuesta inmune innata actualmente están cobrando importancia para el tratamiento y prevención de patógenos intracelulares. En este trabajo se analizó si el DNA de *L. mexicana* tiene efecto inmunoestimulante sobre macrófagos murinos a través del receptor TLR9.

A diferencia de la respuesta inmune innata, la respuesta adaptativa ha sido ampliamente estudiada en modelos murinos de leishmaniasis. Esta parasitosis ha sido utilizada para estudiar el paradigma de la respuesta Th1 y Th2, donde el

trasfondo genético del hospedero determina la naturaleza y magnitud de la respuesta de las células T y el tipo de citocinas producidas. En el modelo murino de leishmaniosis se estableció que la curación del ratón C57BL/6, naturalmente resistente a la infección por *L. major*, estaba asociada a una respuesta Th1, mientras que la progresión de la enfermedad del ratón susceptible BALB/c, estaba asociada a una respuesta tipo Th2 (von Stebut y Udey, 2004; Gummy *et al*, 2004).

Hasta la fecha se ha estudiado poco la participación de la respuesta inmune innata en el desarrollo de la leishmaniosis en los distintos modelos murinos. La respuesta inmune innata es la primera barrera a la que se enfrenta el parásito al entrar en el hospedero. El sistema inmune innato usa una variedad de PRRs que reconocen moléculas compartidas por patógenos (PAMPs). Los PRRs pueden ser expresados en la superficie celular, en compartimentos intracelulares o secretados dentro del flujo sanguíneo. La principal función de los PRR incluye opsonización, activación de complemento, fagocitosis, activación de las vías de señalización proinflamatorias y la inducción de apoptosis. El sistema de complemento opsoniza microorganismos para su fagocitosis y eliminación por células fagocíticas, pero también se activa para eliminar al microorganismo formando poros en su membrana. En este aspecto, *Leishmania* no podía ser la excepción. El parásito es opsonizado por moléculas C3b y C3bi del sistema de complemento que se unen a los receptores CR1 y CR3 presentes en los macrófagos del hospedero. De esta forma la fagocitosis de los parásitos se lleva a cabo de una manera “silenciosa” ya que al ser fagocitados por medio de CR3 y CR1 no se activa la NADPH oxidasa de la membrana por lo que el estallido oxidativo y la producción de especies reactivas de oxígeno, que dañarían al parásito, no se forman. Este es un mecanismo conveniente para el parásito, ya que escapa a dos mecanismos leishmanicidas: el sistema del complemento y el estallido oxidativo dentro del macrófago. Otro beneficio de usar CR3 es que se suprime la producción de IL-12, lo que inhibe la inmunidad celular mediada por esta citocina (Cunningham, 2002; Handman 2000).

Los macrófagos son de gran importancia en todo el proceso de la enfermedad. Estas células son las encargadas de fagocitar y eliminar al parásito aunque paradójicamente algunos funcionan como hospederos del parásito, sin que el parásito sufra daño en el compartimento intracelular. El macrófago es también una célula presentadora de antígenos, por lo que puede procesar al parásito y presentar epítopes de las moléculas del parásito que funcionan como antígenos para linfocitos T. Entre los receptores que utilizan los macrófagos para reconocer diversas moléculas asociadas a patógenos se encuentran los TLRs, que pueden reconocer una variedad de PAMPs como LPS, presente en la membrana de algunas bacterias, el LPG de *Leishmania*, flagelina de bacterias y CpGs no metilados, presente en las bacterias, entre otros. Algunos TLRs se encuentran asociados a la membrana celular como TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6, mientras que otros como TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se encuentran en endosomas en el interior de la célula (Janeway y Medzhitov, 2002).

El reconocimiento de distintos PAMPs por PRRs del macrófago induce la producción de citocinas proinflamatorias, tales como IL-12, IL-1, IL-6 y TNF- α . La citocina IL-12 puede ser producida por diversos tipos celulares como células dendríticas, macrófagos, células polimorfonucleares y células B. Varios estudios han mostrado la importancia de la IL-12 en la resistencia a la leishmaniosis y en la persistencia de la inmunidad (von Stebut y Udey, 2004). La producción de IL-12 por células dendríticas también puede ser inducida por los CpG, PAMPs específicos para TLR9, lo cual favorece una respuesta polarizada Th1 (Krieg, 2001). Adicionalmente, IL-12 puede ser requerida para la proliferación óptima de células Th o para la producción óptima de IFN- γ al activar a las células NK. En la leishmaniosis, la producción de IL-12 por los macrófagos, una de las primeras células que tienen contacto con el parásito, es importante debido a que esta citocina activa células NK para la subsecuente producción de IFN- γ . La combinación de IFN- γ con IL-12 favorece el desarrollo de una respuesta Th1 que a

su vez induce la activación del macrófago y la protección del hospedero (Scott *et al*, 2004).

El control de la producción de citocinas proinflamatorias por el macrófago ocurre a través de su producción de IL-10. Esta citocina anti-inflamatoria inhibe la eliminación de organismos intracelulares y regula la inflamación. Tiene efectos inhibitorios sobre las funciones efectoras de los macrófagos incluyendo la producción de TNF- α , la co-estimulación y disminuye la expresión de MHC clase II, inhibiendo la proliferación de linfocitos T. Se ha demostrado que IL-10 establece la susceptibilidad a la infección por *L. donovani* y es responsable de la alta persistencia del parásito en ratones BALB/c. Se ha sugerido, que tiene un papel central en la progresión de la leishmaniosis (Scott *et al*, 2004, Gumy *et al*, 2004).

