



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

“Efecto de los amastigotes de *Leishmania mexicana*
en la apoptosis inducida con camptotecina en las
células dendríticas derivadas de monocitos humanos”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ELEANÈ DE OYARZABAL MÈNDEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
2011**



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.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al proyecto IN220207 de PAPIIT DGPA UNAM por el otorgamiento de beca por un año.

También se agradece al proyecto 79996 de CONACYT por su apoyo.

A mis sinodales por su invaluable trabajo así como por su tiempo invertido y su amistad

A mi papà Por apoyarme siempre, darme la confianza que necesito para hacer las cosas, impulsarme, enseñarme otros mundos y apapacharme cuando lo necesito. Eres de las personas màs importantes para mì y que me enseña con su ejemplo de vida, estoy muy orgullosa de ser tu hija. Gracias por todo

A mi mamà Por quererme con todo su corazón, mimarme, llevarme a la escuela, hacerse cargo de mi, regañarme cuando lo necesito y compartir sus experiencias conmigo. Eres muy buena mamá y persona y sin ti no estaria en donde estoy. Gracias mamita

A mi abuelo Por haber sido mi guía, mi amigo y hacerme sentir feliz y plena estando a su lado

A mayas Por ser mi hermanita, empaparme con sus experiencias y ser una luz en mi vida muy importante.

A chulis Por todas las plàticas que me ayudaron, las vivencias, los viajes y las risas.

A Rume Por todos los consejos de mujer a mujer, enseñarme de la vida, darme tips, prestarme libros y hacerme crecer.

A Felipe Por ser mi amor, mi luz, quererme y aceptarme como soy, por todos estos años que han sido tan felices a tu lado, nuestros viajes, secretos, aventuras, consejos y aprendizaje. Me has enseñado a amar y lo importante que es la confianza.

A Cristy y Felipe Por haberme apoyado siempre que lo he necesitado, por compartir su tiempo y sus cosas conmigo, por ser un pilar y un ejemplo para mì e impulsarme a hacer las cosas bien.

A Cristinita Para mi eres como mi hermana y te quiero con todo mi corazón, gracias por tu amistad, tu confianza, tu discreción y nuestras aventuras. Lo que siento por ti nunca va a cambiar y se que todo lo que te propongas lo vas a lograr. Te quiero mucho

A Miri Por todos esos violetazos y también porque no, también por nuestras etapas de Rosas del Alba, gracias por ser una amiga incondicional, hacerme reir, contarme todas esas anécdotas incontables y escuchar las mias sin juzgarlas sino siempre viendo lo bueno del asunto, por hacer que el Servicio fuera pura alegría y fiesta, por los momentos en el cubículo, los comentarios de los libros, los tejidos, las canciones, los desastres.

A Ady Por todos esos momentos en el café, por a veces ser mi mamà, por cada uno de los momentos vividos, por esos días en la cubeta, los bailes, las risas, las fiestas, los

llantos y por todas las experiencias compartidas, eres una personita que siempre me dio buenos consejos y mejores enseñanzas. Gracias nena

A Roberto Briones Por ser el mejor jefe del mundo, apoyarme siempre, enseñarme a trabajar, ser paciente siempre conmigo y hacerme sentir feliz en el laboratorio. Que fueras mi guía en el servicio fue lo mejor que me pudo pasar. Gracias

A Javier Por mostrarme siempre otro punto de vista, rockear conmigo, filosofar todo el tiempo, enseñarme de música así como por tu actitud siempre optimista, por enseñarme a creer en la gente y querer hacer una realidad mejor para todos, nunca voy a olvidar ese viaje donde conocí a uno de mis mejores amigos.

A Ceci Por darme asilo en Canadá y hacerme sentir como en mi casa, abrirme su corazón, tener siempre la palabra correcta en el momento indicado y saber decir sus opiniones.

Al mùegano. A Angie: Eres la persona màs diferente a mì y tambièn a la que màs quiero, nunca habìa compartido con alguien mi ser como lo hice contigo, gracias por todos los momentos y por ser tan sincera, tan real y fantàstica ¿Què te puedo decir? Gracias por todo. Dinoh: Eres la niña màs noble que conozco y con sentimiento màs puros; gracias por tu amistad, el viaje a Acapulco, los consejos y tus "ay nena" que no sabes cuanto me sirvieron. Vane: Gracias por tus risas, tu forma de ser tan luminosa, por apoyarme y compartir siempre como una verdadera amiga; te quiero mucho.

A mis amigos del lab. Marck: Gracias manguito perivascular por ser un excelente amigo, compañero y confesor, sin ti no hubiera sido lo mismo el laboratorio, todas esos juegos, esas risas, consejos y llantos se quedaràn grabados en mi para siempre. Jesùs: Gracias por enseñarme todo lo que se del laboratorio de la mejor forma que me pudiste haber enseñado, por ser mi maestro y amigo y por todos esos cafés donde aprendì mucho y te conocì màs. Diana: Gracias por hacerme la vida en el lab màs amena, provocarme tantas risas e inventar tantas cosas divertidas. Edith: Gracias por enseñarme a trabajar impecable siguiendo tu ejemplo y dejarme conocerte un poco màs y sobre todo gracias por tu sinceridad, Cristy: Fuiste mi mamà y amiga en el lab, sin ti no lo hubiera logrado, gracias por tu paciencia, tus enseñanzas y tus consejos; te quiero mucho. Norma: Por tu excelente trabajo, tu puntualidad y tu siempre buena disposiciòn para hacer las cosas, fue un placer conocerte màs y aprender de ti.

Por ùltimo, gracias a todos y acda uno de mis amigos que me impulsaron, me hicieron crecer, llorar y ser quien soy. Los quiero mucho.

1 I INTRODUCCIÓN	8
1.1 Las células del sistema inmune	8
1.2 Los monocitos	9
1.3 Las células dendríticas	11
1.3.1 Subpoblaciones de células dendríticas humanas	12
1.3.2 Células dendríticas derivadas de monocitos humanos	13
1.4 <i>Leishmania</i>	15
1.4.1 Leishmaniasis cutánea	15
1.4.2 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	16
1.5 Interacción de las células con el hospedero y evasión de la respuesta inmune por parte de <i>Leishmania</i>	18
1.6 Interacción de <i>Leishmania</i> con las células dendríticas	18
1.6.1 Interacción de <i>Leishmania</i> con las moDC	19
1.7 La apoptosis	20
1.7.1 Identificación de la apoptosis	20
1.7.2 Vías de inducción de apoptosis	21
1.7.3 La Vía intrínseca	21
1.7.4 Mecanismos de regulación de la apoptosis por la vía intrínseca	22
1.8 Inducción de apoptosis por la camptotecina	23
1.9 Las caspasas	24
1.9.1 La caspasa-3	25
2 Modulación de la apoptosis por diferentes organismos patogénicos	25
2.1 Interacción del parásito <i>Leishmania</i> con componentes celulares que modulan la apoptosis	26
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
III. HIPÓTESIS	28

IV. OBJETIVO	28
V. MATERIAL Y MÉTODOS	29
V.1. Purificación de células dendríticas derivadas de monocitos humanos.	29
V.2 Caracterización de las moDC	29
V.3 Cultivo de amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>. 31, 41	
V.4. Caracterización de los amastigotes de <i>L. mexicana</i>. 32	
V.5. Curvas de crecimiento de los amastigotes de <i>L. mexicana</i>	32
V.6 Análisis de viabilidad de los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	32
V.7 Infección de las moCDS con los parásitos de <i>L.mexicana</i>	33
V.8 Inducción de apoptosis con camptotecina en las moDC	33
V.9 Tratamiento de las moDC.	34
V.10 Citometría de flujo de Anexina-V/7AAD	34
V.11 Análisis de fragmentación del DNA por TUNEL	35
V.12 Western Blot para análisis de activación de Caspasa-3.	36
V.13 Microscopía electrónica para el análisis de cambios morfológicos de las moDC asociados a la apoptosis	37
VI Resultados	37
VI.1 Obtención de monocitos a partir de sangre periférica humana	37
VI.2 Obtención y caracterización de moDC humanas	38
VI.3 Obtención y caracterización de amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	41
VI.3.1 Curvas de crecimiento de amastigotes y pH de <i>Leishmania mexicana</i>	42
VI.4 Infección de las moDC con los parásitos de <i>L.mexicana</i>	44
VI.5 Inducción de apoptosis en las moCD's con camptotecina	44
VI.6 Efecto de los amastigotes de <i>L. mexicana</i> en la translocación de la PS en las moCD's determinada por citometría de flujo Anexina-V/7AAD	47
VI.7 Análisis de fragmentación de DNA en amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> ... 49	

VI.8 Efecto de amastigotes de <i>L.mexicana</i> en apoptosis inducida en moCD's por kit TUNEL de fragmentación de DNA.....	49
VI.9 Los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> inhiben el corte proteolítico de la caspasa 3.....	51
VI.10 Efecto de los amastigotes de <i>L. mexicana</i> en la apoptosis inducida en las moCD's analizado por microscopía de barrido.....	52
VII. DISCUSIÓN	54
VIII CONCLUSIONES	60
IX BIBLIOGRAFÍA.....	61

I. INTRODUCCIÓN

1.1 El sistema inmune

El sistema inmune actúa como sensor de los microorganismos, a través de diferentes receptores y vías de señalización del hospedero y participa en las interacciones mutualistas o antagonistas que el hospedero mantiene con los microorganismos del medio. Otra de sus funciones es la de inducir los mecanismos de defensa antimicrobianos (Iwasaki and Medzhitov, 2010) y las respuestas inmunitarias, las cuales son mediadas por los leucocitos que derivan de precursores de la médula ósea (Janeway and Medzhitov, 2002). La importancia del sistema inmune no sólo radica en mantener la homeostasis hospedero-microbios o montar una respuesta contra organismos patogénicos, sino también en la capacidad de distinguir las células, los tejidos y los órganos que son parte legítima del hospedero y lo ajeno al mismo. Dentro de lo propio también debe de ser capaz de reconocer células dañadas (Beck and Habicht, 1996).

En los vertebrados las respuestas inmunitarias se dividen en: respuesta inmune innata y respuesta inmune adquirida. La respuesta inmune innata está genéticamente programada para detectar características invariables de los microbios invasores (Iwasaki and Medzhitov, 2010). Se caracteriza por ser una respuesta temprana, codificada en línea germinal y dependiente de receptores invariables que reconocen características comunes de los organismos patogénicos (un receptor puede reconocer varios antígenos). Se encarga de reconocer y destruir microorganismos por mecanismos de defensa tales como la neutralización, la opsonización y la activación del complemento, mismos que no requieren un período prolongado de inducción porque no dependen de la expansión clonal de los linfocitos antígeno-específicos (Janeway 2003).

El sistema inmune innato tiene una parte humoral y una parte celular. La parte humoral son los péptidos antimicrobianos y las opsoninas y la parte celular son las células efectoras e inmunoreguladoras. Otras células del sistema inmune innato son las del sistema fagocítico mononuclear (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) (Auffray, et al. 2009), cuyas funciones van desde la fagocitosis y la degradación de los microorganismos hasta la eliminación de los cuerpos apoptóticos, el daño tisular y la homeostasis del hospedero. Los basófilos y las células cebadas están involucrados en la inflamación y la hipersensibilidad, los eosinófilos son los

encargados de la eliminación de los parásitos extracelulares y las células asesinas naturales eliminan organismos patogénicos mediante la liberación de gránulos citotóxicos.

Entre los sensores microbianos mejor caracterizados son los llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales detectan patrones moleculares relativamente invariables y están asociados a patrones moleculares asociados a organismos patogénicos que son PAMPs (Janeway, 1993). Existen diferentes tipos de PRR's que se han dividido en PRR's de secreción, transmembranales y citosólicos.

Por otra parte, la respuesta inmune adaptativa se fundamenta en la selección clonal de un repertorio de linfocitos T y B que poseen receptores específicos para un antígeno. Es una respuesta tardía que se activa en semanas o hasta meses y se caracteriza por la presencia de linfocitos de memoria específicos para un antígeno, lo cual permite una respuesta más rápida, fuerte y eficaz una vez que el hospedero se vuelve a poner en contacto con el antígeno (Blanco et al., 2009). Los linfocitos B y T presentan dos sistemas distintos de reconocimiento especializado para la detección de los organismos patogénicos basados en dos clases de receptores para los antígenos: las inmunoglobulinas de superficie en las células B y el receptor de antígeno en las células T. Los receptores de las células B reconocen el antígeno extracelular y posteriormente, se activan secretando inmunoglobulinas. Las células T pueden detectar antígenos intracelulares debido a que sus receptores reconocen fragmentos peptídicos de organismos patogénicos intracelulares que han sido transportados a la superficie celular por glucoproteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Janeway 2002).

El reconocimiento de una infección por las células del sistema inmune innato puede llevar a la inducción de respuestas adaptativas a través de la activación de las células dendríticas (Sousa et al., 2003) para lograr el control de la misma.

1.2 Los monocitos

Los monocitos representan aproximadamente el 10% de los leucocitos en la sangre humana y el 4% en la sangre de ratón (Auffray et al., 2009). Se encuentran presentes en mamíferos, aves, anfibios y peces (Herbomel et al., 1999). Se desarrollan a partir de células troncales hematopoyéticas en la médula ósea, las cuales pasan por varios estadios intermedios tales como el progenitor mieloide común (CMP), el progenitor granulocito/macrófago (GMP) y el progenitor de macrófagos/células dendríticas (MDP) (Fogg et al., 2006). El MDP es un precursor común que da origen *in vivo* a los monocitos, los macrófagos y dos subtipos de células dendríticas: las células dendríticas convencionales (cDC) y las plasmacitoides (pDC) (Auffray et al., 2009). Posteriormente al desarrollo en la médula ósea, los monocitos entran al torrente sanguíneo para ser reclutados en los compartimientos extravasculares para mantener la homeostasis del sistema celular monocítico (Leon and Ardavin, 2008). El desarrollo de los monocitos en la sangre es dependiente del factor M-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos). Otras citocinas tales como el GM-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos), el Flt3 y la linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ controlan el desarrollo de los macrófagos y las células dendríticas, pero no son indispensables para el desarrollo de los monocitos (Kanegae et al., 2005). Los monocitos se caracterizan por presentar algunas características particulares, tales como una forma celular irregular, un núcleo ovalado o con forma de riñón y vesículas citoplásmicas; pueden ser definidos por la expresión del M-CSF y el receptor de la quimiocina CX3CR1. Los monocitos son diferentes de los PMN, las células NK y los linfocitos T y B y no expresan CD3, CD19 o CD15 (Auffray et al., 2009). Poseen varios receptores de tipo scavenger que reconocen microorganismos, así como lípidos y células muertas. Los monocitos al ser estimulados producen grandes cantidades de moléculas efectoras involucradas en la defensa contra organismos patogénicos (Serbina et al., 2008). Los monocitos están involucrados en el desarrollo, ya que una de sus funciones es la eliminación de células apoptóticas. En mamíferos, los monocitos también tienen funciones de células accesorias, ya que pueden servir como reservorios de precursores mieloides para la renovación de las células dendríticas y los macrófagos de algunos tejidos (Randolph et al., 1999). Algunos componentes derivados de los organismos patogénicos tales como los los receptores de ligandos tipo Toll (TLR) y los mediadores inflamatorios, al unirse a los monocitos, inhiben el

desarrollo de las células dendríticas (DC) y promueven la diferenciación a macrófagos (Rotta et al., 2003), mientras que la señalización a través de estos receptores en las células dendríticas derivadas de monocitos (moDC) inducen la maduración de las DC (Leon et al., 2005).

