

**“EFECTO QUE EJERCE *LEISHMANIA MEXICANA* SOBRE CELULAS NK DE RATONES SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A LA LEISHMANIASIS”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD EN**

***MEDICINA INTERNA***

**PRESENTA:**

**KARINA SANTANA DE ANDA**

**ASESOR DE TESIS**

**DR. ALFONSO GULIAS HERRERO**

**CO-ASESORES:**

**DRA. INGEBORG BECKER FAUSER**

**DR. EDUARDO CARRILLO MARAVILLA**

**MEXICO D.F. 2008**



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.

## **AUTORIZACIÓN**

**ASESOR:**

**DR. ALFONSO GULIAS HERRERO**

**CO-ASESORES:**

**DRA. INGEBORG BECKER FAUSER**

**DR. EDUARDO CARRILLO MARAVILLA**

**DR. LUIS FEDERICO USCANGA DOMÍNGUEZ**

*DIRECTOR DE ENSEÑANZA*

## INDICE

1. ANTECEDENTES .....	3
2. MARCO TEORICO.....	7
3. JUSTIFICACION.....	7
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
5. OBJETIVOS.....	8
6. HIPOTESIS.....	9
7. MATERIAL Y METODOS.....	9
8. DISEÑO.....	11
9. POBLACION Y MUESTRA.....	11
10. PLAN ESTADISTICO.....	11
11. ASPECTOS ETICOS.....	11
12. RESULTADOS.....	12
13. CONCLUSIONES.....	20
14. DISCUSION.....	21
15. BIBLIOGRAFIA.....	24

## **ANTECEDENTES**

En México la leishmaniasis es un problema de salud pública, especialmente en los estados de Chiapas, Tabasco, Oaxaca, Quintana Roo y Veracruz, registrándose hasta 400 nuevos casos anualmente en las zonas altamente endémicas.

*Leishmania mexicana* es la especie responsable de la leishmaniasis cutánea y México es uno de los pocos países a nivel mundial en el que se encuentran pacientes con las dos formas clínicas de leishmaniasis cutánea, las cuales son: leishmaniasis cutánea localizada y leishmaniasis cutánea diseminada.

La leishmaniasis cutánea localizada (LCL) ó “úlceras de los chicleros”, se caracteriza por presentar una ulceración en el sitio del piquete, pequeña y única, de forma redonda, con bordes indurados e indolora, cursando el paciente con una evolución clínica relativamente benigna, con curación en un periodo aproximado de 6 meses a dos años, debido a una respuesta inmune celular protectora. En el polo opuesto se encuentran los pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) ó leishmaniasis leproide; estos pacientes presentan diseminación de los parásitos desde el nódulo inicial a todo el tegumento debido a una anergia de la respuesta celular hacia la leishmania.

Los pacientes con LCD se caracterizan por tener una carga importante de parásitos, y generalmente mueren por invasión de las mucosas oral y nasofaríngeas, llevando al paciente a problemas de inanición y asfixia.

Uno de los grandes enigmas de la leishmaniasis es la causa de la diseminación del parásito; se piensa que el momento decisivo de la evolución del padecimiento

tiene lugar en las primeras fases de la infección, en donde participa el sistema inmune innato.

El reconocimiento de patógenos por el sistema inmune innato está mediado por un sistema de receptores que reconocen patrones moleculares conservados, asociados a patógenos microbianos. Entre estos receptores se encuentran los receptores Toll, los cuales fueron identificados originalmente en el sistema inmune de la *Drosophila* y en 1997 fueron descubiertos también en células de mamíferos por Janeway y Medzhitov (1). En los mamíferos, éstos receptores reciben el nombre de TLR (Toll-like receptors) por ser muy semejantes a los receptores Toll, lo cual revela que forman parte de un mecanismo de defensa ancestral, conservado a lo largo de la evolución.

El sistema inmune innato, utiliza receptores de la familia Toll para señalar la presencia del microorganismo al sistema inmune innato del huésped. Los receptores TLR reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) específicos, los cuales generalmente se encuentran en estructuras cruciales para la supervivencia del patógeno, por lo que tienden a ser compartidos por grandes grupos de bacterias, virus u hongos y no están sujetos a variabilidad antigénica.