Hasta la fecha existen pocos reportes de la participación de distintos TLRs de macrófagos en la leishmaniosis. En particular, TLR9 nunca había sido analizado. TLR9 es un receptor que hasta ahora se sabía que únicamente reconoce motivos CpG presentes en el DNA no metilado de bacterias. En macrófagos y monocitos murinos, los motivos CpGs desencadenan una cascada de señalización con translocación del NF- κ B al núcleo, que trae como consecuencia la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-12.

El presente trabajo demostró por primera vez que TLR9 también puede reconocer el DNA de *L. mexicana*. En macrófagos murinos los motivos CpGs del DNA de *Leishmania* indujo la producción de citocinas TNF- α e IL-12 y sobre-expresión de TLR9. La activación de TLR9 en macrófagos por el DNA de *L. mexicana* llevó a una baja producción de IL-10, posiblemente en respuesta a las cantidades de TNF- α producidas. Esto cual sugiere que la respuesta inmune inducida por el DNA del parásito es dirigida hacia tipo Th1. Al secretar bajas concentraciones de IL-10, es probable que la expresión de MHC clase II permanece intacta y puede realizarse una correcta presentación de antígenos por el macrófago que presenta

las moléculas de *Leishmania* por medio de MHC II (Handman, 2000). El haber encontrado que el DNA de *Leishmania* activa a macrófagos a través de TLR9, permite diseñar posibles modelos de vacunas.

En la leishmaniosis se ha intentado desarrollar vacunas que garanticen la inducción de una respuesta Th1, que es requerida para eliminar al parásito intracelular. Se ha analizado la capacidad protectora de muchos antígenos de *Leishmania*. Los candidatos de vacunas que han sido empleados en la prevención de la leishmaniosis incluyen parásitos atenuados o muertos, éstos en ambas formas de promastigotes y amastigotes. También se han utilizado péptidos recombinantes como gp63. Entre las estrategias que buscan mejorar el tratamiento o curar la enfermedad también se han utilizado citocinas como IL-12 o IFN- γ , que ayudan al mejoramiento del paciente. En modelos murinos se han utilizado ambas estrategias en combinación con algunos adyuvantes, como los adyuvantes de Freund (Cunningham, 2002). Sin embargo, ninguno de los modelos propuestos ha garantizado la inducción de una respuesta tipo Th1.

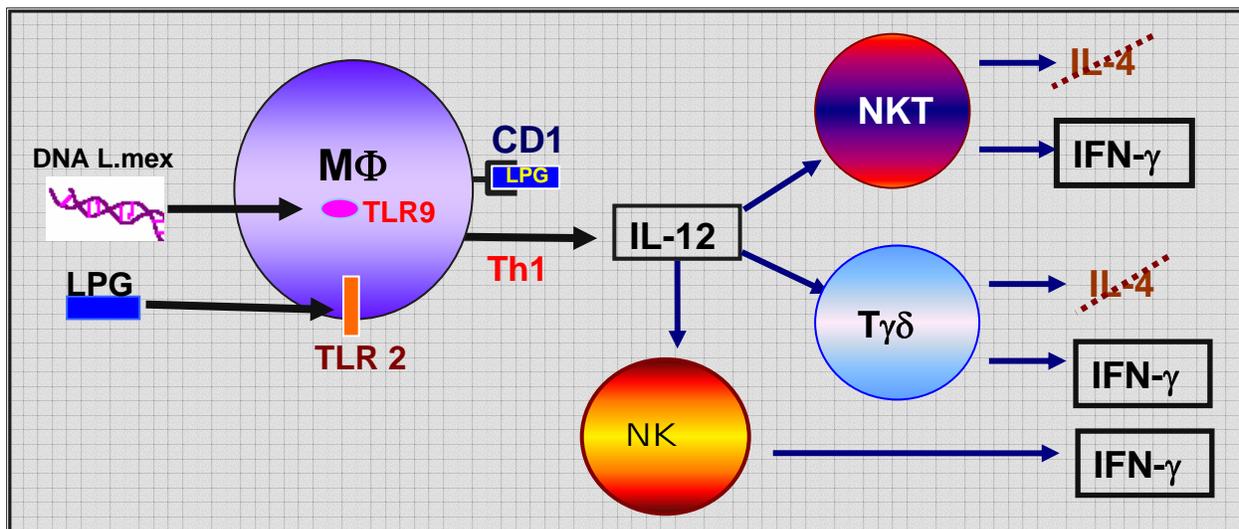
El interés en estudiar la inmunomodulación ejercida por los distintos TLRs en células de la respuesta inmune innata, radica en la capacidad de los TLRs de inducir la secreción de citocinas tipo Th1 activadoras de macrófagos. Se ha demostrado que los CpGs tienen un valor terapéutico como agentes anti-infecciosos y pueden servir como adyuvantes en vacunas con capacidad de estimular más efectivamente y mantener activadas las respuestas inmunes innata y adaptativa (Krieg, 2002; Klinman *et al*, 1999).

La combinación de antígenos y adyuvantes es importante para el desarrollo de vacunas. Los adyuvantes mas potentes que se han utilizado en diseños de vacunas experimentales son los CpG-ODN por su capacidad de activación de NF- κ B al unirse al TLR9 con producción de citocinas proinflamatorias (Klinman *et al*, 1999). En este sentido, el DNA de *L. mexicana* podría también ser analizado como

adyuvante potencial en la leishmaniosis, por su capacidad de activación de TLR9. El hecho de que el DNA de *Leishmania* demostró activar a TLR9 con la producción de IL-12 y de TNF- α en los macrófagos murinos, lo hace un posible candidato para ser utilizado en el control de la leishmaniosis. La protección es debida a que ambas citocinas contribuyen a la resistencia a la Leishmaniosis por la activación del macrófago con intensificación del estallido oxidativo, la síntesis de iNOS y la producción de IFN- γ en células NK.