Existen dos subpoblaciones de monocitos: una población principal de monocitos grandes o regulares con gran capacidad fagocítica, con actividad de mieloperoxidasa y de liberación del superóxido y una población minoritaria de monocitos pequeños o intermedios con poca actividad de peroxidasa, pero con gran capacidad para producir y liberar IL-1 y para mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Akiyama et al., 1985). Los monocitos regulares son CD14⁺ y CD16⁻, representan del 80 al 90% de los monocitos de sangre, expresan niveles altos del receptor de quimiocina CCR2 y niveles bajos de CXCR3 y *in vitro* producen IL-10 en lugar de TNF e IL-1 en respuesta al LPS. Los monocitos intermedios son positivos para el marcador CD16 y expresan niveles bajos del receptor de quimiocina CCR2 y niveles altos de CXCR3 y *in vitro* producen TNF- α en respuesta a al LPS, por lo que se les considera proinflamatorios (Geissmann et al., 2003).

1.3 Las células dendríticas

Las células dendríticas son una familia heterogénea de leucocitos que regulan las respuestas inmunes (Mellman et al., 1998), ya que integran la información proveniente de los organismos patogénicos o las señales endógenas de peligro y las traducen a los linfocitos (Crozat et al., 2010). Originalmente fueron descritas como una población de células responsables de la llamada actividad de reacción mixta de linfocitos (Steinman and Cohn, 1974). Son de origen hematopoyético, se encuentran en todos los órganos linfoides y se acumulan principalmente en sitios de entrada como las mucosas de los organismos patogénicos (Banchereau et al., 2000; Banchereau and Steinman, 1998). Realizan una gran diversidad de funciones entre las que se encuentran el muestreo del ambiente, la inducción de los mecanismos de defensa contra los organismos patogénicos y las células tumorales, la captura, procesamiento y presentación de antígenos a través de moléculas del MHC clase I y clase II (Savill et al., 2002); (Stuart et al., 2002);

(Steinman et al., 2000); (Steinman et al., 2000) y la presentación de antígenos propios para el desarrollo de los timocitos.

Las células dendríticas presentan dos estadios de maduración. Pueden encontrarse en un estado inmaduro, cuya función principal es la de reconocer antígenos extraños en los diferentes tejidos en los que se encuentran y, una vez que reciben una señal estimuladora apropiada, como PRR las células inmaduras llevan a cabo un programa de maduración acompañado de varios cambios en la morfología de las CD's, la disminución en la capacidad de endocitosis y fagocitosis, la migración de las células a los tejidos linfoides y, posteriormente, la formación de las dendritas típicas (Steinman et al., 1997).

1.3.1 Subpoblaciones de las células dendríticas humanas

Las subpoblaciones de las DC poseen diferencias en el origen, la localización anatómica, el fenotipo de la superficie celular y la función (Banchereau and Steinman, 1998). De acuerdo al origen, las subpoblaciones de células dendríticas se dividen en las que provienen de un precursor de macrófagos/CD's (MDP) que puede dar lugar *in vivo* a monocitos, macrófagos y dos subtipos de células dendríticas: las células dendríticas convencionales (cDC) y las células dendríticas plasmacitoides (pDC). La segunda subpoblación proviene de un precursor común de las células dendríticas (CDP), el cual puede generar células dendríticas convencionales (cDC) o plasmacitoides (pDC), pero no monocitos (Naik et al., 2007) (Onai et al., 2007). Existen dos vías de generación de cDC: la vía CDP involucrada en la homeostasis y la vía MDP involucrada en la inflamación.

Se reconocen también diferentes subpoblaciones de células dendríticas en las que la diferenciación está dada por la presencia de estímulos inflamatorios. La primera subpoblación de DC, las células dendríticas inflamatorias (infDC) se observa sólo bajo condiciones de inflamación y son la mayor fuente de producción de TNF- α en respuesta a una infección patogénica (Iwasaki, 2007). En condiciones basales se reconocen otras dos subpoblaciones principales de acuerdo a los patrones de migración y localización: las células dendríticas residentes en los tejidos linfoides (LT-DC) que se localizan la mayor parte de su vida en los órganos linfoides y pueden encontrarse

con muy baja frecuencia en circulación y las células dendríticas migratorias (mig-DC) que residen en los tejidos no linfoides y pueden migrar a los nódulos linfoides (Croizat et al., 2010). Las LT-DC se dividen a su vez en tres subpoblaciones: las células dendríticas plasmacitoides (pDC) (Cella et al., 1999), las cuales son positivas para el marcador BDCA2 y son consideradas la subpoblación que produce la mayor cantidad de IFN tipo 1 en respuesta a las infecciones virales (Siegal et al., 1999). Las otras dos subpoblaciones están conformadas por dos tipos de células dendríticas convencionales (cCD's), también conocidas como células dendríticas mieloides (mCD's). La primera es BDCA2⁺ (CD11c⁺) y está especializada en la defensa contra organismos patogénicos extracelulares (Croizat et al., 2010) y la segunda que es BDCA3⁺ (CD141⁺) (Dzionek et al., 2000) constituye menos del 0.03% de las células mononucleares de sangre periférica y probablemente se especializa en la presentación de antígenos propios a los timocitos y la defensa contra organismos patogénicos intracelulares (Croizat et al. 2010). Las células dendríticas mieloides (mDC) son las más abundantes y representan alrededor del 80% de las DC en sangre (Dzionek et al., 2000). Para estudios *ex vivo* las mDC pueden ser aisladas de sangre periférica aunque con gran dificultad puesto que sólo representan del 1 al 3% de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Horlock et al., 2007). *In vitro*, las DC derivadas de los monocitos (moDC) pueden ser generadas a partir de los monocitos de sangre periférica (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). La población de las mig-DC abarca varias subpoblaciones con diferentes características; entre ellas las células de Langerhans presentes en la capa estratificada escamosa de la dermis cuando son inmaduras y las células dendríticas dérmicas presentes en la mucosa epitelial ocular, oral y en las superficies vaginales. Tanto las células de Langerhans como las células dendríticas dérmicas pueden migrar a los nódulos linfoides cutáneos en condiciones basales o de inflamación (Croizat et al., 2010).

1.3.2 Células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC)

En 1988 Randolph y colaboradores mostraron que los monocitos humanos pueden diferenciarse a las DC posteriormente a la estimulación con zimosan y se presenta durante la migración a los nódulos linfáticos (Randolph et al., 1998). Posteriormente en el 2007, León y

Ardavín demostraron *in vivo* que durante la infección de ratones con el parásito *L. major*, los monocitos de sangre periférica pueden diferenciarse en células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC) (Leon et al., 2007). Esta investigación fue respaldada por varios artículos posteriores, lo cual sugiere que los monocitos reclutados en sitios inflamatorios inducidos por una infección pueden diferenciarse localmente en moDC (Le Borgne et al., 2007), (Serbina et al., 2003), (Tacke and Randolph, 2006), (Salazar-Gonzalez et al., 2007). La diferenciación de los monocitos a las DC está controlada por la citocina GM-CSF, la cual también actúa sobre la capacidad de las moDC para la polarización de las respuestas Th1/Th2 (Palucka et al., 2005). Durante la infección con diferentes organismos patogénicos, por ejemplo *Listeria monocytogenes*, los monocitos pueden dar lugar a una clase de moDC llamadas Tip-DC que se caracterizan por producir grandes cantidades de TNF- α e iNOS y que tienen un papel importante en la respuesta inmune innata (Serbina et al., 2003).

Como se mencionó previamente, las células dendríticas representan un porcentaje muy bajo del total de las células sanguíneas por lo que la obtención de moDC no es sencilla. El cultivo de dichas células permite la obtención de cantidades suficientes de células dendríticas para diferentes estudios. Para la producción *in vitro* de las moDC es necesario que los monocitos se encuentren en presencia de GM-CSF e IL-4, los cuales juegan un papel muy importante en la diferenciación. La IL-4 es la responsable del bloqueo del desarrollo de los macrófagos mediante la inhibición de la producción del M-CSF y así previniendo la pérdida de la cadena α del receptor del GM-CSF (Menetrier-Caux et al., 2001). Después de 6 días bajo estas condiciones, las células presentan una morfología de células dendríticas inmaduras y expresan antígenos diferenciales de las células dendríticas (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Es interesante ver que la generación de las moDC no involucra proliferación celular (Randolph et al., 1998). Las células dendríticas derivadas de los monocitos humanos (moDC) tienen la capacidad de inducir una respuesta polarizada de tipo Th1 en los linfocitos TCD8 y presentar antígenos específicos a estos linfocitos por medio de la transpresentación, eliminar al organismo patogénico por medio de la producción de TNF- α e iNOS y regular la producción de IgA por las células B.

1.4 Leishmania

Leishmania es un parásito intracelular obligado que se caracteriza por presentar un estado flagelado o promastigote y un estado aflagelar o amastigote. Su nombre fue dado en honor a Leishman y Donovan, quienes en 1903 describieron por separado al protozoo ahora conocido como *Leishmania donovani* encontrado en el tejido esplénico de pacientes provenientes de la India con leishmaniasis visceral (Herwaldt, 1999). Este parásito es el agente causal de la *Leishmaniasis*, la cual es una enfermedad endémica en 88 países del Sur de Europa, Centro y Sudamérica, África e India (Herwaldt, 1999). En el año 2000 se estimó que más de 12 millones de individuos se infectaron con varias especies de *Leishmania*, con un estimado de 1.5 a 2 millones de casos clínicos. Más de 350 millones de hombres, mujeres y niños en el mundo se encuentran en riesgo de contraer leishmaniasis (Herwaldt, 1999). La leishmaniasis abarca un amplio espectro de manifestaciones clínicas que se agrupan en tres tipos principales: leishmaniasis cutánea, mucrocutánica y visceral.

1.4.1 Leishmaniasis cutánea

La manifestación más común de la enfermedad es la Leishmaniasis cutánea. El 90% de los casos nuevos ocurren en Afganistán, Arabia Saudita, Siria, Brasil y Perú y son causados principalmente por *L. major* y *L. mexicana* (Herwaldt, 1999), (OMS 2002). Esta forma clínica se caracteriza por la presencia de lesiones indoloras y que generalmente se curan con el tiempo sin necesidad de medicamentos. Las lesiones pueden ser desde pápulas a nódulos y lesiones ulcerativas y con un borde con un hundimiento en el centro (Herwaldt, 1999).

La Leishmaniasis cutánea a su vez se subdivide en dos clases: localizada (LCL) y difusa (LCD). La LCL se caracteriza por presentar de una a dos úlceras con poca carga de parásitos por cada célula infectada, mientras que en la LCD se presentan varias úlceras y hay varios parásitos por cada célula infectada.

La infección de ratones con el parásito *Leishmania major* ocasiona el desarrollo de lesiones cutáneas que se resuelven en la cepa de tipo C57BL/6, mientras que en la cepa de tipo BALB/c resulta en una infección incontrolable y eventualmente fatal (Scott, 2009). Esta diferencia se encuentra directamente relacionada con el desarrollo de una respuesta tipo Th1 en la que los

linfocitos $CD4^+$ producen $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, $IL-1$ e $IL-12$ en respuesta a la infección. Por otro lado, la $IL-4$ producida en las respuestas de tipo Th2 está asociada a la susceptibilidad (Herwaldt, 1999).

1.4.2 Ciclo de vida de *Leishmania*

El ciclo de vida de este parásito es dimórfico y se inicia cuando el vector pica al hospedero y le introduce los promastigotes metacíclicos que son reconocidos y fagocitados por las células del sistema fagocítico mononuclear. Dentro del macrófago los promastigotes se transforman en amastigotes, los cuales se reproducen y son liberados de dicha célula. Cuando un flebotómico pica a un hospedero infectado, los amastigotes migran al intestino del vector, los cuales se transforman en promastigotes, se reproducen y migran a la probóscide y se reinicia el ciclo de vida.

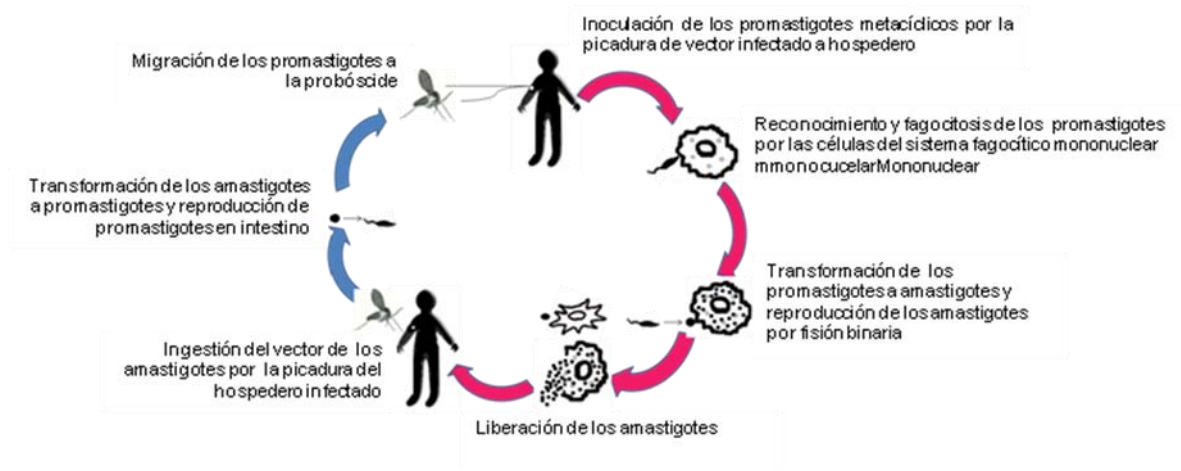


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*

Los estadios morfológicos del parásito *Leishmania* no sólo difieren en la morfología, sino también en las moléculas de superficie y de secreción, las interacciones con las células del sistema inmune para procesos tales como fagocitosis y presentación de antígenos por parte de las células del hospedero, mecanismos de evasión de la respuesta inmune y modulación del sistema inmune del hospedero para asegurar o incrementar su supervivencia dentro del mismo.