En la actualidad se han descrito 10 distintos TLRs y se conocen los ligandos de tres de ellos. El primer TLR descrito fue el TLR-4 y se ha encontrado que es activado por LPS (componente de la pared celular de bacterias gram-negativas) así como por una proteína viral (4,5). TLR-5 es activado por flagelina (proteína de bacterias flageladas como listeria).

Una vez activado el TLR se inicia una cascada de señales intracelulares que eventualmente activan el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual se encarga de regular la actividad de genes que producen citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1. El receptor TLR-2 puede activar el factor nuclear NF- $\kappa$ B y adicionalmente puede inducir apoptosis mediante la proteína asociada al dominio de muerte de Fas (FADD) y caspasa 8 (7). Estos datos indican que TLR-2 además de ser un receptor de la respuesta inmune innata que induce a la respuesta inmune adaptativa, también es un novedoso receptor de la muerte que es capaz de activar la maquinaria apoptótica sin tener un dominio citoplasmático propio de la muerte.

La habilidad del sistema inmune innato de producir citocinas proinflamatorias, compuestos antimicrobianos y moléculas coestimuladoras de manera rápida es crucial en la defensa del huésped, ya que la inducción de la respuesta inmune adaptativa puede tardar días a semanas en establecerse.

En mamíferos los TLRs se encuentran en leucocitos, principalmente macrófagos y células dendríticas, así como en epitelios intestinales y respiratorios. Otra célula que pertenece al sistema inmune innato y que expresa TLRs son las células NK (8). La participación de las células NK en la respuesta inmune innata es dual, ya que participa como célula citotóxica y como célula productora de citocinas, principalmente IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$ , ambas con la capacidad de inducir una respuesta inmune tipo TH-1, la cual es crucial para la adecuada activación del macrófago.

En la actualidad, se sabe poco sobre la participación de las células NK en la leishmaniasis; en modelos experimentales se ha demostrado que el IFN- $\gamma$ ,

producido por las células NK es un mediador crucial para la resistencia innata hacia la leishmaniasis. Laskay ha encontrado que la depleción temprana de células NK de ratones naturalmente resistentes los transforma en animales altamente susceptibles a la leishmaniasis progresiva y mortal (9).

Recientemente se demostró en la unidad de medicina experimental, en el Hospital General de México, que las células NK tienen receptores TLR-2, los cuales reconocen al lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana*, provocando la activación de la célula NK (10). Esta activación lleva a la producción de citocinas y a una sobre-expresión del receptor TLR-2 por la célula. Esta demostración de la interacción directa entre células NK y la *Leishmania*, abre un nuevo campo para estudiar la participación de éstas células en la fisiopatogenia de la leishmaniasis. El análisis de la participación de receptores y células de la respuesta inmune innata posiblemente permitirá entender la causa de la anergia hacia el parásito encontrada en pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada, en la que se encuentra la diseminación incontrolada del parásito.

En el presente proyecto se analizará la participación de células NK en la evolución de la leishmaniasis en modelos murinos susceptibles (BALB-c) y resistentes (C57BL/6) a la leishmaniasis. Además se analizará de manera comparativa la participación de receptores TLR-2 en la producción de citocinas.



## MARCO TEORICO

Recientemente se describió que células de la respuesta inmune innata tienen receptores tipo TLR, los cuales filogenéticamente son ancestrales y compartidos con plantas e insectos. Se encontró que dichos receptores reconocen patrones moleculares compartidos entre varios microorganismos; dentro de éstos patrones se encuentra la LPG de *Leishmania*. Sin embargo, en la actualidad, aún se desconoce el papel que desempeñan éstos receptores en cuanto a la evolución de la enfermedad.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se desconoce la causa de la diseminación de *Leishmania mexicana* en pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada; se piensa que la respuesta inmune innata determina el tipo de evolución clínica, ya sea hacia la forma benigna (leishmaniasis cutánea localizada) ó hacia la maligna (leishmaniasis cutánea diseminada). Recientemente se describió que las células NK pueden reconocer directamente a *Leishmania mexicana* mediante receptores TLR-2, por lo que en el presente proyecto se analizará la participación de células NK a través de receptores TLR-2 en la evolución clínica de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57) a la leishmaniasis.