En este trabajo también se encontró una ligera producción de IL-10 y TNF- α cuando los macrófagos fueron estimulados con el DNA humano, que se utilizó como control negativo. El DNA humano es metilado y por lo tanto no debería de haber estimulado a los macrófagos. Sin embargo, existen informes de que en la lepra (una enfermedad en la que se forman complejos inmunes con DNA) TLR9 puede reconocer ácidos nucleicos o DNA contenido en complejos inmunes y activa a células dendríticas y linfocitos B (Barrat *et al*, 2006; Leadbetter *et al*, 2002). Se podría especular que el haber utilizado DNA humano en macrófagos de ratón pudiera haber inducido un estímulo asociado a la coincubación de sustancias antigénicas de especies distintas. Este estímulo pudiera deberse al hecho de que no se utilizó DNA extraído de células murinas en cuyo caso el TLR9 de las células de ratón podría haber discriminado entre DNA propio y DNA exógeno.

El haber encontrado que el DNA de *L. mexicana* estimula a TLR9 en macrófagos murinos, enriquece los conocimientos sobre moléculas de *Leishmania* que pueden activar a TLRs. Así, este trabajo propone un modelo basado en la activación de la respuesta inmune innata por medio de TLR2 y TLR9 a través de moléculas presentes en *Leishmania* como el LPG y el DNA. Esta activación podría desencadenar una fuerte respuesta inmune caracterizada por la producción de citocinas como IL-12 en células dendríticas y de IFN- γ por células de la respuesta inmune innata como las NK, NKT y T $\gamma\delta$.



Modelo Propuesto Para Potenciar Una Respuesta Th1 En La Leishmaniosis.

Los receptores que participan en este modelo son TLR2 y TLR9. El LPG que cubre la superficie del parásito es reconocido por el TLR2, en las células de los macrófagos. Estas son células fagocíticas profesionales y presentadora de antígenos y podría presentar el LPG de *Leishmania* a través de moléculas CD1. Estos glicolípidos pueden ser reconocidos directamente por células NKT y Tγδ que se unen al receptor CD1d de los macrófagos. Por otra parte el DNA de *Leishmania* se uniría al receptor TLR9 que está presente en las células dendríticas y activaría a la célula para producir IL-12. La IL-12 estimularía a las células NK, NKT y Tγδ a producir IFN-γ, ya que se sabe que dependiendo del ambiente que rodea a estas células es el tipo de respuesta inmune que presentan. Si se rodean de citocinas que dirigen la respuesta inmune hacia Th1 liberan IFN-γ y si están rodeadas por un ambiente de citocinas Th2 liberan IL-4 (Godfrey *et al*, 2000). De esta forma se podría potenciar una respuesta Th1 en la leishmaniosis. Las células NKT y Tγδ tienen mRNA preformado para la producción de IL-4 y de IFN-γ por lo que IL-12 es importante para enriquecer el medio que rodea a estas células estimulando la secreción de IFN-γ y no la de IL-4 (Stetson *et al*, 2003; Matsuda *et al*, 2003). El estimular de manera simultánea a TLR2 y TLR9 ha sido utilizado con éxito en el control de la parasitemia por *T. cruzi* (Bafica *et al*, 2006)[♦].

[♦] La relevancia de los datos obtenidos en esta tesis se confirman con la publicación de datos similares en *T. cruzi*, que se publicaron el mismo mes en el cual se finalizó esta tesis.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

- ❖ El DNA de *L. mexicana* posee motivos CpG. Aunque la enzima solo reconoce estos motivos no se descarta que el DNA posea más motivos CpG en diferente contexto y que también pueden ser reconocidos por TLR9.
- ❖ El DNA extraído de *Leishmania* no contenía proteínas contaminantes que pudieran estar activando una respuesta inmune.
- ❖ Se mostró que TLR9 puede reconocer el DNA de *L. mexicana*, y que la expresión de este receptor es mayor cuando se estimula con 10 µg de DNA, aunque es visible desde 1 µg de DNA.
- ❖ Se observó que el mejor tiempo para estimular las células con DNA del parásito y observar la mayor expresión de TLR9 es de 3 h.
- ❖ Se demostró que la estimulación de los macrófagos murinos derivados de médula ósea durante 18 h con DNA del parásito indujo sobre-expresión de TLR9 asociado con la producción y secreción de TNF- α , IL-12 y una mínima cantidad de IL-10.

Hasta la fecha no había reportes de que el DNA de *Leishmania* fuera reconocido por TLR9, el único ligando conocido para este receptor eran los CpG-ODN y el DNA de bacterias no metilado.

Este es el primer trabajo que demuestra que el DNA de *L. mexicana* puede ser reconocido por TLR9 y que esta unión desencadena la producción de TNF- α e IL-12.

CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

- **Aebischer T, Bennett C, Pelizzola M, Vizzardelli C, Pavelka N, Urbano M, Capozzoli M, Luchini A, Ilg T, Granucci F, Blackburn C, Ricciardi-Castagnoli P. (2005).** A critical role for lipophosphoglycan in proinflammatory responses of dendritic cells to *Leishmania mexicana*. Eur. J. Immunol. Vol **35**, p 476 - 486.
- **Ashkar, A. A. and Rosenthal, K. L. (2002).** Toll-Like Receptor 9, CpG DNA and Innate Immunity. Current Mol. Med. Vol **2**, p 545 – 557
- **Awashti A, Ram K, Mathur and Bhaskar S. (2004).** Immune Response to Leishmania Infection. Indian J Med Res **119**, June, p 238 – 258.
- **Bafica A, Santiago H. C, Goldzmid R, Ropert C, Gazzinelli R. T., and Sher A. (2006).** TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in Trypanosoma cruzi Infection. The Journal of Immunology. July. Vol. **177**, p 3515 – 3519.
- **Barrat F. J., Meeker T, Gregorio J, Chan J. H., Uematsu S, Akira S, Chang B, Duramad O, and Coffman R. L. (2006).** Nucleic Acids of Mammalian Origin Can Act as endogenous ligands for Toll-like Receptors and May promote Systemic lupus erythematosus. The Journal of Experimental Medicine. October. Vol. **202**, no 8, p 1131 – 1139.
- **Bauer S, Kirschning C. J., Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, and Lipford G. B. (2001).** Human TLR9 Confers

Responsiveness to Bacterial DNA Via Species-specific CpG Motif Recognition. PNAS, Vol **98**, no 16, July 31, p 9237 – 9242.

- **Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Gutierrez Kobeh L, Ruiz A, Cervantes R, Perez T A., Cabrera N, Gonzalez A, Maldonado C, Isibasi A. 2003.** *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and Biochemical Parasitology*, August, Vol **130**, p 65 - 74.
- **Chu R S, Targoni O S., Krieg A. M., Lehmann P. V., and Harding C. V. (1997).** CpG Oligodeoxynucleotides Act as Adjuvants that Switch on T Helper 1 (Th1) Immunity. *J. Exp. Med.* Vol **186**, no 10, November 17, p 1623 – 1631.
- **Chuang T-H, Lee Jongdae, Kline L, Mathison J. C and Ulevitch R. J. (2002).** Toll – like Receptor 9 Mediates CpG-DNA Signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, March, Vol **71**, p 538 – 544.
- **Cunningham A. C. (2002).** Parasitic Adaptative Mechanisms in Infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*, Vol **72**, p 132 – 141.
- **Gallego M. (2004).** Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. *Rev. Sci. Tech. off Int. Epiz*, Vol. 23, no 2, p 661 – 676.
- **Garcia L S. (2001).** *Diagnostic Medical Parasitology*. 4th Ed. ASM Press D. C.

- **Godfrey D I., Hammond J. L., Poulton L D., Smyth M J., and Baxter A G. (2000).** NKT Cells: Facts, Functions and Fallacies. Review Immunology Today. November. Vol. **21**, no 11, p 573 – 583.
- **Guha – Niyogi A, Sullivan D R., and Turco S. J. (2001).** Glycoconjugate Structures of Parasitic Protozoo. Glycobiology, Vol **11**, no 4, p 45R – 59R.
- **Gumy A., Louis J A., Launois P. (2004).** The Murine Model of Infection With *Leishmania* Major And its Importance For The Deciphering of Mechanisms Underlying Differences in Th Cell Differentiation in Mice From Different Genetics Backgrounds. International Journal of Parasitology, vol **34**, p 433 – 444.
- **Handman E (2001).** Leishmaniosis: Current Status of Vaccine Development. Clinical Microbiology Reviewa, Apr. Vol **14**, no 2, p. 229 – 243.
- **Handman E. (2000).** Cell Biology of *Leishmania*. Advances in Parasitology, Vol **44**.
- **Handman E. and Bullen D. (2002).** Interaction of *Leishmania* with the Host Macrophage. Trends in Parasitology, August, Vol **18**, no 8, p 332 – 334.
- **Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Makoto M, Hoshino K, Wagner He, Takeda K and Akira S. (2000).** A Toll – like Receptor Recofnizes bacterial DNA. Nature, Vol 408, December 7, p 740 – 745.

- **Herdwalt B L. (1999).** Leishmaniosis. *The Lancet*, Vol **354**, October 2. 1191 – 99.
- **Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahdörfer B, Giese T, Endres S, and Hartmann G. (2002).** Quantitative Expression of Toll – Like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology*. Vol **168**, p 4531 – 4537.
- **Janeway C. A. Jr. and Medzhitov R. (2002).** Innate Immune Recognition .*Annual Reviews Immunology*. Vol **20**, p 197 – 216.
- **Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, Giese T, Endres S, and Hartmann G. (2003).** Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides Reveals Two Distinct Regulatory Pathways of Type I IFN Synthesis in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, Vol **170**, p 4465 – 4474.
- **Klinman D M. (2004).** Immunotherapeutic Uses of CpG Oligodeoxynucleotides. *Nature Reviews Immunology*, Vol **4**, April. p 1 – 10.
- **Klinman D M., Barnhart K M., Jacqueline C. (1999).** CpG Motifs as Immune Adjuvants. *Vaccine*, Vol **17**, p 19 – 25.
- **Krieg A M, Wu Tong, Weeratna R, Efler Susan M., Love-Homan L, Yang L, Yi Ae-Kyung, Short D, and Davis H L. (1998).** Sequence Motifs in Adenoviral DNA Block Immune Activation by Stimulatory

CpG Motifs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Microbiology, October, Vol **95**, p 12631 – 12636.