Los promastigotes miden de 10-20 μm , poseen un flagelo y son extracelulares. De acuerdo a la etapa de desarrollo, los promastigotes se dividen en dos estadios principalmente, aunque existen otros intermedios: los procíclicos que se caracterizan por ser el estadio reproductivo y no infectivo y los metacíclicos que son infectivos y no reproductivos. Los procíclicos están cubiertos por un glicocálix de 7 nm de espesor y los metacíclicos tienen un glicocálix más grueso, de 17 nm, mientras que en los amastigotes se encuentra casi ausente (Pimienta and de Souza, 1986). El glicocálix contiene glicoproteínas y otras moléculas glicosiladas que se anclan a la membrana de superficie gracias a una molécula de anclaje llamada glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ferguson, 1997). La molécula de superficie dominante en los promastigotes es el lipofosfoglicano (LPG), el cual varía en estructura dependiendo de la especie de *Leishmania*, pero en general está compuesta de unidades repetidas que tienen un disacárido y un fosfato que se ancla al GPI. El LPG juega un papel importante en la supervivencia del parásito y la modulación de la respuesta inmune y las diferencias en estructura y distribución son importantes para las diferentes propiedades de las diferentes etapas del desarrollo del parásito (Olivier et al., 2005). El LPG en los promastigotes metacíclicos es más largo que en los procíclicos y en los amastigotes se encuentra casi ausente (McConville et al., 1992), (Pimienta and de Souza, 1986). La proteína gp63 se localiza en la membrana de los promastigotes, cubierta por el LPG.

Los amastigotes son de forma redonda u ovalada, miden de 3-7 μm de diámetro, con un gran núcleo, un cinetosoma y carecen de flagelo. Son los responsables de la polarización de respuesta inmune de tipo Th1 por parte de los linfocitos CD4^+ , lo cual incluye la inhibición de las citocinas proinflamatorias tales como $\text{IFN-}\gamma$ e IL-12, así como el favorecimiento en la producción de citocinas como la IL-1 (Olivier et al., 2005).

La proteína de superficie gp63 es una metaloproteasa dependiente de zinc, la cual puede degradar varios sustratos que incluyen caseína, gelatina, albúmina, hemoglobina y fibrinógeno (McMaster et al., 1994) y se encuentra en menor proporción en la membrana de los amastigotes comparado con la de los promastigotes (Schneider et al., 1992). Debido a que los amastigotes presentan menor cantidad de LPG, la gp63 se encuentra desenmascarada y podría jugar un papel importante en la supervivencia de los amastigotes y en la modulación de la respuesta inmune

(McConville and Blackwell, 1991; Pimienta and de Souza, 1986). Los amastigotes expresan, en particular, metaloproteasas activadas y β -mercaptoetanol que han sido poco caracterizados (Schneider et al., 1992) y son capaces de incorporar lípidos de la membrana de las células del hospedero (McConville and Blackwell, 1991).

1.5 Interacción de las células con el hospedero y evasión de la respuesta inmune por de *Leishmania*

Se sabe que tanto los promastigotes como los amastigotes han desarrollado diversas estrategias para modular esta respuesta. Una de estas estrategias es el proceso de mimetismo, el cual consiste en la expresión de la fosfatidilserina en la membrana externa celular. La exposición de la fosfatidilserina por los organismos patogénicos puede funcionar como un PAMP expresado no constitutivamente en la superficie con la capacidad de cambiar de una respuesta del hospedero proinflamatoria a una antiinflamatoria (Wanderley and Barcinski, 2010). En relación a este cambio de respuesta a favor del parásito, *Leishmania* previene la activación de una respuesta inmune efectiva mediante la inhibición de citocinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 e IL-12 (Olivier et al., 2005). Los mecanismos de inhibición de dichas citocinas son diferentes en los promastigotes y los amastigotes. Por ejemplo, en la inhibición de la IL-12 por los promastigotes participa de manera importante el LPG, mientras que los amastigotes de *L. mexicana* son capaces de degradar el NF- κ B y la IL-12 por mecanismos dependientes de la actividad de la cistein peptidasa B (Cameron, P. et al 2004).

1.6 Interacción de *Leishmania* con las células dendríticas

Se ha comprobado que algunas subpoblaciones de DC tales como las células de Langerhans pueden influir en la interacción del parásito *Leishmania* con los linfocitos T (Silveira et al., 2008).

Por otra parte se descubrió que las DC son reclutadas seis semanas posteriores a la infección de ratones con *Leishmania major* (Belkaid et al., 2000) y que dicho reclutamiento puede estar mediado por varios factores tales como mecanismos mediados por IgG y la liberación de

citocinas y quimiocinas (Sato et al., 2000; Woelbing et al., 2006). El incremento de las DC coincide con la muerte del parásito, la disminución del tamaño de la lesión, la detección de las células productoras de IL-12 y la migración de los linfocitos T CD8 y CD4 a la piel (Belkaid et al., 2000).

Además, las DC no fagocitan al promastigote sólo al amastigote, reconociéndolo por medio del receptor Fc γ I y Fc γ III (Sato et al., 2000; Woelbing et al., 2006).

La infección de las DC con *L. major* da como resultado la activación de células asociadas con el incremento en la expresión del MHC clase I, del MHC clase II y de las moléculas coestimuladoras (von Stebut et al., 1998) (Flohe et al., 1997). Paralelamente a esta activación, las DC liberan la citocina proinflamatoria IL-12, una vía por la cual varios tipos de DC infectadas promueven eficientemente la protección del hospedero contra *L. major* (von Stebut et al., 2000) (Flohe et al., 1997) (Flohe et al., 1998) (Ahuja et al., 1999) (Berberich et al., 2003).

Recientemente se demostró que las DC son el único tipo celular capaz de presentar a los antígenos de *Leishmania* por la vía del MHC clase I y del MHC clase II (Belkaid et al., 2000) y son capaces de activar a los linfocitos T CD4⁺ y TCD8⁺ (Belkaid et al., 2002) (von Stebut and Udey, 2004). Las DC maduras no sólo activan a los linfocitos T, sino también pueden polarizar una respuesta de tipo Th1 mediante la liberación de la citocina IL-12 (von Stebut et al., 1998) (Filippi et al., 2003) (Zahn et al., 2005) en las infecciones presentes en la Leishmaniasis cutánea (Von Stebut, 2007).

Las DC también son responsables de la generación y el mantenimiento de los linfocitos T de memoria que regulan la protección a largo plazo, aún en la ausencia de parásitos, ya que las células dendríticas presentan parásitos persistentes que son requeridos para la generación estos linfocitos T de memoria una vez resuelta la infección primaria con *L. major* (Zaph et al., 2004).

1.6.1 Interacción de *Leishmania* con las moDC

Se sabe que la infección de ratones con *Leishmania* genera, de novo, dos subpoblaciones de DC que corresponden a las moDC inmaduras en la dermis y en los nódulos linfoides popliteales (Leon et al., 2007). Esto incluye a las DC derivadas de monocitos reclutados en la dermis, que se diferenciaron localmente y migraron a los nódulos linfoides popliteales (mo-DC) y en las DC

derivadas de los monocitos reclutados en los nódulos linfoides popliteales, que se diferenciaron a las DC (LN mo-DC). Estas subpoblaciones de DC son las que principalmente se infectan y son la única que expresan los complejos de IA^d-LACK. LACK es el antígeno inmunodominante de *L. major* que está involucrado en la presentación de las CD's a las células T CD4⁺ (Mougneau et al., 1995). También las mo-DC formadas de novo poseen una gran capacidad para producir IL-12 y estimular a las células T específicas para *L. major*, lo que sugiere que estas células tienen un papel esencial en la inducción de la respuesta protectora tipo Th1 de LT en respuesta contra *Leishmania* (Leon et al., 2007).

Las moDC, al igual que todas las células del organismo, se encuentran reguladas por varios mecanismos. Uno de los mecanismos más importantes en el mantenimiento de la homeostasis celular y tisular en los mamíferos es la muerte celular programada por medio del cual se regula la muerte celular.

1.7 La apoptosis

La palabra apoptosis proviene del griego y se refiere a la caída o desprendimiento de las hojas de un árbol (Kiechle and Zhang, 2002). El término fue introducido en 1972 por Kerr y colaboradores (Kerr et al., 1972) para definir los cambios morfológicos en las células, que incluyen la vesiculación citoplásmica, la condensación de la cromatina, el encogimiento celular, la fragmentación nuclear, la pérdida de adhesión de la célula y finalmente, la formación de los cuerpos apoptóticos que son ingeridos por células fagocíticas vecinas (Kiechle and Zhang, 2002). Es el proceso regulado de destrucción de la célula y requiere de cierto tiempo para llevarse a cabo después del primer insulto (Zhang and Kiechle, 1998) (Geske and Gerschenson, 2001). No está asociada con reacciones inflamatorias, ya que las células apoptóticas no liberan los constituyentes celulares en el tejido cercano y son fagocitados rápidamente por los macrófagos, las DC y las células parenquimales, sin la producción de citocinas pro inflamatorias (Savill and Fadok, 2000).

1.7.1 Identificación de la apoptosis

Existen varios métodos para identificar los eventos apoptóticos, algunos de los métodos se basan en la detección del DNA degradado (Ohno et al., 1998) (Cuello-Carrion and Ciocca, 1999;

Linde et al., 2000; Watanabe et al., 1999), la activación de la caspasa-3 (Balamurugan et al., 2004; Dong et al., 2010; Zhang et al., 2004) y la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular (Span et al., 2002) (Bedner et al., 1999).

1.7.2 Vías de inducción de la apoptosis

Existen dos vías de inducción de la apoptosis: la extrínseca y la intrínseca. La extrínseca opera por medio de receptores que se encuentran en la superficie celular y la vía intrínseca depende de la de la mitocondria, la cual se activa por la pérdida de señales de factores de crecimiento o en respuesta a un estímulo letal proveniente del interior de la célula. Ambas vías se encuentran interconectadas con otras proteínas de señalización tales como NF- κ B y p53-MDM2 y convergen en el nivel de las caspasas (Burz et al., 2009).

1.7.3 La vía intrínseca

La vía intrínseca puede activarse por daño en el DNA, estrés oxidativo, hipoxia, medicinas quimioterapéuticas (Burz et al., 2009), shock de calor, radiación UV y radiación gamma (Pradelli et al., 2010). Como ya se mencionó, la mitocondria es un organelo fundamental para la activación de la apoptosis por la vía intrínseca. Esta posee una membrana externa separada de una membrana interna por un espacio intermembranal que contiene muchas proteínas involucradas en la inducción de la muerte celular por apoptosis tales como el citocromo, factores de inducción de la apoptosis, Omi/HtrA2, EndG y Smac/DIABLO. Todos los estímulos que causan cambios en el espacio intermembranal producen la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, la pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria y la liberación de proteínas proapoptóticas secuestradas desde el espacio intermembranal hasta el citosol. Después de la liberación al citoplasma, el citocromo C estimula la formación del apoptosoma que es un complejo que incluye al factor activador de proteasas Apaf-1, el citocromo C y a la caspasa-9. Esta última es iniciadora y activa a las caspasas ejecutoras, las cuales cortan sustratos vitales resultando en la muerte de la célula (Danial and Korsmeyer, 2004).

1.7.4 Mecanismos de regulación de la apoptosis por la vía intrínseca

La permeabilización de la membrana mitocondrial externa se considera como el “punto sin regreso” para la muerte de las células apoptóticas, desencadenando la actividad de las proteínas que promueven la muerte celular en el citosol (von Herbay and Rudi, 2000). La permeabilización de la membrana mitocondrial externa está controlada por las interacciones entre los miembros apoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Chipuk et al., 2004). Esta familia de proteínas está conformada por 25 miembros que están localizados en la mitocondria, el retículo endoplásmico liso y las membranas perinucleares de las células hematopoyéticas (Reed, 2008). Estas proteínas se dividen en tres grupos dependiendo de la presencia de secuencias conservadas conocidas como dominios homólogos de Bcl-2 (BH-BH4), en donde cada dominio BH tiene una función diferente y puede estar ausente dependiendo del grupo. El grupo I está conformado por proteínas antiapoptóticas y el grupo II y III por proteínas proapoptóticas (Burz et al., 2009). Las proteínas del grupo I (antiapoptóticas) contienen los cuatro dominios BH y están integradas dentro de la membrana mitocondrial externa, aunque también pueden estar en el citosol o en la membrana del retículo endoplásmico (Chipuk et al., 2010). Este grupo incluye a Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w, Bcl-xL y A1 (Burz et al., 2009). Este grupo preserva la integridad de la OMM por la inhibición directa de las proteínas proapoptóticas (Chipuk et al., 2010), uniéndose a Bax y Bak previniendo el daño mitocondrial (Scorrano, 2003). Las proteínas antiapoptóticas se dividen en proteínas efectoras y proteínas que sólo poseen el dominio de tipo BH3. El grupo II está constituido por el grupo de proteínas con sólo el dominio de tipo BH3 que incluye a Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Noxa, Puma y Hrk y actúan como sensores de daño y son antagonistas directos de Bcl-2 y otras proteínas que favorecen la sobrevivencia de la célula (Burz et al., 2009). El grupo III, que contiene dominios BH 1-3, está compuesto por Bax, Bak, Bok y Bcl-x_s y activa directamente a otras proteínas proapoptóticas (Burz et al., 2009). Otro regulador importante para la apoptosis es el gen supresor de tumor p53, el cual codifica para una proteína nuclear que tiene un papel crítico en la regulación de la muerte celular. En respuesta a diferentes tipos de estrés celular, p53 promueve la expresión del gen p21 y cuando la célula no puede reparar el daño celular, p53 promueve la apoptosis por diferentes vías (Dey et al., 2008). Entre los mecanismos para promover la apoptosis se encuentran

la transcripción de una variedad de factores apoptóticos tales como Bax, Noxa, Puma y la proteína inducida y regulada por p53 (p53AIP1) y la translocación de p53 a la mitocondria, donde se une a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL (Burz et al., 2009). A su vez p53 se encuentra regulado por MDM2. Una vez activado, p53 transcribe a MDM2 y esta proteína inhibe la actividad de p53.