## **JUSTIFICACION**

Este estudio aportará datos novedosos sobre mecanismos de regulación y evasión que ejerce *Leishmania* sobre células del sistema inmune innato, principalmente células NK, y permitirá ampliar los conocimientos sobre la posible causa de la susceptibilidad al parásito encontrada en ratones susceptibles (BALB/c) y en pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Realizar estudios comparativos de la producción de citocinas y la expresión de receptores TLR-2 en células NK de ratones de ambos sexos susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) a la leishmaniasis.

### **Objetivos particulares:**

1. Obtener células NK a partir del bazo de ambos sexos y ambas cepas de ratones (BALB/c y C57BL/6).
2. Analizar la expresión del mRNA de TLR-2 en células NK obtenidas de ambos sexos y ambas cepas de ratones por RT-PCR en condiciones basales y estimuladas por LPG de *Leishmania mexicana*.
3. Analizar la producción de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10) por ELISA en células NK estimuladas con LPG de *Leishmania mexicana*.

4. Infectar ratones BALB/c y C57BL/6 con *Leishmania mexicana* y repetir los objetivos anteriores en distintas etapas de la evolución clínica del padecimiento (a los 3 y 6 meses de infección).
5. Realizar una cinética de la infección por medio de mediciones del grosor del cojinete plantar infectado en ambos sexos y ambas cepas de ratón.

## **HIPOTESIS**

Existe una correlación entre la susceptibilidad a la *Leishmania mexicana* y una disminución en la expresión y funcionamiento de los receptores TLR-2 en células NK.

## **MATERIAL Y METODOS**

### ***Obtención de células NK a partir del bazo***

se infectaron 160 ratones de cada cepa con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *Leishmania mexicana* en el cojinete plantar inferior derecho. Se analizó la evolución clínica midiendo el incremento del grosor del cojinete mediante un vernier. Se sacrificaron 10 animales de cada cepa al mes mediante dislocación cervical, se obtuvo el bazo de cada animal y posteriormente con un kit especial de la marca MACS y mediante columnas magnéticas, por selección negativa, se obtuvieron células NK purificadas. De manera comparativa se analizaron las células NK entre las dos cepas de ratones infectados y adicionalmente se compararon con células NK obtenidas de ratones sanos de ambas cepas. Se incubaron  $1 \times 10^6$  células NK de cada cepa de ratones con 10 µg/ml de LPG purificado en 1 ml del medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10% por 18 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los sobrenadantes fueron colectados para la cuantificación de citocinas y las células NK se congelaron en 1 ml de trizol a -70°C.

### ***Aislamiento del mRNA y RT-PCR del TLR-2***

Se extrajo el mRNA de las células previamente congeladas en trizol, posteriormente se llevó a cabo la retrotranscripción con super script, se cuantificó la cantidad de DNA obtenido para posteriormente hacer la reacción en cadena de la polimerasa utilizando platino Taq; se realizó la amplificación

de oligonucleótidos específicos para TLR-2 de ratón; el PCR se realizó con el sistema Perkin Elmer Gene Amp 2400. Una vez hecha la PCR se prosiguió a correr el gel de agarosa al 1.5%.

### ***ELISA para IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-10***

A partir del sobrenadante obtenido de las células NK co-incubadas con LPG de *Leishmania mexicana*, se determinaron las concentraciones de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 mediante la técnica ELISA sándwich utilizando un kit comercial.

### **DISEÑO**

Estudio experimental comparativo y prospectivo. Permitirá analizar el funcionamiento de las células NK expuestas a *Leishmania mexicana* y adicionalmente permitirá analizar los cambios que ocurren en éstas células durante distintas etapas de la infección en animales genéticamente susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) a la leishmaniasis.

### **POBLACION Y MUESTRA**

Células NK obtenidas a partir del bazo de ratones de ambos sexos BALB/c y C57BL/6 sanos (de 6 a 8 semanas de edad) e infectados a los 3 y 6 meses de evolución.

## **PLAN ESTADISTICO**

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la U de Mann Whitney.