- **Krieg A M. (2001).** Immune Effects and Mechanisms of Action of CpG Motifs. Vaccine, vol **19** p 618 – 622.
- **Krieg A M. (2002).** CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects. Annual Reviews Immunology. Vol **20**, p 709 – 760.
- **Krieg A M., and Wagner H. (2000).** Causing a Commotion in the Blood: Immunotherapy Progresses From Bacteria to Bacterial DNA. Review Immunology Today, October, Vol **21**, no 10, p 521 – 526.
- **Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald K A., Monks B G., Knetter C F., Lien E, Nilsen N J., Espevik T, and Golenbock D (2004).** TLR9 Signals After Translocating From the ER to CpG DNA in the Lysosome. Nature Immunology. February. Vol. **5**, no 2, p 190 – 198.
- **Leadbetter E. Rifkin I R., Hohlbaum A M., Beaudette B C., Shlomchik M J., and Marshak – Rothstein A. (2002).** Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like Receptors. Nature, April. Vol. 416, p 603 – 607.
- **Leifer C, Kennedy M., Mazzoni A, Lee C, Kruhlak M J., and Segal D M. (2004).** TLR9 is Localized in the Endoplasmic Reticulum Prior to Stimulation. The Journal of Immunology. Vol. **173**, p 1179 – 1183.

- **Matsuda J L., Gapin L, Baron J L., Sidobre S, Stetson D B., Mo h M, Locksley R M., and Kronenberg M. (2003).** Mouse V α 14i Natural Killer T Cells are Resistant to Cytokine Polarization *in vivo*. PNAS. July, Vol. **100**, no 14, p 8395 – 8400.
- **MC de Almeida, Vilhena V, Barral A, Barral – Netto. (2003).** Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, October, Vol **98**, no 7, p 861 – 870.
- **McConville Malcolm J., Turco S J., Ferguson M. A.J., and Sacks D L. (1992).** Developmental Modification of Lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* Promastigotes to an Infectious Stage. The EMBO Journal, Vol **11**, no 10, p 3593 – 3600.
- **Organización Panamericana de la Salud (OPS). (1996).** Epidemiología y Control de la Leishmaniosis en las Américas, por País o Territorio. Cuaderno Técnico No. 44.
- **Sacks D and Sher A (2002).** Evasion Of Innate Immunity Response By Parasitic Protozoa. Nature Immunology. November 2002. Vol **3** no 11.
- **Sacks D L., Modi G, Rowton E, Späth G, Epstein L, Turco S. J., and Beverley S. (2000).** The Role of Phosphoglycans in *Leishmania* – Sand fly Interactions. PNAS. January, Vol **97**, no 1, p 406 – 411.
- **Scott P, Artis D, Uzonna J, Zaph C. (2004).** The Development of Effector and Memory T Cells in Cutaneous Leishmaniosis: The Implications For Vaccine Development. Immunological Reviews, Vol **201**, p 318 – 338.

- **Shoda L K. M., Kegerris K.A., Suarez C E., Roditi I., Corral R S, Bertot G M, Notimine J and Brown W. (2001).** DNA from Prorozoan Parasites Babesia bovis, Trypanosoma cruzi, and T. Brucei Is Mitogenic for B lymphocytes and Stimulates Macrophage Expression of Interleukin-12, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Nitric Oxide. *Infection and Immunity*, April. Vol **69**, no 4. p 2162 – 2171.
- **Stacey K J., and Blackwell J. (1999).** Immunostimulatory DNA as an Adjuvant in Vaccination against *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, August. Vol. **67**, no 8, p 3719 – 3726.
- **Stafford J L., Neumann N F., and Belosevic M. (2002).** Macrophage – Mediates Innate Host Defense Against Protozoan Parasites. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol **28**, no 3, p 187 – 248.
- **Stetson D., Markurs Mo h, Reinhardt L, Baron J L., Wang Zhi-En, Gapin L, Kronenberg M, and Locksley R. M. (2003).** Constitutive Citokine mRNAs Mark Natural Killer (NK) and NK T Cells Poised for Rapid Effector Function. *Journal of Medicine Experimental*, October, Vol. **198**, no 7, p 1069 – 1076.
- **Takeda K, Kaisho T and Akira S. (2003).** Toll – Like Receptors. *Annual Reviews Immunology*. Vol **21**, p 335 – 376.
- **Tewary P, Sukumaran B, Saxena S, and Madhubala R. (2004).** Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are Potent Enhancers of Protective Immunity in Mice Immunized with Recombinant ORFF Leishmanial Antigen. *Vaccine*. March. Vol **22**, p 3053 – 3060.

- **Vannier – Santos M. A., Martiny A., and de Souza W. (2002).** Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. *Current Pharmaceutical Design*. Vol **8**, p 297 – 318.
- **Velasco C. O, Guzmán B. C, Sánchez R. B., Torrentera A. F, Hernández Márquez J G. (1994).** Las Leishmaniosis con Especial Referencia a México (II Edición). Colección de Cuadernos Técnicos del INDRE, - Número 4-.
- **Von Stebut E, Udey M C. (2004).** Requirements for Th1-Dependent Immunity Against Infection with *Leishmania major*. *Microbes and Infection*, August, Vol **6**, p 1102 – 1109.
- **Wagner H (2004).** The Immunobiology of the TLR9 Subfamily. *Trends in Immunology*, Vol **25**, no 7, July.
- **Wagner H. (2001).** Toll Meets Bacterial CpG – DNA. *Immunity*, May, Vol **14**, p 499 – 502.
- **Yi A-K, Yoon J, Hong Soon-Cheol, Redford T W, and Krieg A M. (2001).** Lipopolysaccharide and CpG DNA Synergize for Tumor Necrosis Factor - α Production Through activation of NF- κ B. *International Immunology*. February, Vol **13**, no 11, p 1391 – 1404.