1.8 Inducción de la apoptosis por la camptotecina

La camptotecina es un alcaloide aislado de la planta *Camptotheca accuminata* de la familia *Nyssaceae* (Kepler et al., 1969), es una droga con un efecto antitumoral muy potente, ya que es específica del ciclo celular fase S e inhibe la actividad de la topoisomerasa I en los mamíferos (Chen and Liu, 1994). Las topoisomerasas son enzimas que producen cambios en los niveles de superenrollamiento del DNA y están involucradas en la replicación, transcripción, condensación cromosómica, segregación y en muchos otros procesos celulares vitales (Wang, 2002). Esta enzima es abundante tanto en células quiescentes como en las células en proliferación (Hsiang YH et al 1988, Heck MM and Earnshaw WC 1987) y el nivel de la topoisomerasa I aparece relativamente constante entre las fases del ciclo celular G1, S, G2 y M (Hsiang YH et al 1988). La función principal de la topoisomerasa I es relajar el superenrollamiento del DNA producido por el estrés torsional generado durante los procesos de replicación y transcripción del DNA (Wang JC 1985). Para lograr dicho relajamiento, la topoisomerasa I hace un corte transitorio en una hebra, pasando la otra hebra a través del corte (Beretta et al., 2006). Durante este proceso, la camptotecina se une al complejo topoisomerasa I-DNA formando un nuevo complejo estable Camptotecina-topoisomerasa I-DNA, el cual bloquea el paso de reincorporación de la reacción corte/religación de la topoisomerasa-I, resultando en la acumulación de reacciones intermediarias covalentes (Liu FL et al 2000) y dando como resultado el rompimiento de una hebra del DNA (Hsiang Y.H, et al 1985). La incubación de las células con camptotecina resulta en la inhibición de la fase S tardía y G2 temprana del ciclo celular, lo que conlleva a la conversión de una hebra del DNA rota a la, potencialmente letal, ruptura de una doble hebra del DNA (Hsiang Y.H, et al 1985). Esta ruptura tiene como resultado la muerte de la célula por apoptosis (Del Bino G, et al 1992).

Anteriormente se pensaba que debido a la especificidad por el ciclo celular, la camptotecina no debería ser muy tóxica para las células diferenciadas postmitóticas a concentraciones que inhiban la función de la topoisomerasa-I, sin embargo, Morris y Geller descubrieron en 1996 que la camptotecina inducía la apoptosis en las neuronas debido a que la toxicidad de la camptotecina en las células que no estaban proceso de replicación es dependiente de la transcripción del DNA activo (Morris J.E. y Geller HM, 1996).

1.9 Las caspasas

Las caspasas son enzimas proteolíticas efectoras de la vía apoptótica, poseen un sitio activo rico en cisteínas y cortan sustratos después de residuos de ácido aspártico. En los mamíferos todas las proteínas implicadas en la activación y ejecución de la apoptosis (las proteasas tipo ICE y las caspasas) se activan en una cascada de proteasas que provoca la inactivación de proteínas estructurales e importantes en la señalización, así como en enzimas homeostáticas y de reparación (Thornberry et al., 1997). Son proteasas de muerte, altamente conservadas, que se expresan en la mayoría de las células como proenzimas inactivas o zimógenos, y cuando se activan por procesamiento, activan a otras caspasas cercanas para amplificar la vía de señalización y llevar a cabo la muerte celular (Lamkanfi et al., 2007). Los zimógenos de dichas caspasas poseen tres dominios que son: prodominio N-terminal y dominios P20 y P10. Después de la activación, el zimógeno se convierte en una enzima madura llamada caspasa, la cual es un heterotetrámero compuesto por dos dominios P20 y dos dominios P10. Se han identificado 14 caspasas, de las cuales 11 están presentes en los mamíferos. Estas caspasas se han dividido con base en la preferencia por el sustrato, lo cual está determinado por los cuatro residuos amino terminal en el sitio de corte; las caspasas se han dividido en: proinflamatorias (caspasas 1,4, 5, 11, 12, 13 y 14) y proapoptóticas que se dividen a su vez en las caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10) que poseen un dominio largo y las caspasas efectoras (3, 6 y 7) con un dominio corto (Burz C. et al 2009) (Danial and Korsmeyer, 2004). Las caspasas se pueden activar por 3 mecanismos: por corte entre P10 y P20 o entre el prodominio y P10 o entre el prodominio y P20, por caspasas efectoras y por proximidad o por asociación con una subunidad reguladora

(Danial and Korsmeyer, 2004). Algunas características apoptóticas tales como la fragmentación del DNA, el encogimiento nuclear, la pérdida de la forma celular y la vesiculación se deben al corte por las caspasas de sustratos esenciales tales como proteínas nucleares y de citoesqueleto como gelsoina y frodina (Danial and Korsmeyer, 2004).

Las caspasas se modulan por varios factores endógenos que incluyen a las proteínas de inhibición de la apoptosis (IAP), las cuales poseen un dominio repetido llamado BIR que se adhiere e inhibe a las caspasas activas (Deveraux et al., 1999). Los miembros de la familia IAP contienen uno o más dominios tipo BIR y cada uno realiza diferentes funciones (Silke et al., 2005). Las IAP, a su vez, están controladas por otras dos proteínas mitocondriales llamadas smac/DIABLO y OMI/HtrA2 (Cory and Adams, 2002).

1.9.1 La caspasa-3

La caspasa-3 es probablemente la mejor conocida de las caspasas presentes en los mamíferos en términos de la especificidad y la participación en la apoptosis (Porter and Janicke, 1999). La caspasa-3 o las proteínas relacionadas a ésta son capaces de cortar al menos 42 de los 58 sustratos conocidos de las caspasas y pueden procesar las procaspasas 2, 6, 7 y 9 (Cryns and Yuan, 1998; Thornberry et al., 1997). La caspasa-3 es esencial para la generación de algunos cambios característicos de la apoptosis relacionados con la morfología celular y en eventos bioquímicos asociados con la ejecución y terminación de la apoptosis tales como la vesiculación citoplásmica, la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear. (Hirata et al., 1998; Janicke et al., 1998). Cabe destacar que no todos los cambios asociados a la apoptosis están relacionados a la activación de la caspasa-3, ya que hay vías independientes de la caspasa-3 (Porter and Janicke, 1999). La activación de la caspasa-3 puede ser por una vía dependiente o independiente de la liberación del citocromo C (Chauhan et al., 1997; Scaffidi et al., 1998). Además, su activación puede ser dependiente o independiente de la caspasa-9 (Porter and Janicke, 1999).

2 Modulación de la apoptosis por diferentes organismos patogénicos

La apoptosis es un mecanismo de defensa contra virus y bacterias de la inmunidad innata y adaptativa (Williams, 1994). Si la población de patógenos viables disminuye dentro del hospedero

debido al sacrificio de las células hospederas, esto puede facilitar la supervivencia del hospedero (Luder et al., 2001) por lo que varios parásitos virus y bacterias han desarrollado estrategias que modulan la apoptosis en las células hospederas (Barry and McFadden, 1998) (Gao and Kwaik, 2000). La apoptosis de la célula hospedera puede ser iniciada o inhibida por los parásitos contribuyendo a la diseminación del parásito dentro de la célula, al inhibir o modular las respuestas inmunes del hospedero o al facilitar su supervivencia intracelular (Luder et al., 2001). Los parásitos y sus productos pueden tener efectos directos o indirectos en la modulación de la apoptosis en la célula hospedera. Hay tres tipos de modulación directa: 1) el parásito infecta a la célula hospedera y bloquea la apoptosis en dicha célula , 2) el parásito promueve la apoptosis en la célula del hospedero y ambos mueren y 3)el parásito promueve la apoptosis en la célula del hospedero y después logra escapar muriendo solamente la célula hospedera, más no el parásito (Luder et al., 2001).

En el curso de una infección al presentarse una respuesta inmune adaptativa en donde los antígenos son presentados a los linfocitos con la consecuente acción de los linfocitos T citotóxicos, éstos participan en la respuesta inmune contra el parásito matando a las células infectadas y, eventualmente, al parásito dentro de las células. Los diferentes organismos patogénicos también han desarrollado mecanismos indirectos para la modulación de la apoptosis en los que existen tres posibilidades: 1) las células T ayudadoras activan a los macrófagos infectados para matar a los parásitos intracelulares y tanto el parásito como las células del hospedero mueren, 2) las células T activadas expresan Fas y Fas ligando y se vuelven susceptibles a morir por apoptosis inducida por la señalización de Fas y 3) el parásito toae ventaja de la respuesta inmune suprimida y la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos para desactivar a los macrófagos y favorecer la infección por los parásitos (Luder et al., 2001).

2.1 Interacción del parásito *Leishmania* con componentes celulares que modulan la apoptosis

Durante la infección por el parásito *Leishmania*, una de las poblaciones celulares que primero se recluta al sitio de la infección son los leucocitos polimorfonucleares. Estas células

juegan un papel primordial en el control o dispersión de la infección. Los promastigotes de *L. major* inhiben la apoptosis natural en estas células por un mecanismo que involucra la inhibición de la activación de la caspasa-3 (Aga et al., 2002). Los macrófagos son las células hospederas obligadas del parásito y son requeridas por *Leishmania* para su propagación y persistencia, además de ser de las células efectoras principales capaces de matar al parásito (Schneider et al., 1992). Diversos grupos han demostrado que *Leishmania* es capaz de inhibir la apoptosis de estas células. También se sabe que los promastigotes de *L. major* son capaces de inhibir la muerte celular inducida por la deprivación del M-CSF y por la estaurosporina en los macrófagos por un mecanismo que reprime la permeabilización de la membrana externa, lo que permite la liberación del citocromo C dentro del citosol (Akarid et al., 2004). Posteriormente se demostró que uno de los mecanismos que participan en la inhibición de la apoptosis es la activación por parte de parásito de la señalización PI3/Akt para conferir a la célula hospedera resistencia a los activadores de la apoptosis (Ruhland et al., 2007). Por otra parte, se ha comprobado que los promastigotes de *L. donovani* inducen la apoptosis en los linfocitos espléncos CD4⁺ después de su activación *in vitro* (Das, G. et al 1999), lo que va acompañado de una represión de la hipersensibilidad retardada (DTH) *in vivo* y de la incapacidad de secretar IL-2 e IFN- γ *in vitro* (Das, G. et al 1999). Lo mismo sucede en la Leishmaniasis cutánea causada por los promastigotes de *L. braziliensis*, en la que la enfermedad activa se asoció con el incremento en la apoptosis de las células T CD4⁺ y CD8⁺.

La información anterior sugiere que el parásito inhibe la apoptosis en las células de la respuesta inmune innata, mientras que en células de la respuesta inmune adaptativa promueve la apoptosis. Lo anterior podría deberse a que los linfocitos CD4 y CD8 promueven una respuesta específica contra el parásito, mientras que las células de la respuesta inmune innata proveen al parásito un nicho que puede asegurar su supervivencia.

Finalmente los promastigotes de *L. mexicana* inhiben la apoptosis inducida por camptotecina en las moDC, las que están involucradas en la presentación antigénica a través de MHCII a las células T CD4 y en la polarización de las respuestas de tipo Th1/Th2, por lo que juegan un papel determinante en la resolución de la enfermedad, así como en la resistencia/susceptibilidad del hospedero (Valdes-Reyes et al., 2009).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La *Leishmaniasis* es la zoonosis causada por *Leishmania*, que es dimórfico, e interactúa con varios tipos celulares, entre ellos, las células dendríticas; por lo que es importante analizar y comprender los procesos que inhiben o modulan la apoptosis, ya que influye directamente en la supervivencia del parásito y en el progreso de la enfermedad; además de ser una herramienta útil para conocer más acerca de la naturaleza intrínseca del parásito así como de las interacciones que se llevan a cabo entre célula dendrítica-parásito.

La *Leishmania mexicana* en su forma promastigote inhibe la apoptosis natural e inducida en las células dendríticas derivadas de monocitos humanos. Sin embargo, no se conoce el efecto del parásito en su forma amastigote, la cual es la forma presente en el hospedero vertebrado.

III. HIPÓTESIS

Los amastigotes de *Leishmania mexicana* inhiben la apoptosis de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos.

IV. OBJETIVOS

Analizar el efecto de los amastigotes de *Leishmania mexicana* en la apoptosis inducida con camptotecina en las células dendríticas derivadas de monocitos humanos.

Los objetivos particulares fueron:

IV.1. Obtener y reconocer células dendríticas derivadas de monocitos humanos.

IV.2. Realizar las curvas de dosis-respuesta y de tiempo de exposición-respuesta de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos expuestas a la camptotecina.

IV.3. Cultivar amastigotes de *Leishmania mexicana*

IV.4. Analizar el efecto de los amastigotes de *Leishmania mexicana* sobre diferentes patrones apoptóticos en las células dendríticas derivadas de monocitos humanos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1. Purificación de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos.

Las células dendríticas se diferenciaron a partir de monocitos CD14⁺ de sangre periférica humana de acuerdo a métodos descritos previamente (Romani et al, 1994; Sallusto y Lanzavecchia, 1994). Los monocitos se obtuvieron de agregados celulares (“buffy coats”) de donadores sanos que fueron proporcionados por el Banco de Sangre del CMN, Siglo XXI, IMSS. Los monocitos se purificaron por centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque (Sigma, St Louis, MO, EUA) y se centrifugaron a 300 ×g durante 20 min y a 20 °C. Después se obtuvo con una pipeta estéril la interfase y se colocó en un tubo cónico de 50 mL y se agregó solución lítica de eritrocitos para eliminar dichas células. Las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 estéril y libre de pirógenos (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, EUA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, USA) adicionado con 2 mM de L-glutamina (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY), 10 mM de buffer HEPES, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina 24 mM de NaHCO₃ (R-10) y se coincubaron con microperlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-CD14 (1 µl/1 ×10⁶ céls) (MACS CD-14 Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Alemania) y se dejaron reposar a 4 °C durante 15 min. Las células se purificaron por selección positiva y los monocitos CD14⁺ se lavaron con PBS. Posteriormente, se cultivaron 1 × 10⁶ monocitos en medio RPMI-1640 estéril y libre de pirógenos suplementado con 50 µM de 2-mercaptoetanol y en presencia de las citocinas IL-4 (1000 U/ml) y GM-CSF (1000 U/ml) (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA) a una densidad de 1 × 10⁶ CD's/ml de medio en cajas de 24 pozos (Corning Life Sciences, NY, EUA) un periodo de 7 días.