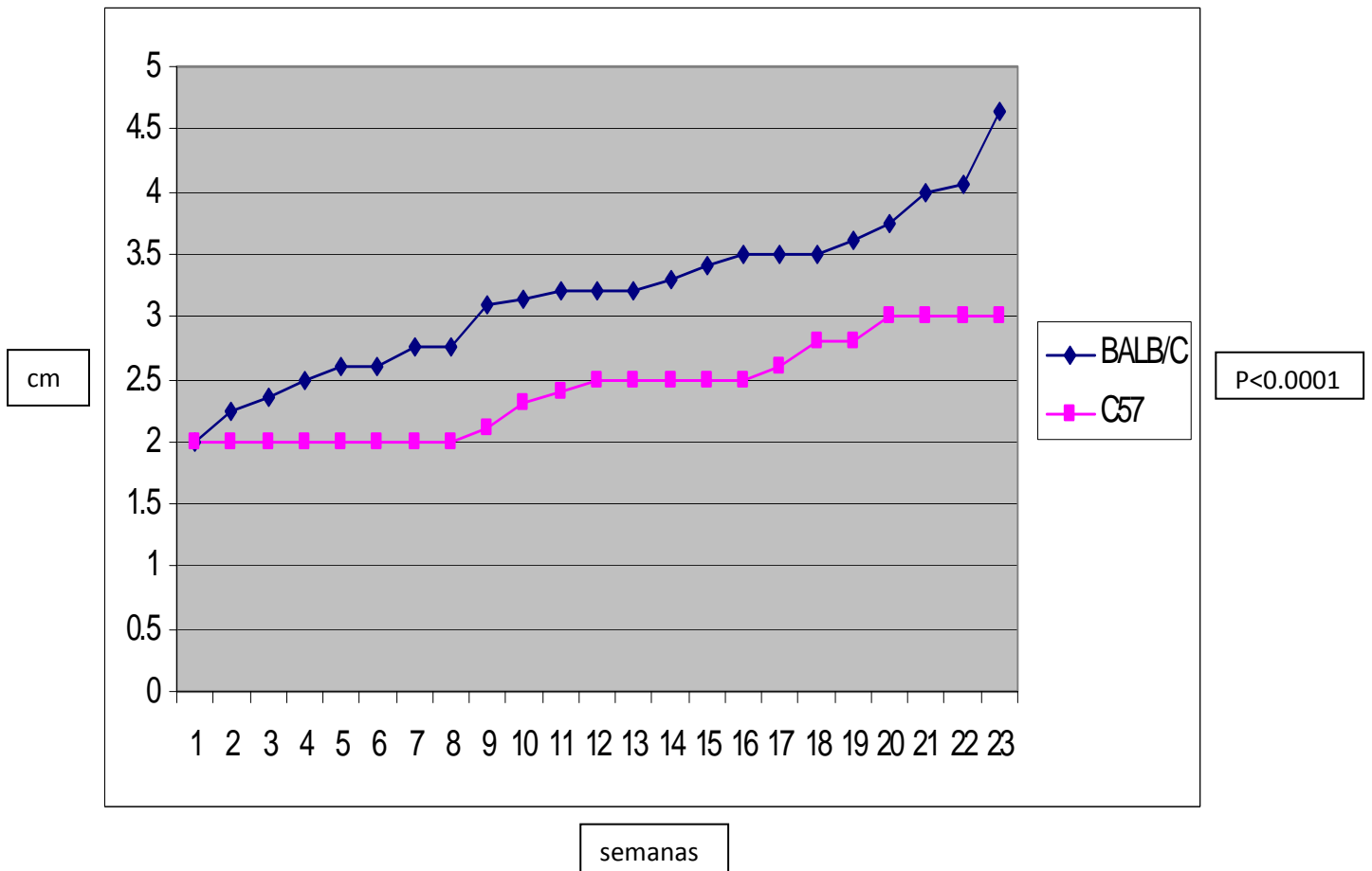
## **ASPECTOS ETICOS**

Se aplicó la norma establecida por la A.M.C.A.L. (Asociación mexicana de la ciencia de los animales de laboratorio) para bioterios.