APÉNDICE I. Soluciones

| | | |
|--|----------------------------------|---------|
| Amortiguador de corrida 10X pH 8.3 | Tris 25mM | 30.3 g |
| | Glicina (190mM) | 144 g |
| | SDS (0.1%) | 10 g |
| Gel concentrador. | Tris 0.5M pH 6.8 | 750 µl |
| | dH ₂ O | 1.75 ml |
| | Bis-acrilamida | 500 µl |
| | Persulfato de Amonio | 40 µl |
| | Temed | 2 µl |
| Gel separador 10% | Tris 1.5 M pH 8.8 | 1.25 ml |
| | dH ₂ O | 2.1 ml |
| | Bis-acrilamida | 1.65 ml |
| | Persulfato de amonio | 50 µl |
| | Temed | 2.5 µl |
| Acrilamida: Bis-acrilamida | Archilamida | 29.2 g |
| | Bis-Acrilamida | 0.8 g |
| Solución desteñidora | Agua desionizada | 1250 ml |
| | Ácido acético | 250 ml |
| | Metanol | 1000 ml |
| PBS 1x | NaCl | 8 g |
| | KCl | 0.2 g |
| | Na ₂ HPO ₄ | 1.15 g |
| | KH ₂ PO ₄ | 0.2 g |
| | Agua Bidestilada | |
| Citrato de Sodio 0.1M en Etanol 10% | Etanol | 9.5 ml |
| | Agua bidestilada | 90.5 ml |
| | Citrato de Sodio | 2.94 g |
| Etanol 75% | Etanol | 75 ml |
| | Agua bidestilada | 25 ml |

| | | |
|-----------------------------|-------------------------|--------|
| TBE 5X | Tris | 54 g |
| | Ácido bórico | 27.5 g |
| | EDTA pH 8.0 | 20 ml |
| | Agua bidestilada | 1 L |
| TBE 1x | TBE 5X | 100 ml |
| | Agua bidestilada | 400 ml |
| GEL AGAROSA TBE 1.5% | TBE 1X | 100 ml |
| | Azarosa | 1.5 g |
| EDTA 0.5mM pH 8.0 | EDTA | 19 g |
| | Agua bidestilada | 95 ml |
| | NaOH para ajustar el Ph | |
| Tinción con Plata | Agua bidestilada | 7 ml |
| | Complejo Ag | 1 ml |
| | Reductor | 1 ml |
| | Revelador | 1 ml |
| | Acelerador | 5 ml |

APÉNDICE II. REACTIVOS Y EQUIPO

| | |
|---|--|
| Mouse CpG - DNA | HyCult Biotechnology b. v. Cat. No. HC4033 1400µg; 200nm Lot. 3616R15 |
| TRizol ® Reagent | Invitrogen Cat. No 15596-018 Lot No 1284448 |
| Cloroformo | Chloroform 99+% 500ml SIGMA® C-2432 Lot 033K3604 Stabilized with amylenes |
| Ethanol | Merck K 35221283 542 |
| Marcador ΦX174 (ΦX174 RF DNA/Hae III Fragments | Life Technologies GIBCO BRL® Markers Cat. No 15611-015 Lot No 1094918 |
| Marcador 1Kb DNA ladder | Life Technologies GIBCO BRL® Markers Cat. No 15615-016 |
| AGAROSA | Invitrogen™ UltraPure Agarose Cat. No 15510-027 Lot No. 1247827 500g |
| Bromuro de Etidio | UltraPURE™ 10mg/ml Ethidium Bromure GIBCO BRL Form No. 10342B Cat. No 5585VA Lot No DKF901 |
| RT-PCR ONE STEP | Invitrogen™ SuperScript™III One-Step RT-PCR with Platinum ® Taq Cat. No 12574-026 Lot No 1312642 |

| | |
|--------------------------|---|
| Termociclador | AB Applied Biosystems 2720 Thermal cycler AB Applied Biosystems PCR system 2700 Gene Amp® |
| Tubos de Reacción | AB Applied Biosystems Part Number N801-0540 MicroAmp® |
| Transiluminador | Alpha Innotech Corporation Chemilmager™ 4000 Low light Imagin System |
| Espectrofotometro | Beckman DU® 530 Life Science Uv/Vis Spectrophotometer |
| Tinción con Plata | BIO-RAD Silver Stain Plus - SCS Cat. 161-0462 - Image development Reagent (IDR) Cat. 161-0462 - Reduction Moderator Solution (RMS) Cat. 161-0463 |

La parte de RT-PCR de este trabajo fue presentado en cartel en:

- **XVII Congreso Nacional de Inmunología**, Chihuahua 2006; con el título:

“EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TLR9 (TOLL LIKE RECEPTOR 9) EN MACRÓFAGOS MURINOS, INDUCIDA POR EL DNA DE *L. mexicana*”

Martínez-Salazar M. B., Berzunza-Cruz M., Becker-Fauser I

- **2º Congreso académico “Dr. Roberto Kretschmer Schmid”**, de la Facultad de medicina de la UNAM, con el título:

“Análisis del efecto inmunoestimulador que ejerce el DNA DE *L. mexicana* sobre el receptor TLR9 en macrofágos murinos”

Martínez-Salazar M. B., Berzunza-Cruz M., Becker-Fauser I

Análisis del efecto inmunoestimulador que ejerce el DNA DE *L. mexicana* sobre el receptor TLR9 EN macrófagos murinos

Martínez-Salazar M. B., Berzunza-Cruz M., Becker-Fauser I

Departamento de Medicina Experimental. Facultad de Medicina, UNAM. Hospital General de México.

Introducción.