V.2 Caracterización de las moDC

Dichas células se caracterizaron por citometría de flujo utilizando anticuerpos dirigidos contra marcadores específicos: anti-CD1a humano acoplado a ficoeritrina (PE) diluido en PBS, anti-CD86 humano acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido en PBS, HLA DR humano acoplado a ficoeritrina (PE) y anti-CD80 humano acoplado a FITC diluido en PBS (todos los anticuerpos son BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA). Las células se lavaron con 100 µl de

PBS y se les agregaron 50 μ l de PBS con 5 μ l de uno de los anticuerpos antes mencionados por cada millón de células dendríticas. Se incubaron por 20 min, se lavaron con PBS y se les agregaron 500 μ l de PBS, se colocaron en tubos para citómetro (BD Falcon Bedford, MA, USA) y se leyeron en el citómetro FACSsort con el software CellQuest (BD Immunocytometry Systems, San José, CA, EUA).

Las moDC también se caracterizaron por tinción Giemsa, para lo cual dichas células se colectaron y se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron a 150 \times g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Las células se fijaron con etanol absoluto y posteriormente se tiñeron con Giemsa (Sigma GS-500, Sigma, St Louis MO, EUA) durante 15 minutos. Las células se colocaron sobre portaobjetos y se hizo un círculo de cera alrededor de cada muestra para evitar que se desprendiera, las preparaciones se lavaron con agua corriente, se dejaron secar y se montaron con resina. Las células fueron observadas por microscopía de luz.

Las moDC también fueron caracterizadas por inmunofluorescencia, utilizando los anticuerpos: anti CD1a acoplado a PE y a FITC (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA). Para hacer dicha Inmunofluorescencia las moDC se colectaron y se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron a 150 \times g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente las células se marcaron con el anticuerpo anti CD1a acoplado a FITC o PE y se coincubaron con dicho anticuerpo por 15 min, se lavaron con PBS, se centrifugaron a 150 \times g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Las células se montaron en portaobjetos y se colocó encima de cada preparación un cubreobjetos. Por último las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Axio imager M1, Zeiss, Thornwood, Alemania).

Por último las moDC se caracterizaron por microscopía electrónica, para lo cual se colectaron las células, se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron a 150 \times g durante diez minutos, se eliminó el sobrenadante, se fijaron con el glutaraldehído al 2.5% diluido en PBS (pH 7.3) durante 90 minutos. Posteriormente se les agregó tetraóxido de osmio al 1% diluido en agua por 90 minutos. Las muestras se deshidrataron de manera gradual con etanol al 40, 50, 60, 70, 80,

90% con un cambio de 10 minutos cada uno, y tres cambios con etanol absoluto. Después se realizaron dos cambios de 20 min. con óxido de propileno puro. Luego se realizó la preinclusión de las células en la resina Epon-óxido de propileno en relación 1:2, 1:1 y 3:1 v/v durante 1 hora cada una. Finalmente las células se incluyeron en Epon 100% y se realizaron dos cambios de 2 h c/u. Las muestras se incluyeron en moldes de silicón y se incubaron 24 h a 60°C para la polimerización. Se obtuvieron cortes de las muestras polimerizadas (65 nm de espesor) con un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT) y estos cortes se depositaron en rejillas de cobre de 200 mallas y se contrastaron con el acetato de uranilo al 4% diluido en agua y citrato de plomo (Reynolds, USA). Los cortes se observaron con el microscopio electrónico (JEOL JEM 1010) en la central de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas con un voltaje de aceleración de 60 KV.

V.3 Cultivo de los amastigotes de *Leishmania mexicana*

La cepa de *Leishmania mexicana* que se utilizó en este estudio fue la M379 (MNYC/BZ/62/M379; ATCC 50156), donada por el Dr. Eric Dumonteil y la Dra. Ma. del Rosario García Miss, Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán.

Los amastigotes se obtuvieron de un ratón Balb/c hembra con 6-12 semanas de infección. El ratón se sacrificó por dislocación cervical, se extirpó la pata infectada la cual se maceró en una malla de nylon de 100 μm (BD Falcon Bedford, MA, EUA), acoplada a un tubo cónico de 50 ml, con el émbolo de una jeringa y medio Schneider (SDM) (Sigma, San Luis, MO, EUA). El macerado obtenido se centrifugó a 100 $\times g$ durante 5 minutos. El sobrenadante se recuperó y se le agregó saponina (5 mg/ml). Esta solución se pasó tres veces a través de una aguja de insulina y se agregó 1 ml de SDM. A continuación, se tomó una alícuota de esta solución y se diluyó en paraformaldeído al 0.2% en una proporción 1:2, la preparación se homogenizó y se colocó en una cámara de Neubauer. Se realizó el conteo de los parásitos de los cuatro cuadrantes y se obtuvo el número total de los amastigotes extraídos. Se sembraron 5×10^6 amastigotes en cajas de cultivo de 25 cm^2 (Jet Biofil, Guangzhou, China) con 10 ml de medio SDM adicionado con 20% de suero

fetal bovino (Gibco Invitrogen Grand Island, NY, EUA) a una densidad de 500,000 parásitos/ml de medio.

V.4. Caracterización de los amastigotes de *L. mexicana*

Los amastigotes se caracterizaron por microscopía electrónica con el mismo método descrito anteriormente para las moDC para demostrar que la apoptosis medida en los experimentos no correspondiera a la apoptosis de los parásitos, así como para asegurar el perfecto estado de los parásitos. Además se tomaron fotografías digitales con la cámara (Axio CAM MRc5, Zeiss, Thornwood, Alemania) de los parásitos en cultivo vistos a través del microscopio invertido (Axio vert 100, Zeiss, Thornwood, Alemania).

V.5. Curvas de crecimiento de los amastigotes de *L. mexicana*

Como control de los cultivos de los amastigotes se tomó una alícuota diariamente del cultivo los parásitos en medio SDM y ésta se pasó tres veces a través de una aguja de insulina para disgregar los cúmulos de amastigotes y se realizaron conteos para obtener curvas de crecimiento y se midió también el pH del medio de cultivo puesto que el pH del medio de cultivo de los amastigotes debe mantenerse ácido para impedir la transformación a la fase de promastigote.

V.6 Análisis de viabilidad de los amastigotes de *Leishmania mexicana*

Se analizó la fragmentación del DNA de los amastigotes para corroborar la viabilidad de los mismos y así poder descartar la muerte de dichos parásitos por apoptosis Utilizamos el kit TUNEL para analizar este parámetro apoptótico. Para esto los amastigotes se fijaron en paraformaldeído al 4%, se colocó la solución permeabilizadora y los reactivos del kit de TUNEL. Las muestras se lavaron en PBS y se colocó el revelador. Las muestras se contratiñeron con hematoxilina y se analizaron en un microscopio de luz.

V.7 Infección de las moCD'S con los amastigotes de *L.mexicana*

Las células dendríticas utilizadas fueron de 7 días de cultivo, a una densidad de 1×10^6 células por condición. Los parásitos utilizados para el experimento fueron amastigotes de *Leishmania mexicana* de la cepa M 379 de 7 días de cultivo.

Las moDC se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana* en una proporción 1:10 células: parásitos. Las células se coincubaron con los amastigotes por 3 h a 37 °C en 1 ml de medio Schneider a una temperatura de 25 °C en el cuarto de temperatura constante. Posteriormente, las moCD's se lavaron en repetidas ocasiones con PBS para eliminar a los parásitos no fagocitados y las células infectadas se utilizaron en los experimentos.

V.8 Inducción de apoptosis con camptotecina en las moDC

Se realizaron curvas dosis respuesta y cinéticas para conocer la concentración y el tiempo idóneos para la inducción de apoptosis en las moDC con el inductor camptotecina. (Sigma, St Louis MO, EUA) que se utilizó a diferentes concentraciones preparadas a partir de una solución 100 mM.

Para la curva dosis respuesta, las moCD's se coincubaron con diferentes concentraciones de camptotecina: 5, 10, 25 y 50 μM y comparando las células sin estímulo con las células tratadas con la camptotecina. En el caso de la cinética, las moDC se coincubaron con la camptotecina a una concentración de 10 μM y se observó el porcentaje de células apoptóticas a las 6, 12 y 24 h comparando las células sin estímulo con las células tratadas con la camptotecina.

Para ambas curvas se utilizó como signo positivo de apoptosis la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular, la cual se midió por citometría de flujo con el marcador anexinaV-FITC (Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Alemania). Se utilizó el 7AAD (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA) para descartar necrosis.

V.9 Tratamiento de las moDC

Las moDC se cosecharon de la caja de 24 pozos y se centrifugaron a $160 \times g$ durante 10 min a una temperatura de 4°C . Se contaron las células obtenidas y se colocaron en medio RPMI-1640 con 10% de SFB inactivado con calor (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, EUA) a una densidad de 1×10^6 CD's/ml y se sometieron a los tratamientos siguientes:

- a) Células dendríticas sin estímulo
- b) Células dendríticas más perlas de plástico (Polymer microspheres Red Fluorescing 1% solids, Duke Scientific Corp, EUA) (proporción 1:10 células-perlas)
- c) Células dendríticas más DMSO $10 \mu\text{M}$ (Sigma, St. Louis MO, EUS)
- d) Células dendríticas más camptotecina $10 \mu\text{M}$
- e) Células dendríticas más amastigotes de *L. mexicana* en una proporción 1:10 (células:parásitos)
- f) Células dendríticas más camptotecina $10 \mu\text{M}$ más amastigotes de *L. mexicana* en una proporción 1:10 (células: parásitos).

V.10 Análisis de la translocación de la fosfatidilserina por citometría de flujo

La expresión de marcadores específicos en la superficie de las células apoptóticas resulta en el reconocimiento temprano y la rápida fagocitosis de dichas células por parte de las células adyacentes sin dañar a los tejidos cercanos (Elmore, 2007). Esta expresión es consecuencia del movimiento de la fosfatidilserina de la cara interna hacia la cara externa de la membrana plasmática (Bratton et al., 1997). Este proceso de traslocación de la fosfatidilserina es activado por la interacción del citocromo C mitocondrial y la fosfatidilserina en el citosol, ya que el citocromo C una vez liberado de la mitocondria actúa como una oxigenasa específica para los fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina e interactúa con ésta catalizando la oxidación de dicha fosfatidilserina en una reacción de oxidación. La oxidación de la fosfatidilserina facilita su externalización (Bayir et al., 2006). La anexina-V pertenece a una familia multifuncional de proteínas localizadas en el citosol, dependientes de calcio y cuya función es la unión de fosfolípidos (E. Moss y O. Morgan, 2004). Es una proteína recombinante que se une a la fosfatidilserina, ya que interactúa con gran avidez y

especificidad con los residuos de la fosfatidilserina por lo que puede ser utilizada para detectar apoptosis (van Engeland et al., 1998) (Arur et al., 2003).

Por lo anterior, el primer parámetro apoptótico que se analizó fue la translocación de la fosfatidilserina. Esto se analizó por citometría de flujo utilizando Anexina V-FITC (Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Alemania). En las células necróticas la pérdida de la integridad de la membrana permite el libre acceso del colorante 7-actinomycin D (7AAD) al interior de la célula por lo que este colorante se puede utilizar como marcador de las células necróticas (Quinn et al., 2007). Para el marcaje con Anexina-V y 7AAD las moCD's se lavaron con 100 μ l del amortiguador de unión para anexina (ABB), se centrifugaron a 170 \times g, el sobrenadante se eliminó y al precipitado se le adicionaron 50 μ l de ABB más 2 μ l de anexina y 0.5 μ l de 7AAD/ 1×10^6 de células. Se coincubó 20 min, se agregaron 500 μ l de ABB y se leyó en el citómetro de flujo.

V.11 Análisis de la fragmentación del DNA por TUNEL

Otro parámetro apoptótico que se analizó fue la fragmentación del DNA, la cual se lleva a cabo por las endonucleasas dependientes de calcio y magnesio y da como resultado fragmentos de DNA de 180 a 200 pares de bases (Bortner et al., 1995). Esta fragmentación se analizó mediante la técnica de TUNEL que se basa en el marcaje enzimático de los fragmentos del DNA con dUTP-fluoresceína y TdT. Para esto, 3×10^5 de moDC sometidas a los diferentes tratamientos descritos previamente se fijaron con paraformaldehído al 4% una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 50 μ L de la solución permeabilizadora (Tritón X-100 al 0.1%, citrato de sodio al 0.1%) 2 min en hielo. Las muestras se lavaron con PBS y se les adicionó 50 μ l de la mezcla de reacción de TUNEL (In Situ Cell Death Detection kit; Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Alemania) 1 h incubadas en cámara húmeda y oscura a 37 °C. Posteriormente, las muestras lavaron en PBS y se agregaron 50 μ l del convertidor de peroxidasa HRP (In situ Cell Death detection kit; Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Alemania) 30 min. Se lavaron con PBS y se colocaron 50 μ l del revelador aminoetil carbazol (AbCAM, ab94705). Las muestras se contratiñeron con 50 μ L de hematoxilina (Mayer's hematoxylin HK100-9K) un minuto y se montaron

con una gota de solución de montaje (Bio SB, Aqua mounter, BSB 0091) y se analizaron en microscopio de luz (Axio Imager Zeiss, Alemania).

V.12 Western Blot para el análisis de la activación de la caspasa-3.

La caspasa-3, a través del corte de sustratos esenciales para las células, es indispensable en la generación de cambios morfológicos y bioquímicos de las células tales como la vesiculación citoplásmica, la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear (Porter and Janicke, 1999) (Hirata et al., 1998; Janicke et al., 1998) por lo que su activación puede ser utilizada como método de detección de células apoptóticas (Elmore, 2007)

Para analizar este parámetro apoptótico, se lisaron 1×10^6 de moCD's por cada condición descrita previamente con el buffer de lisis celular RIPA (Tris-HCl 1M, cloruro de sodio 1M, ácido etilendiaminotetraacético 50 mM, aprotinina 10 mg/mL, leupeptina 1 mg/mL, ortovanadato de sodio 100 mM, fluoruro de sodio 100 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro 200 mM y ditioneitol 100 mM) (todos obtenidos de Sigma, St Louis, MO, EUA) y se determinó la concentración de proteínas con el kit de BIO-RAD. (Bio-Rad's protein assay, cat 500-0001 Hercules, CA, EUA). Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (μ Quant Bio-Tek) en el programa KC4 a 650 nm. Se agregaron 50 μ g de los extractos proteicos en 5 μ l de buffer de carga 2 \times , se hirvieron 3 min y se sometieron a una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15% (PAGE) a 120 V durante 90 min a temperatura constante. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a 20 V durante 90 min a temperatura constante. Las membranas se lavaron con agua destilada y se bloquearon con Tris-Buffer salino con Tween-20 al 0.05% (TBST) suplementado con leche baja en grasas durante 30 min a temperatura constante. Posteriormente las membranas se incubaron toda la noche con el anticuerpo policlonal anti-caspasa 3 humana en agitación constante a 4 °C (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) en TBST/leche. Después, las membranas se lavaron seis veces con TBST cada 10 min y se incubaron con una solución de IgG (H+L) anti-conejo (1:15000, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, EUA). Las membranas se lavaron nuevamente con agua destilada y TBST (cuatro veces cada 10 min) y las bandas se visualizaron por detección con quimioluminiscencia (New

England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) usando placas Kodak Biomax MR. El análisis de densitometría se hizo con el programa Image-J, NIH Image versión 0.93e.