## RESULTADOS

### *Cinética de la infección:*

Al realizar mediciones semanalmente del grosor de la pata infectada de ambas cepas de ratón, se obtuvieron los siguientes datos:



Se observó que la cepa susceptible (BALB/c) desarrolló lesiones significativamente mayores a las lesiones desarrolladas por la cepa resistente



(C57BL/6). No se observaron diferencias entre machos y hembras de ninguna cepa.

**Citocinas:**

Al analizar las citocinas secretadas por las células NK por el método de ELISA en ratones BALB/c se obtuvieron los siguientes resultados:

**Ratones hembras sanas BALB/c**

	<b>BASAL</b>	<b>ESTIMULADO</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>P</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0 pg	136.9 pg	136.9 pg	<0.05
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	54.7 pg	38.1 pg	-16.6 pg	<0.05
<b>IL-10</b>	250 pg	398.4 pg	148.4 pg	<0.05

**Ratones machos sanos BALB/c**

	<b>BASAL</b>	<b>ESTIMULADO</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>P</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0 pg	87.1 pg	87.1 pg	<0.05
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	56.06 pg	27.63 pg	-28.43 pg	<0.05
<b>IL-10</b>	0 pg	250.2 pg	250.2 pg	<0.05

En células NK de ratones BALB/c sanos estimuladas con LPG de *Leishmania mexicana* se observó un incremento significativo tanto en TNF- $\alpha$  como en IL-10 y una disminución significativa de IFN- $\gamma$  en ambos sexos.

### Ratones hembras BALB/c infectadas de 3 meses

	<b>BASAL</b>	<b>ESTIMULADO</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>P</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	83.6 pg	99.9 pg	16.3 pg	<0.05
<b>IL-10</b>	281.6 pg	381.6 pg	100 pg	<0.05

### Ratones machos BALB/c infectados de 3 meses

	<b>BASAL</b>	<b>ESTIMULADO</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>P</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	88.6 pg	62.4 pg	-26.2 pg	<0.05
<b>IL-10</b>	171.6 pg	295.4 pg	123.8 pg	<0.05

A los tres meses de infección se observó, en células NK de ratones hembras BALB/c, un incremento significativo tanto de IFN- $\gamma$  como de IL-10, pero en machos se observó una disminución de IFN- $\gamma$  y un aumento de IL-10.

Es notorio que el incremento de IL-10 es menor al observado anteriormente (ratones sanos).

### Ratones hembras BALB/c infectadas de 6 meses

	<b>BASAL</b>	<b>ESTIMULADO</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>P</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	76.7 pg	139.5 pg	62.8 pg	<0.05
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	60.9 pg	0 pg	-60.9 pg	<0.05
<b>IL-10</b>	20 pg	82.7 pg	62.7 pg	<0.05

### Ratones machos BALB/c infectados de 6 meses

	<b>BASAL</b>	<b>ESTIMULADO</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>P</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	37.1 pg	65.7 pg	28.6 pg	<0.05
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	118.7 pg	36.2 pg	-82.5 pg	<0.05
<b>IL-10</b>	60.1 pg	141.6 pg	81.5 pg	<0.05

A los seis meses de infección se observó, en células NK de ratones BALB/c, un incremento significativo tanto de TNF- $\alpha$  como de IL-10, así como una disminución significativa de IFN- $\gamma$  en ambos sexos.

Es notorio que el incremento tanto de TNF- $\alpha$  como de IL-10 son menores a los observados en las etapas anteriores de la infección (ratones sanos e infectados de 3 meses), lo que indica que conforme avanza la infección, la secreción de citocinas va disminuyendo gradualmente.

El incremento de IFN- $\gamma$  observado en las hembras a los tres meses de infección, es un fenómeno transitorio, ya que a los seis meses de infección se intensificó la inhibición observada al inicio.

Al analizar por ELISA las citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10) en ratones C57 sanos, infectados de 3 y 6 meses, se obtuvieron los siguientes resultados:

### Ratones hembras C57 sanas

	<b>BASAL</b>	<b>ESTIMULADO</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>P</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0 pg	41.7 pg	41.7 pg	<0.05
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	37.5 pg	48.6 pg	11.1 pg	<0.05
<b>IL-10</b>	39.4 pg	176.2 pg	136.8 pg	<0.05

### Ratones C57 machos sanos

	<b>BASAL</b>	<b>ESTIMULADO</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>P</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0 pg	90.8 pg	90.8 pg	<0.05
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	52.1 pg	128.7 pg	76.6 pg	<0.05
<b>IL-10</b>	0 pg	70.6 pg	70.6 pg	<0.05

En células NK de ratones C57 sanos, estimuladas con LPG de *Leishmania mexicana*, se observó un incremento significativo de las tres citocinas en ambos sexos.