Las leishmaniasis son enfermedades parasitarias causadas por varias especies de protozoarios hemoflagelados pertenecientes al género de *Leishmania* que infecta principalmente los macrófagos del mamífero hospedero. Los principales síndromes son: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral. En México, el agente causal de la leishmaniasis cutánea es *Leishmania mexicana*. En el modelo murino se ha reportado que una respuesta inmune tipo Th1 es benéfica para el hospedero en tanto que una respuesta Th2 va en detrimento del mismo. TLR9 es un receptor presente en varios tipos celulares que reconoce específicamente motivos CpG presentes en el DNA no metilado de bacterias. Se localiza en el retículo endoplásmico donde interactúa con su ligando en vesículas endocíticas. Esta interacción desencadena una potente respuesta inmune caracterizada por la producción de citocinas tipo Th1 (IFN- γ , IL-12, etc.). En la leishmaniasis no se ha reportado hasta ahora ningún ligando para TLR9. En otros trabajos se ha observado que el DNA de parásitos como *Babesia bovis*, *T. cruzi* y *T. brucei* es mitogénico para linfocitos B y que estimula la expresión de iNOS (sintasa inducible de óxido nítrico), IL-12 y TNF- α en macrófagos murinos pero no se ha analizado el papel del receptor TLR9 en el reconocimiento de este DNA. El objetivo de este trabajo es analizar si el DNA de *Leishmania mexicana* posee motivos CG con capacidad de inducir activación del receptor TLR9 llevando a la secreción de citocinas.

Material y métodos.

Se determinó la presencia de motivos CG en el DNA de *Leishmania mexicana* mediante el uso de *Hpa* II (que corta en sitios específicos CCGG de DNA no metilado). Se obtuvieron macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) de ratón de la cepa BALB/c, diferenciados con M-CSF recombinante y cultivados por 7 días a 37°C y 5% de CO₂. Después se estimularon en presencia de polimixina con DNA de *L. mexicana*, CpG ODN (oligodeoxinucleótidos) murinos y DNA de linfocitos humanos como control negativo. Se analizó la expresión del mRNA de TLR9 por medio de RT-PCR semicuantitativo. Se recolectaron los sobrenadantes de las células estimuladas para analizar la secreción de las citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10 por ELISA.

Resultados.

El DNA de *L. mexicana* fue digerido con la enzima de restricción *Hpa* II que corta en sitios CCGG y se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. El resultado demuestra que el DNA del parásito no está metilado y que contiene motivos CpG, que pudieran ser reconocidos por el receptor TLR9 de macrófagos murinos.

Se estimularon MDMO en diferentes tiempos y en presencia de polimixina, se extrajo el RNA total, se cuantificó y se realizó RT-PCR con 1 μ g del RNA y con oligonucleótidos específicos para TLR9 murino. El producto se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Los resultados demuestran que el DNA de *L. mexicana* estimula la expresión del RNA mensajero para TLR9 y que esta expresión es óptima a las 3 horas de estímulo.

Se estimularon MDMO durante 18 horas con DNA de *L. mexicana* en presencia de polimixina para evitar respuesta por posibles contaminantes. Se recolectaron los sobrenadantes para analizar la secreción de las citocinas mediante el método de ELISA para TNF- α , IL-12 e IL-10. El DNA de *L. mexicana* estimuló la secreción de TNF- α y de IL-12 y a muy bajas cantidades de IL-10.

Discusión.

El DNA de *L. mexicana* posee motivos CpG y al no estar metilado, es reconocido por el receptor TLR9 de macrófagos murinos. Ésta unión *in vitro* activa la expresión del mRNA de este receptor, así como la producción y subsecuente secreción de citocinas tipo Th1 como son TNF- α e IL-12. Aunque *Hpa* II solo corta en el motivo CCGG no se descarta que el DNA del parásito posea otros motivos CG en diferente contexto. Hasta ahora no había reportes de que el DNA de *L. mexicana* fuera reconocido por algún tipo celular. Nosotros comprobamos por primera vez que el DNA de *L. mexicana* puede ser reconocido por el TLR9 de macrófagos murinos de la cepa BALB/c.

Bibliografía.

Lisl K. M. Shoda, Kimberly A. Kegerreis, Carlos E. Suarez, Isabel Roditi, Ricardo S. Corral, Gustavo M. Bertot, Junzo Norimine, And Wendy C. Brown. 2001. DNA From Protozoan Parasites *Babesia Bovis*, *Trypanosoma Cruzi* And *T. Brucei* Is Mitogenic For B Lymphocytes And Stimulates Macrophage Expresión Of Interleukin-12, Tumor Necrosis Factor Alpha, And Nitric Oxide. INFECTION AND IMMUNITY, Apr. 69(4), p. 2162-2171.

Proyecto apoyado por PAPIIT IN 221806-3



EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TLR9 (TOLL LIKE RECEPTOR 9) EN MACRÓFAGOS MURINOS, INDUCIDA POR EL DNA DE *L. mexicana*.

Martínez-Salazar M. B., Berzunza-Cruz M., Becker-Fausser I*

*Departamento de Medicina Experimental. Facultad de Medicina, UNAM. Hospital General de México.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por un parásito protozoario flagelado, perteneciente al género *Leishmania*, que infecta principalmente macrófagos del mamífero hospedero. En México *Leishmania mexicana* es el agente causal de la leishmaniasis cutánea. En el modelo murino se ha reportado que una respuesta inmune tipo Th1, es benéfica para el hospedero, en tanto que una respuesta de tipo Th2 va en detrimento del mismo. TLR9 es un receptor presente en varios tipos celulares que reconoce específicamente motivos CpG presentes en el DNA no metilado de bacterias. Se localiza en el retículo endoplásmico donde interactúa con su ligando en vesículas endocíticas. Esta interacción desencadena una potente respuesta inmune caracterizada por la producción de citocinas tipo Th1 (TNF- α , IL-12, etc.). En la leishmaniasis no se ha reportado hasta ahora ningún ligando para TLR9. Este trabajo busca demostrar que el DNA del parásito puede actuar como ligando de TLR9.