V.13 Microscopía electrónica para el análisis de cambios morfológicos de las moDC asociados a la apoptosis

Las moDC con los diferentes tratamientos fueron analizadas por microscopía electrónica utilizando el mismo método descrito anteriormente para la caracterización de las moDC y amastigotes de *L. mexicana*.

VI. Resultados

VI.1 Obtención de monocitos a partir de sangre periférica humana

Los monocitos se obtuvieron de agregados celulares sin plaquetas purificados por centrifugación en gradiente utilizando Hystopaque. Las células obtenidas de la interfase, que corresponde a las células mononucleares, se coincubaron con microperlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti CD14 y se purificaron por selección positiva con columna magnética. Los monocitos CD14⁺ se lavaron con PBS y se analizaron por citometría de flujo utilizando anticuerpos dirigidos contra marcadores característicos de los monocitos. Como se muestra en la figura 2, el 95% de las células fueron positivas para el marcador CD14 que es el receptor para LPS y se encuentra altamente expresado en estas células a diferencia del CD1a que únicamente se expresó en un 1%, ya que es un marcador expresado preferencialmente en las células dendríticas. Los monocitos mostraron también una expresión elevada de la molécula coestimuladora CD86 y del MHCII.

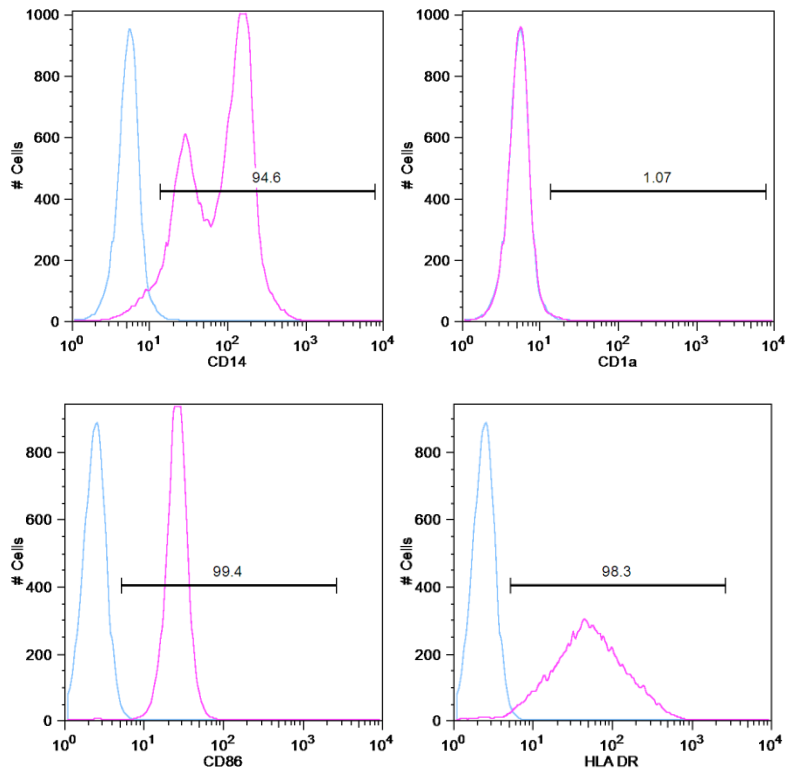


Figura 3. Caracterización de los monocitos de sangre periférica humana por citometría de flujo. Los monocitos se aislaron por selección positiva con microperlas magnéticas anti-CD14 y se determinó la expresión en superficie de CD14, CD1a, CD86 y HLADR por citometría de flujo.

VI.2 Obtención y caracterización de las moDC humanas

Las células dendríticas se diferenciaron a partir de los monocitos humanos mediante el cultivo con las citocinas GM-CSF e IL-4 de 7 días. Transcurrido este tiempo, las células se observaron en un microscopio invertido. La figura 3 muestra un cultivo de moDC en donde se observa una población principal no adherente y un gran número de células formando cúmulos, lo cual es una característica importante de las DC. Las moDC se caracterizaron por citometría de flujo con anticuerpos dirigidos contra los marcadores de superficie CD1a, CD80, CD86, CD206, CD209 y CD14 (Figura 4). En los histogramas de citometría se observa que el CD1a, que pertenece a la familia CD1 de moléculas presentadoras de lípidos se expresó ampliamente en las moDC. Las moDC mostraron una expresión elevada de los receptores de manosa (CD206) y DC-SIGN

(CD209). El receptor para LPS (CD14) (marcador de monocitos/macrófagos) no se expresó en las moDC y hubo una menor expresión de CD86 en comparación a los monocitos, lo cual es indicativo de una población de CD con un fenotipo inmaduro que corresponde a las moDC. Se obtuvo una pureza del 85-90% y una diferenciación adecuada de la población de monocitos a células dendríticas (Figura 4). Con respecto a la caracterización de dichas células por tinción Giemsa, en la figura 5 se muestran moDC de 7 días de cultivo, se observa el núcleo excéntrico y algunas moDC presentan las proyecciones típicas de estas células. Las moCD's también se caracterizaron por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo dirigido contra el marcador CD1a acoplado a ficoeritrina (PE) y a isotiocianato de fluoresceína (FITC), en la figura 6 se muestra moDC con expresión de CD1a y el núcleo irregular, no centralizado y teñido con DAPI de una típica moDC. En la figura 7 se observa a través de microscopía electrónica la morfología típica de las células dendríticas; con la presencia de un núcleo no centralizado, irregular con morfología de riñón, así como las dendritas que caracterizan a este tipo de células. También se observa que la célula posee bordes regulares y no se encuentra con alteraciones en el núcleo ni en el citoplasma ni en la membrana plasmática.



Figura 3. Fotografía de un cultivo de 7 días de células dendríticas diferenciadas a partir de monocitos humanos.

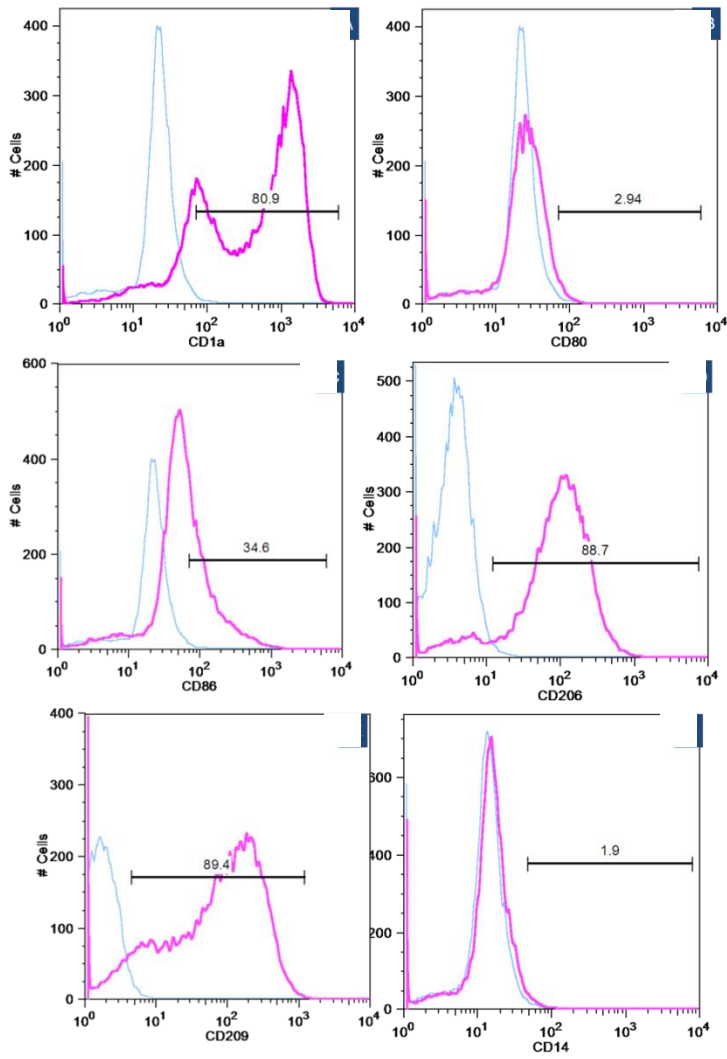


Figura 4. Caracterización de las células dendríticas por citometría de flujo empleando diversos marcadores de superficie.

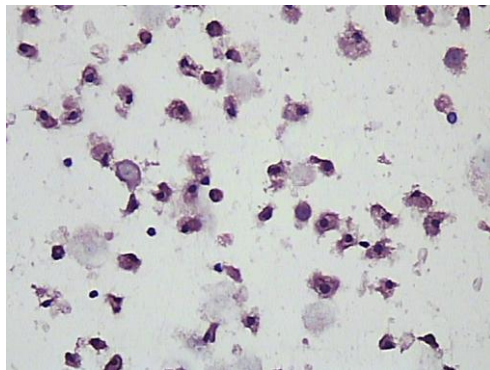


Figura 5. Caracterización de las moDC por tinción Giemsa por microscopía de luz 40 X 1.0



Figura 6. Caracterización de las moCD's por inmunofluorescencia y núcleo teñido con DAPI
 n=núcleo **Figura A. moCD's 40 × 1.0 con CD1a acoplado a FITC** **Figura B. moCDs 63 × 1.0**
CD1a acoplado a PE

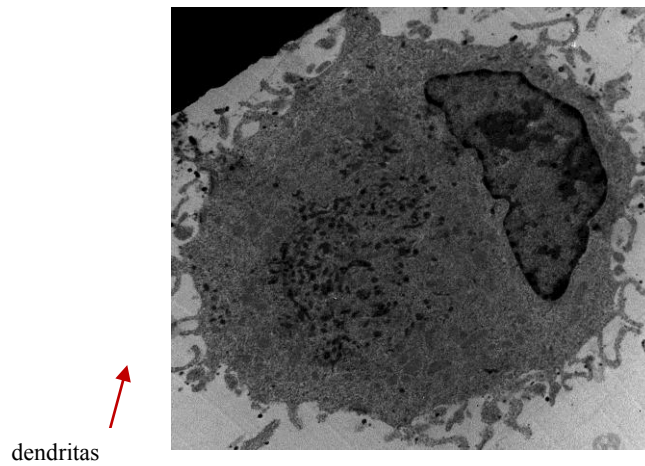


Figura 7. Caracterización de las moCD's por microscopía de barrido 1000×

VI.3 Obtención y caracterización de los amastigotes de *Leishmania mexicana*

En la figura 8 se muestra una fotografía de un cultivo de amastigotes observados por microscopía de campo claro y en la Fig. 9 se muestra un amastigote visto con microscopía electrónica con morfología típica; redondo, con presencia de peroxisomas, vacuolas y gránulos lipídicos así como bolsa flagelar y flagelo.

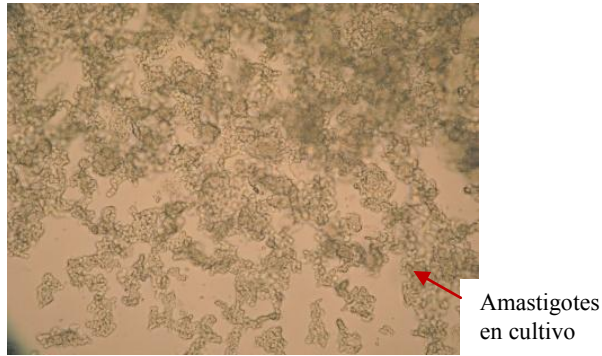


Figura 8. Microfotografía de los amastigotes de *L. mexicana* en cultivo 40X

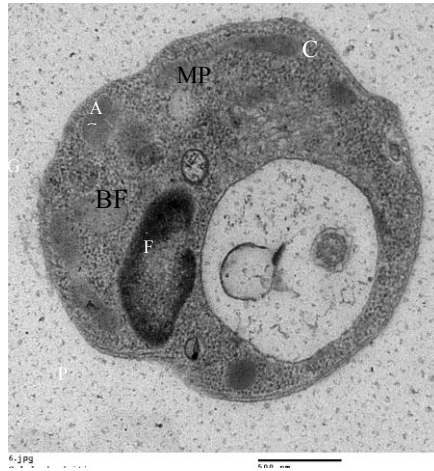


Figura 9. Ultraestructura de amastigote de *L. mexicana* de 7 días de cultivo axénico. Abreviaturas: N= núcleo, V= vacuola, C= cinetoplasto, P= peroxisoma, BF= bolsa flagelar, F= flagelo, MP= membrana plasmática, G= gránulo lipídico

VI.3.1 Curvas de crecimiento y pH del cultivo de los amastigotes de *Leishmania mexicana*

Se realizaron curvas de crecimiento de los amastigotes de *L. mexicana*. Los amastigotes en cultivo axénico se contaron diariamente y se determinó el pH del medio de cultivo. Como se observa en la figura 10 los amastigotes presentan una fase "lack" o fase de acoplamiento del día cero al día tres ya que su crecimiento no es exponencial porque se encuentra en una fase de adaptación a las nuevas condiciones impuestas. En el día cuatro y el día cinco su crecimiento se da de manera exponencial, pasando de ser una población de 1×10^6 a una población de 4×10^6 . Observamos que en el día seis y siete la población presenta una fase estacionaria, se estabiliza y deja de crecer exponencialmente. Por último, a partir del día 8 la población comienza a decrecer. El pH de los amastigotes no varía en ninguna de las fases de crecimiento de la población, se

mantiene constante en 5.5 hasta el día ocho, lo cual coincide con el día en que la población comienza a decrecer (Figura 11).