### Ratones hembras C57 infectadas de 3 meses

	<b>BASAL</b>	<b>ESTIMULADO</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>P</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	141.5 pg	246.5 pg	104.9 pg	<0.05
<b>IL-10</b>	28.6 pg	49.1 pg	20.5 pg	<0.05

### Ratones machos C57 infectados de 3 meses

	<b>BASAL</b>	<b>ESTIMULADO</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>P</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	195 pg	387.2 pg	192.2 pg	<0.05
<b>IL-10</b>	60.9 pg	80.2 pg	19.3 pg	<0.05

A los 3 meses de infección, en células NK de ratones C57, se observó un incremento significativo tanto de IFN- $\gamma$  como de IL-10 en ambos sexos.

Es notorio que el grado de incremento del IFN- $\gamma$  es mayor al observado en ratones sanos, sin embargo, el grado de incremento de IL-10 es menor al observado en ratones sanos.

#### **Ratones hembras C57 infectadas de 6 meses**

	<b>BASAL</b>	<b>ESTIMULADO</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>P</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	37.1pg	98.4 pg	61.3 pg	<0.05
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	134.8 pg	254.6 pg	119.8 pg	<0.05
<b>IL-10</b>	75.5 pg	91.6 pg	16 pg	<0.05

#### **Ratones machos C57 infectados de 6 meses**

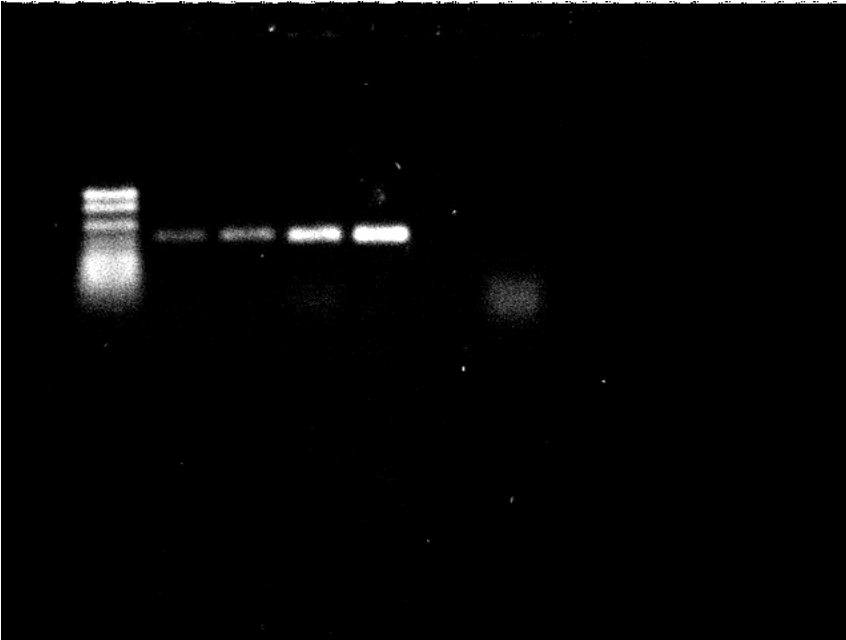
	<b>BASAL</b>	<b>ESTIMULADO</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>P</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	53.3 pg	153.2 pg	99.9 pg	<0.05
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	87.6 pg	261.8 pg	174.2 pg	<0.05
<b>IL-10</b>	12.5	40.7 pg	28.2 pg	<0.05

A los 6 meses de infección, en células NK de ratones C57, se observó un incremento significativo de las tres citocinas en ambos sexos.

Es notorio que conforme avanza la infección, el grado de aumento tanto de TNF- $\alpha$  como de IFN $\gamma$  es mayor y el de IL-10 es menor, lo que supone que en ésta cepa, conforme avanza la infección, se incrementa gradualmente la secreción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y se disminuye gradualmente la secreción de IL-10.