OBJETIVO

Comprobar que el DNA de *Leishmania mexicana* posee motivos CpG y analizar si es capaz de inducir activación del receptor TLR9.

MATERIAL Y MÉTODO

Se extrajo el DNA de parásitos de *Leishmania mexicana* y de linfocitos humanos por el método TRIZOL y se cuantificó en un espectrofotómetro.

Se utilizó la enzima de restricción *HpaII* que corta en sitios específicos CCGG, para observar si el DNA del parásito posee motivos CpG que sean capaces de activar la expresión de TLR9.

Se diferenciaron Macrófagos con M-CSF a partir de médula ósea (MDMO) de ratón de la cepa BALB/c durante 7 días a 37°C y 5% de CO₂. Después se estimularon con DNA de *L. mexicana*, CpG como control positivo y DNA humano como control negativo.

Se extrajo el RNA total de estas células por el método de TRIZOL, se cuantificó en un espectrofotómetro y se realizó RT-PCR con 1µg del RNA con primers específicos para TLR9 murino. El producto se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio y se hizo densitometría en un transluminador.

RESULTADOS

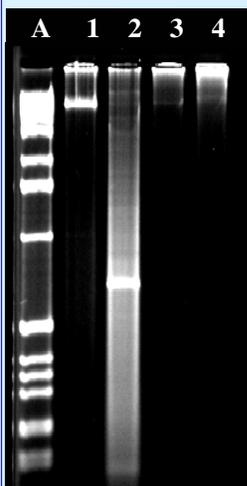


Fig.1) DNA de *L. mexicana* y de linfocitos humanos digeridos con la enzima de restricción *HpaII* y visualizados en un gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. En los carriles se muestra: A) Marcador de peso molecular 1 kb ladder; 1) DNA de *L. mexicana*; 2) DNA de *L. mexicana* con *HpaII*; 3) DNA humano; 4) DNA humano con *HpaII*. Este resultado muestra que el DNA del parásito no es metilado y que contiene motivos CpG.

CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE TLR9

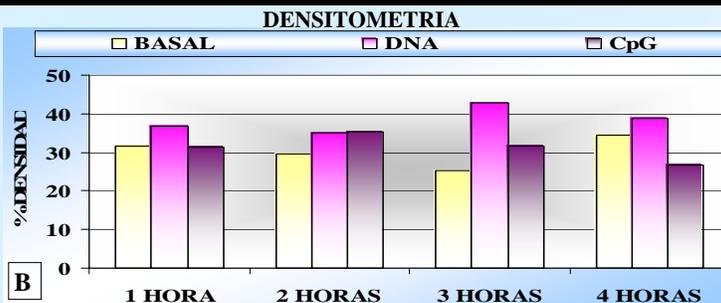
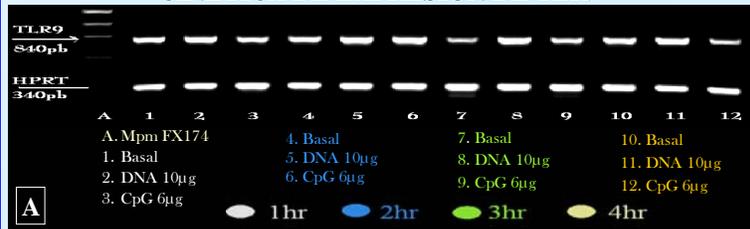


Fig. 2) MDMO de ratón BALB/c fueron estimulados durante 2, 3 y 4 horas. Se extrajo el RNA y se realizó RT-PCR. Se observa: A) Las bandas del producto del RT-PCR y B) La gráfica del porcentaje de densidad de las bandas. El DNA de *L. mexicana* estimula la expresión del RNA mensajero de TLR9 y esta expresión es mayor a las 3 horas de estímulo.

CONFIRMACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TLR9 A 3 HRS DE ESTIMULO

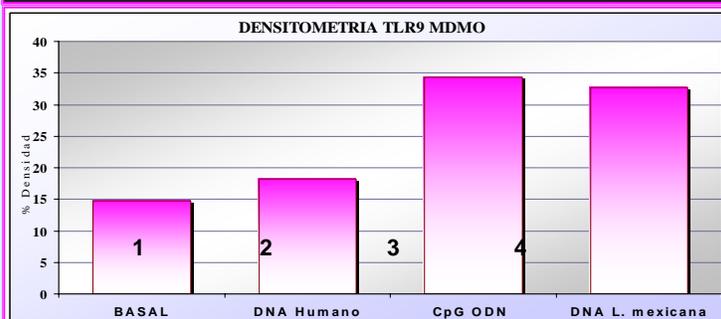


Fig.3) MDMO estimulados durante 3 horas. A) Marcador de peso molecular., 1) MDMO sin estímulo, 2) MDMO + DNA humano, 3) MDMO + CpG, 4) MDMO + DNA *L. mexicana*. Es claro el estímulo de la expresión del RNA mensajero de TLR9 con 3 horas de estímulo, así como de los CpG (control positivo).

CONCLUSIONES

El DNA de *L. mexicana* posee motivos CpG y al no estar metilado es reconocido por el receptor TLR9 de macrófagos murinos. Ésta unión *in vitro* activa la expresión del RNA mensajero de este receptor. Aunque *HpaII* solo corta en el motivo CCGG no se descarta que el DNA del parásito posea otros motivos CG en diferente contexto. Hasta ahora no había reportes de que el DNA de *L. mexicana* fuera reconocido por algún tipo celular. Nosotros comprobamos por primera vez que el DNA de *L. mexicana* puede ser reconocido por el TLR9 de macrófagos murinos de la cepa BALB/c.