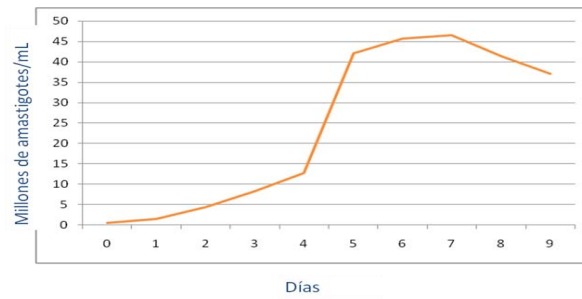


Figura 10. Curva de crecimiento de los amastigotes de *L. mexicana*

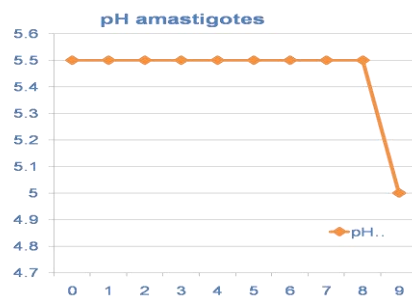


Figura 11. pH del cultivo de los amastigotes de *L. mexicana*

VI.4 Infección de las moDC con los amastigotes de *L. mexicana*

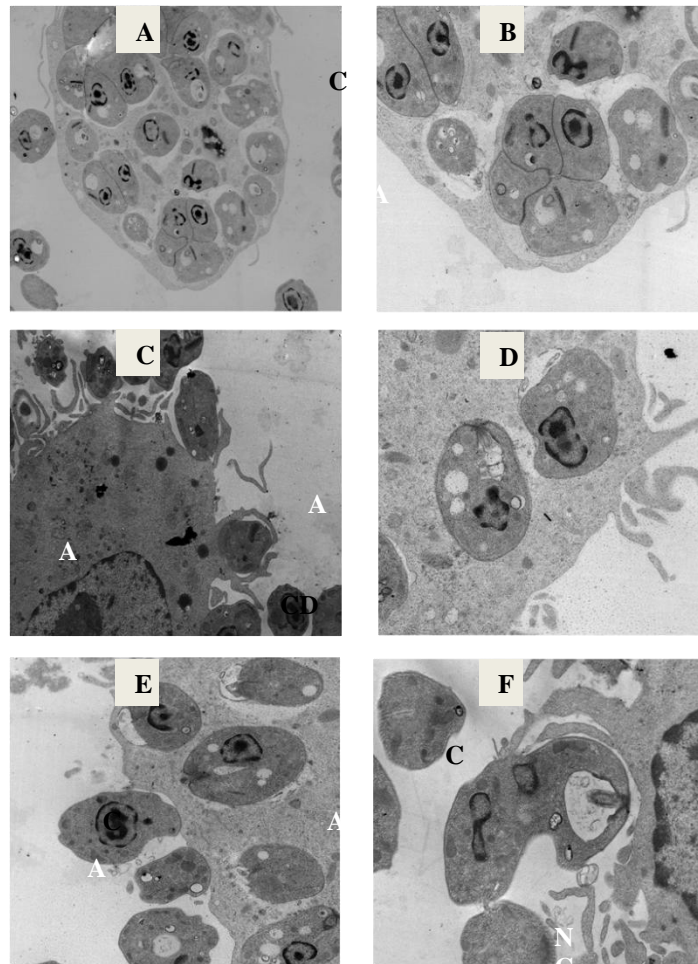


Figura 12. Microscopía electrónica de las moDC infectadas con los amastigotes de *L. mexicana*.

A= amastigote, DC= célula dendrítica, NCD= núcleo DC

A. 7500× B. 15000× C. 12000× D. 20000× E. 15000× F. 25000×

VI.5 Inducción de apoptosis en las moCD's con camptotecina

El modelo que se utilizó para determinar el efecto de los amastigotes de *L. mexicana* en la apoptosis de las células dendríticas fue el de apoptosis inducida con camptotecina, ya que por el tiempo de vida de las CD's, resulta más difícil trabajar con un modelo de apoptosis natural.

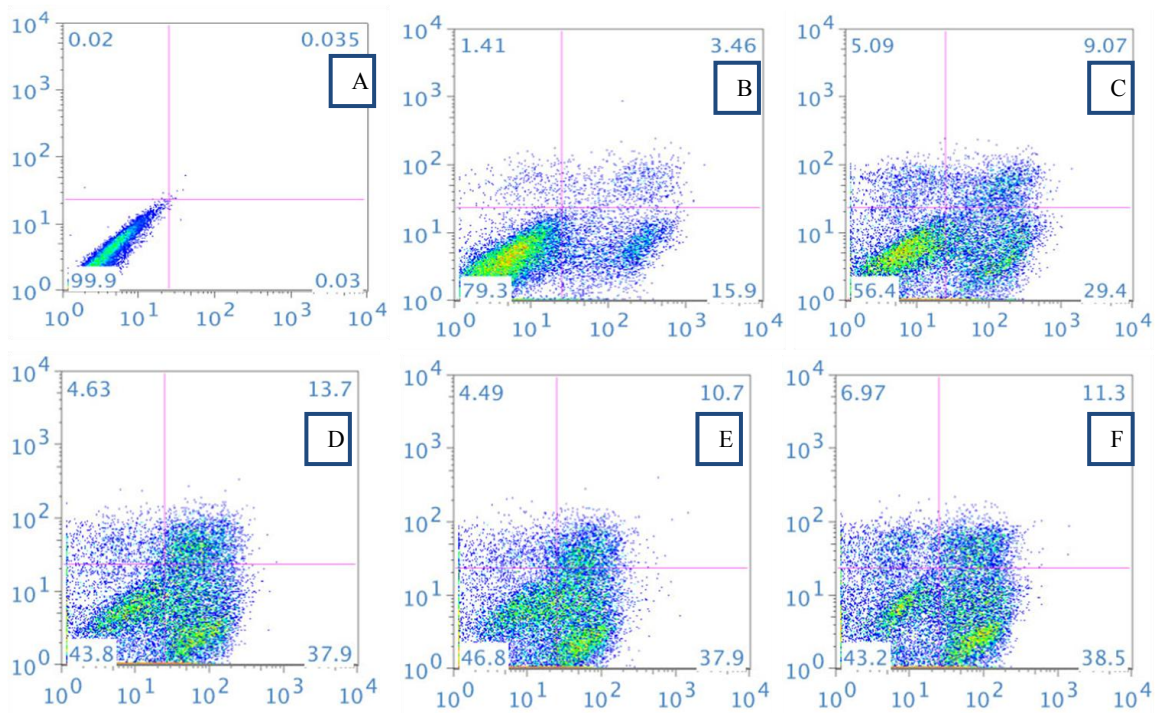


Figura 13. Efecto de la camptotecina en la translocación de la PS en las moCD's. Se realizó una curva dosis-respuesta sobre el efecto de diferentes concentraciones de la camptotecina en la translocación de PS en las moCD's determinada por citometría de flujo. Las condiciones determinadas fueron: A) moDC sin teñir B) moDC sin estímulo, C), moDC + camptotecina 5 μM, D) moDC + camptotecina 10 μM, E) moDC + camptotecina 25 μM y F) moDC + camptotecina 50 μM.

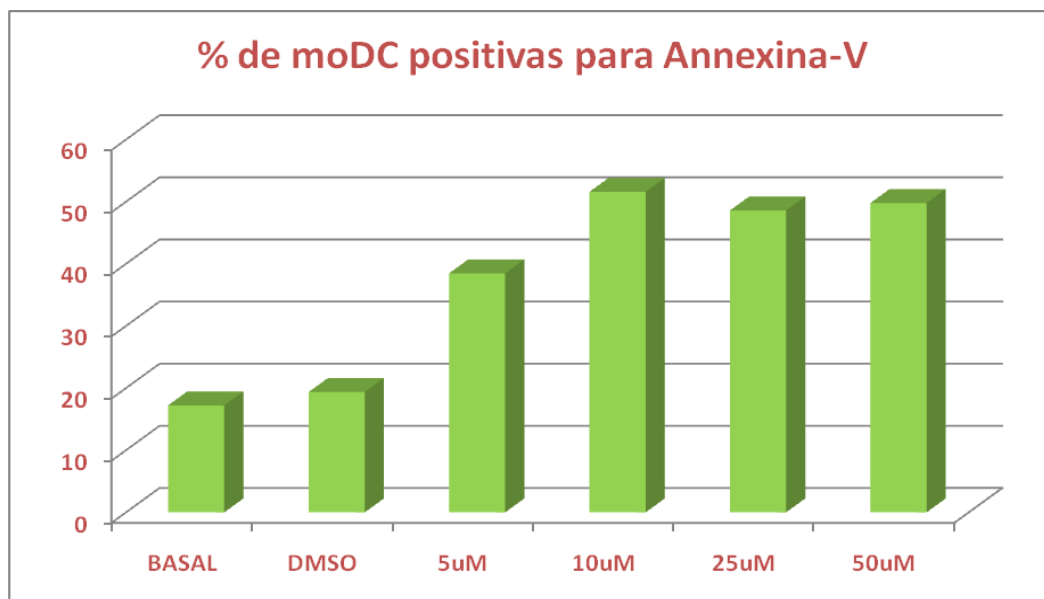


Figura 13. Gráfica del efecto de la camptotecina en la translocación de la PS en las moCD's. Se realizó una curva dosis-respuesta y en la figura se muestra el porcentaje total de moDC positivas para annexina-V.

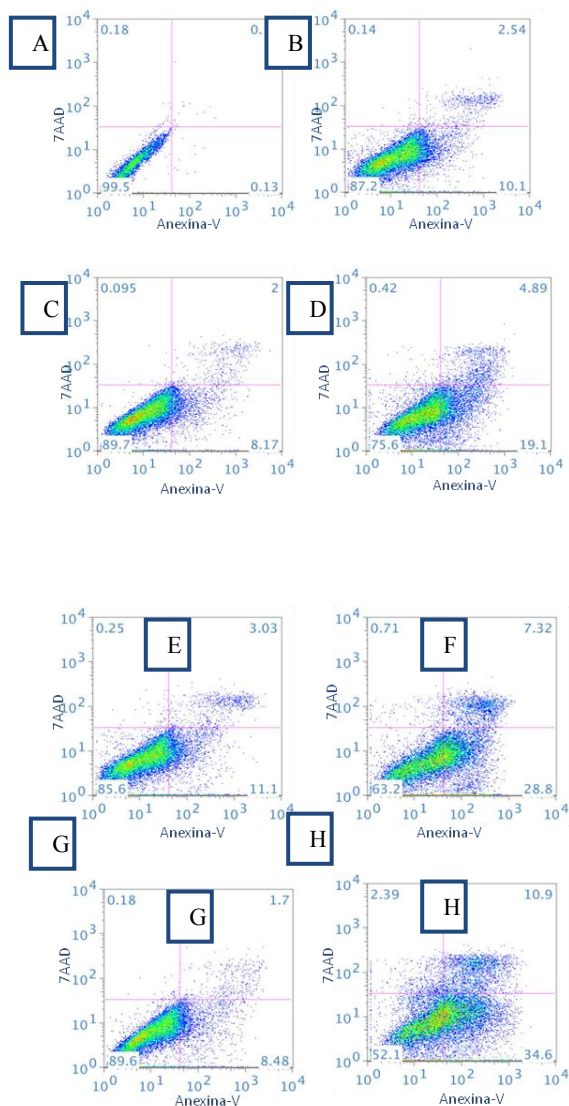


Figura 14. Tiempo de inducción de la la translocación de la PS en las moDC con la camptotecina. La concentración de camptotecina utilizada fue 10 μ M. Las condiciones determinadas fueron: A) moDC sin teñir, B) moDC + DMSO, C) moDC sin estímulo a las 6h, D) moDC + camptotecina a las 6 h, E) moDC sin estímulo a las 12 h, F) moDC + camptotecina a las 12h, G) moDC sin estímulo a las 24h y H) moDC + camptotecina a las 24 h

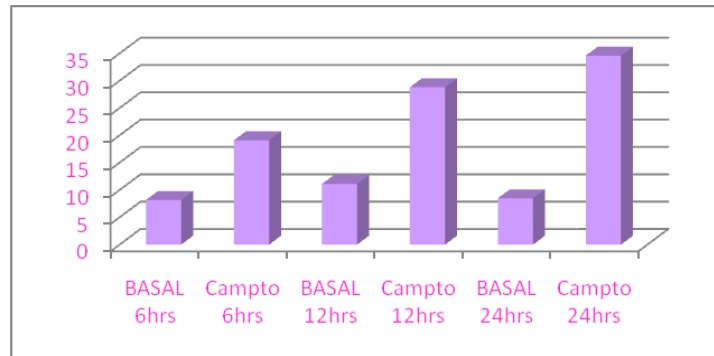
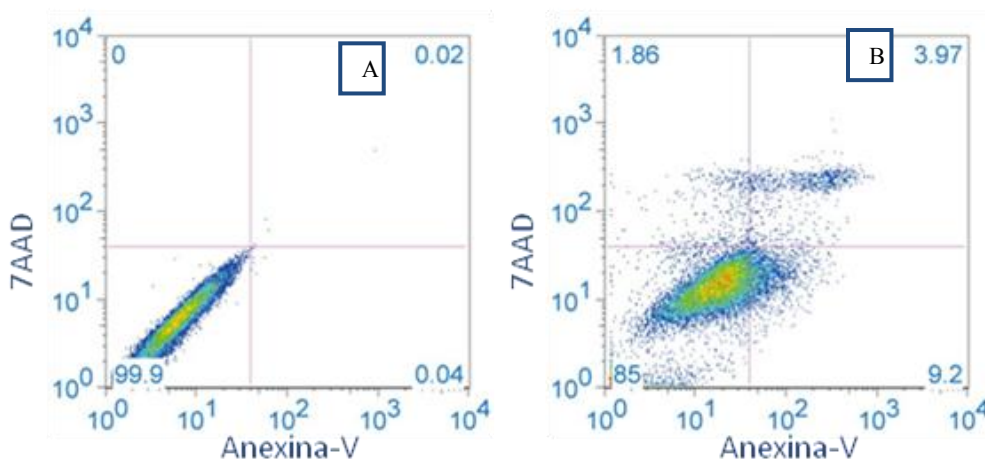


Figura 14. Gráfica del tiempo de inducción de la la translocación de la PS en las moCD's con la camptotecina. En esta figura se muestra el porcentaje total de moDC positivas para annexina-V con camptotecina 10µM a diferentes tiempos.