## RT-PCR

Al realizar RT-PCR de ambas cepas de ratón, se observaron los siguientes cambios en cuanto a la expresión de TLR-2:



Carril 1: pesos moleculares

Carril 2: células NK de ratones BALB/c en estado basal

Carril 3: células NK de ratones BALB/c estimuladas con LPG

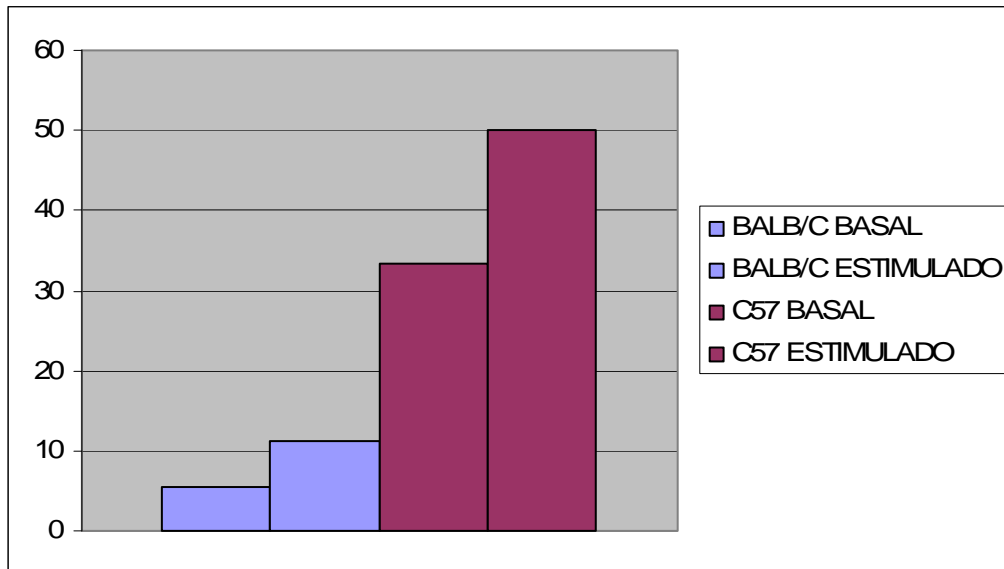
Carril 4: células NK de ratones C57 es estado basal

Carril 5: células NK de ratones C57 estimuladas con LPG

Se observó que la expresión del receptor TLR-2 en células NK en estado basal es mayor en la cepa resistente que en la susceptible, y cuando las células son

estimuladas con LPG de *Leishmania mexicana*, la expresión del receptor TLR-2 aumenta significativamente en ambas cepas.

Se realizó la densitometría de las bandas obtenidas en el gel de agarosa, y los resultados obtenidos fueron los siguientes:



## CONCLUSIONES

Existe una cepa murina susceptible (BALB/c) y una resistente (C57) a la infección por *Leishmania mexicana*.

En la cepa susceptible (BALB/c) el tamaño de las lesiones fue significativamente mayor que en la cepa resistente (C57).

Las células NK respondieron de manera opuesta al estímulo con LPG de *Leishmania mexicana* entre las 2 cepas de ratón:

Las células NK de ratones susceptibles (BALB/c) mostraron una disminución significativa en la secreción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , y en menor grado de IL-10 a lo largo de la infección.

Las células NK de ratones resistentes (C57) mostraron un incremento significativo en la secreción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , y en menor grado de IL-10 a lo largo de la infección.

Existe una mayor expresión del receptor TLR-2 en la cepa resistente, tanto en células NK en estado basal como en células NK estimuladas con LPG, en comparación con la expresión en la cepa susceptible.

Se correlaciona la susceptibilidad a la leishmaniasis del ratón BALB/c con una baja expresión de TLR-2 y baja producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por las células NK.



## DISCUSION

El presente trabajo, es el primero que analiza la participación de la respuesta inmune innata, específicamente de células NK, en la evolución de la leishmaniasis en modelos murinos susceptibles y resistentes a la infección por *Leishmania mexicana*. El análisis de la célula NK es importante debido a que es una de las primeras células de la respuesta inmune innata capaz de secretar TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Estas citocinas son cruciales en la infección por *Leishmania*, ya que son las encargadas de activar macrófagos, incrementando su capacidad leishmanicida, la cual consiste en incrementar la producción de radicales de oxígeno y óxido nítrico. Recientemente se demostró que la célula NK puede reconocer directamente a patógenos mediante receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos como son los TLRs. La demostración del reconocimiento directo de la LPG de *Leishmania mexicana* por la célula NK mediante receptores TLR-2 realizada en humanos, arrojó una nueva interrogante sobre la posible participación de éstas células y éstos receptores en determinar el tipo de evolución clínica, para lo cual fue indispensable trabajar con modelos murinos susceptibles y resistentes a la enfermedad.

Este trabajo, realizado en modelos murinos, nos permitió analizar la participación de la célula NK en determinar la susceptibilidad ó la resistencia a la leishmaniasis. Encontramos que las citocinas secretadas por células NK estimuladas con LPG difieren entre la cepa susceptible y resistente a la leishmaniasis. Mientras que

células NK de la cepa resistente producen una mayor cantidad de citocinas activadoras (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), las células NK de la cepa susceptible producen una mayor cantidad de IL-10, citocina inhibitoria del macrófago que permite la replicación del parásito intracelular. Este hallazgo permite correlacionar de manera directa las citocinas secretadas por células NK y la susceptibilidad o resistencia a la leishmaniasis.

Otro hallazgo importante es la diferencia en la expresión de receptores TLR-2 entre células NK de ambos grupos de animales. En condiciones basales, la expresión fue mayor en la cepa resistente; al estimular las células NK con LPG de *Leishmania mexicana*, se observó un incremento en la expresión del TLR-2 en ambas cepas de ratón, aunque el incremento fue proporcionalmente mayor en la cepa susceptible. Este hallazgo revela una discrepancia entre la secreción de citocinas y la expresión de TLR-2 en células NK estimuladas con LPG de ratones BALB/c. El incremento en la expresión de TLR-2 asociado con la disminución en la producción de citocinas, apunta a que posiblemente exista un defecto en el funcionamiento de TLR-2 en células NK de ratones susceptibles. Este defecto pudiera deberse a deficiencias en el reconocimiento de LPG, o bien, a problemas en la transducción de señales del receptor, impidiendo finalmente la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la subsecuente síntesis de citocinas como TNF- $\alpha$ . Por otro lado, la baja síntesis de IFN- $\gamma$  por células NK de animales susceptibles, pudiera estar mediada por la baja producción de TNF- $\alpha$  por éstas células, lo cual reduce la estimulación autócrina de la célula.

El haber encontrado diferencias en la expresión del receptor TLR-2 y en la producción de citocinas entre células NK provenientes de modelos animales susceptibles y resistentes a la leishmaniasis, revela por primera vez que una de las posibles causas de la susceptibilidad radica a nivel de células y receptores de la respuesta inmune innata. Esto permitirá en un futuro, realizar estudios a nivel molecular sobre las posibles alteraciones de TLR-2 responsables de la baja producción de citocinas activadoras que predisponen al humano a padecer leishmaniasis cutánea diseminada, la forma progresiva de la enfermedad. El poder conocer mecanismos moleculares responsables de la deficiente respuesta inmune ante la *Leishmania*, permitirá el diseño racional de terapias preventivas y curativas.

## BIBLIOGRAFIA

Medzhitov, R., Preston-Hudburt, P., Janeway, C.A. Jr. *Nature*, 388, 394-397 (1997)

Polporak, A. et al. *Science*, 282, 2085-2088 (1988)

Kurt-Jones, E.A. et al. *Nature Immunol.*, 1, 398-401 (2000)

Means, T.K. et al. *J. Immunol.*, 163, 3920-3927 (1999)

Werts, C. et al. *Nature Immunol.*, 2, 346-352 (2001)

Aderem, A. et al. *Nature* 410 (2001)

Aliprantis, A.O. et al. *Science*, 285, 736-739 (1999)

Flo, T.H. et al. *J. Leuko. Biol.* 69, 474-481 (2001)

Laskay, et al. *E.J. Immunol*, 25, 220-227 (1995)

Becker et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* (2003)