VI.6 Efecto de los amastigotes de *L. mexicana* en la translocación de la PS en las moCD's determinada por citometría de flujo Anexina-V/7AAD

Una vez que se conocieron la dosis y el tiempo óptimo de la inducción de la translocación de la PS por la camptotecina en las moCD's, se analizó el efecto de los amastigotes de *L. mexicana*. Las moCD's se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana* por 3 h a 25 °C, posteriormente se trataron con la camptotecina 10 µM 12 h a 37 °C y pasado este tiempo se llevó a cabo el marcaje con anexina V-FITV y 7AAD para la determinación de la apoptosis y necrosis por citometría de flujo.



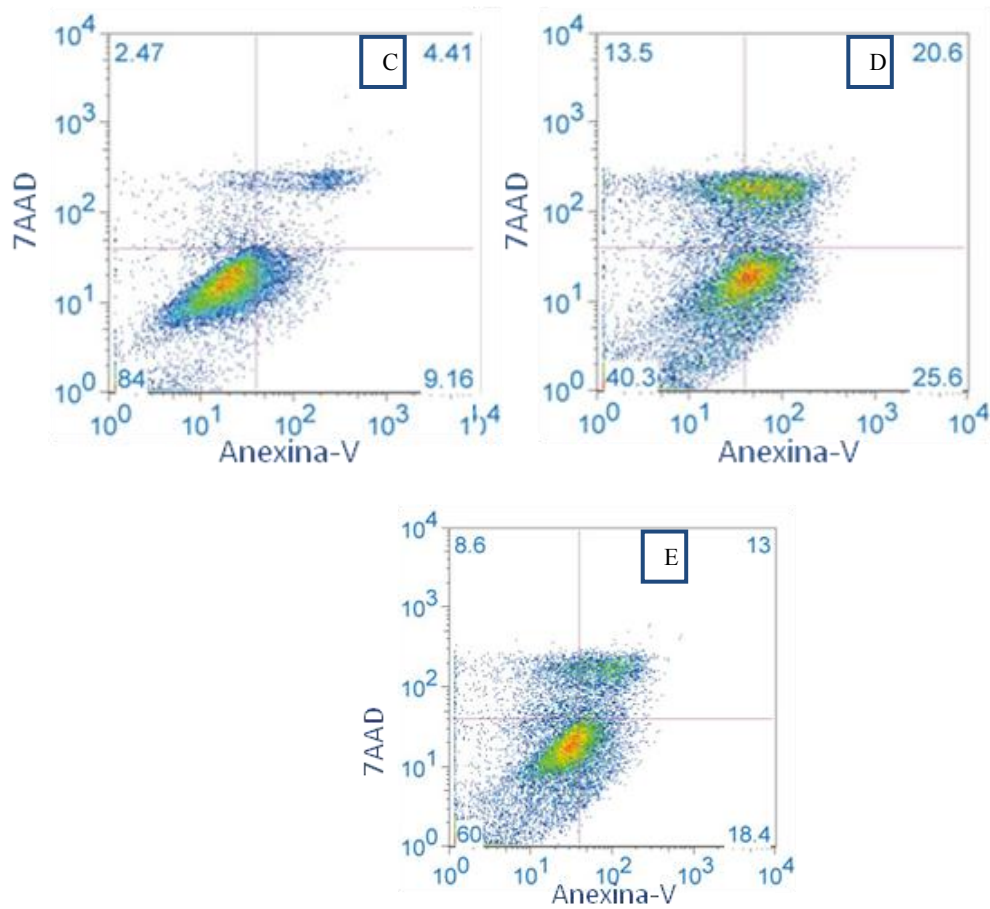


Figura 15. *Leishmania mexicana* inhibe la apoptosis en las moDC, analizado por la unión de Anexina-V a la fosfatidilserina externalizada. Las moDC se infectaron con los amastigotes de *Leishmania mexicana* en una proporción de 10:1 parásitos por moDC. **A-E** Un análisis por FACS representativo de tres experimentos independientes. **A.** moDC sin teñir, **B.** moDC no infectadas, **C.** moDC + amastigotes, **D.** moDC + camptotecina 10 μ M y **E.** moDC + amastigotes + camptotecina 10 μ M.

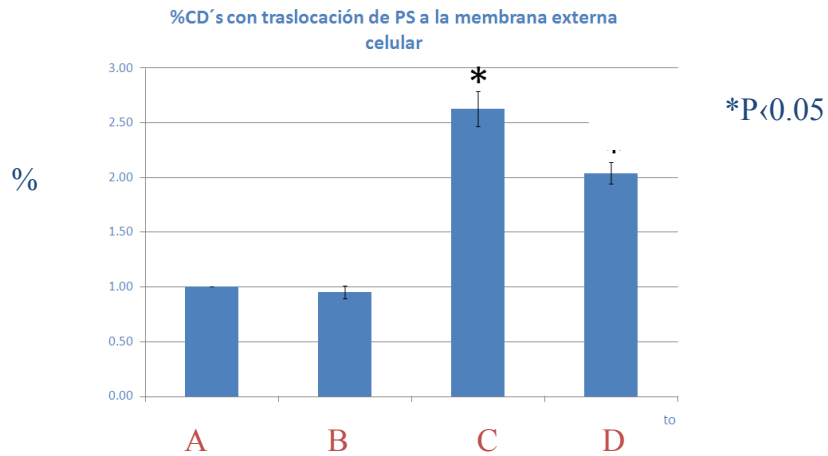


Figura 16. Gráfica de la inhibición de la apoptosis en las moDC por *Leishmania mexicana*, analizado por la unión de Anexina-V a la fosfatidilserina externalizada.. Gráfica del promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes de las moCD's tratadas bajo las diferentes condiciones experimentales. **A.** moCD's sin estímulo, **B.** moDC + amastigotes, **C.** moDC + camptotecina 10 μ M y **D.** moDC + amastigotes + camptotecina 10 μ M.

VI.7 Análisis de la fragmentación del DNA en los amastigotes de *Leishmania mexicana*

Como se observa en la figura 17, los amastigotes de *L. mexicana* mostraron un nivel muy bajo de apoptosis natural, revelado por la fragmentación del DNA medida en el ensayo de TUNEL.

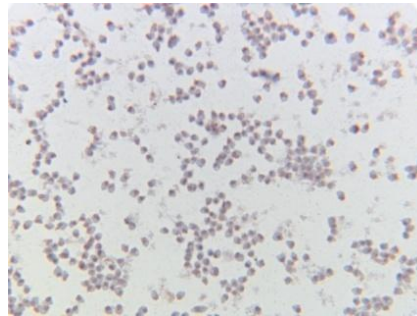
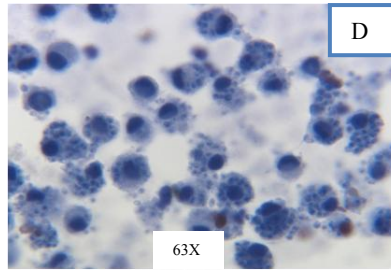
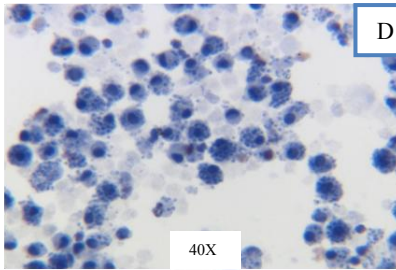
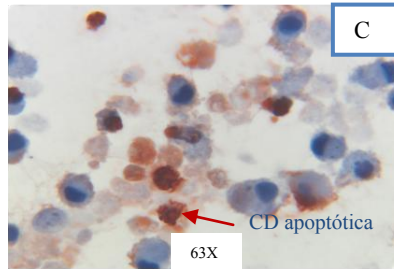
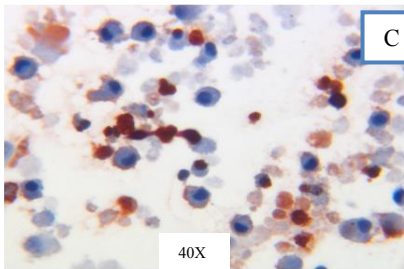
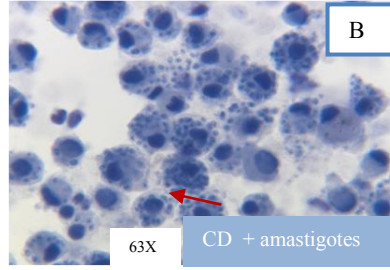
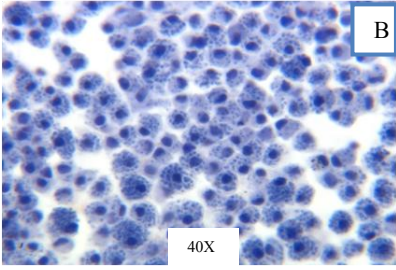
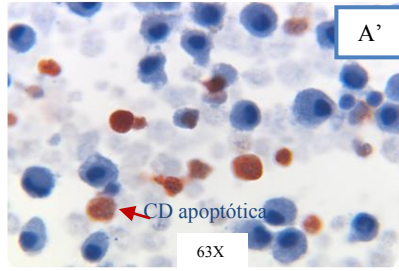
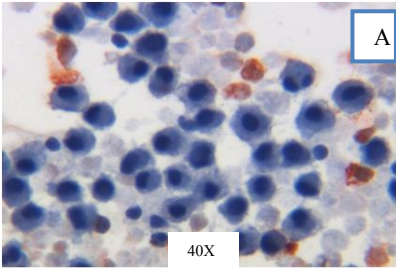


Figura 17. Apoptosis de los amastigotes detectada mediante TUNEL 63 \times 1.0

VI.8 Efecto de los amastigotes de *L. mexicana* en la fragmentación del DNA en las moCD's.

Como se muestra en la Figura 18, las moDC que se incubaron con medio únicamente (Figura 18 A y A') fueron negativas al TUNEL, de manera similar a la mayoría de las moDC que se infectaron con los amastigotes de *Leishmania mexicana* (Figura 18 B y B'). Después de la incubación con la camptotecina durante 12 horas muchas de las moDC mostraron una tinción intensa con el TUNEL (Figura 18 C y C'). En las células infectadas con los amastigotes de *L. mexicana* y tratadas con la camptotecina, la fragmentación del DNA se revirtió por completo, ya que las células son negativas a la tinción por TUNEL (Figura 18 D y D'). La incubación de las moCD's con las perlas de plástico no inhibió la fragmentación del DNA inducida por la camptotecina, ya que la tinción con el TUNEL fue similar a la obtenida con la camptotecina (Figura 18 E y E'). Estos resultados muestran que la infección de las moCD's con los amastigotes de *Leishmania mexicana* inhibe la aparición y el progreso de múltiples características asociadas a la apoptosis.



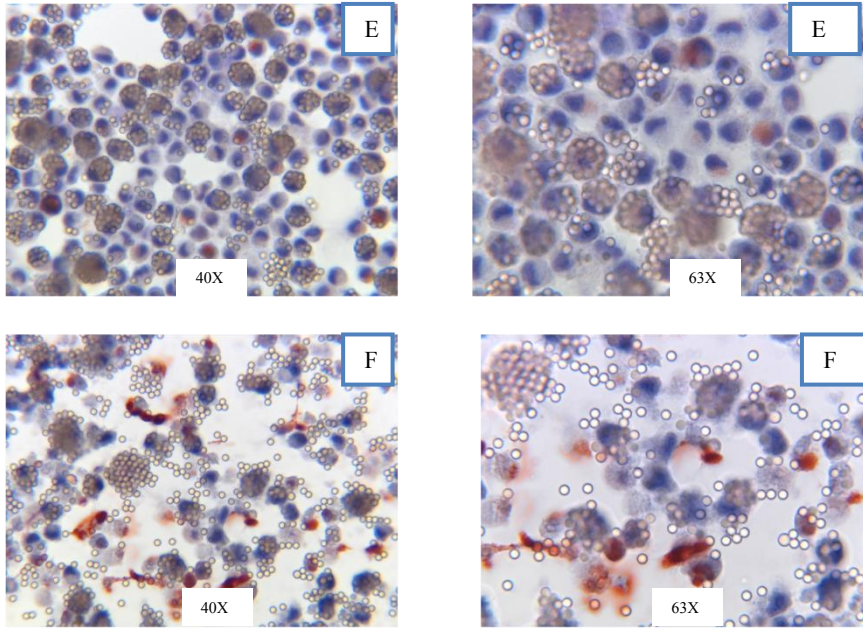
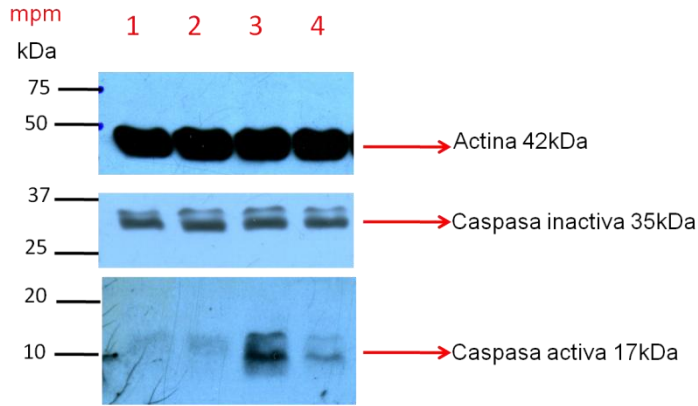


Figura 18. Apoptosis de las células dendríticas detectada mediante TUNEL. Las micrografías son representativas de un experimento repetido tres veces y muestran a las moDC tratadas en el siguiente orden: **A y A'**. Las células cultivadas solamente en medio, **B y B'**. moDC + amastigotes de *L. mexicana*, **C y C'**. moDC + camptotecina, **D y D'**. moDC + amastigotes + camptotecina, **E y E'**. moDC + perlas de plástico y **F y F'** moDC + perlas de plástico + camptotecina

VI.9 Los amastigotes de *Leishmania mexicana* inhiben el corte proteolítico de la caspasa 3

Como se muestra en la Figura, el tratamiento con la camptotecina indujo el procesamiento de la caspasa-3 con una disminución de la forma inactiva (32 kDa) y se observó el fragmento activo de 21 kDa en las moDC sin infectar. Por el contrario, en las células infectadas con los amastigotes de *Leishmania mexicana*, tratadas bajo condiciones idénticas, la presencia del fragmento activo fue menor de acuerdo a la determinación de la densidad de las bandas (Fig. 19B).



- 1 D
2 DC + amastigotes
3 DC + camptotecina
4 DC + amastigotes + camptotecina

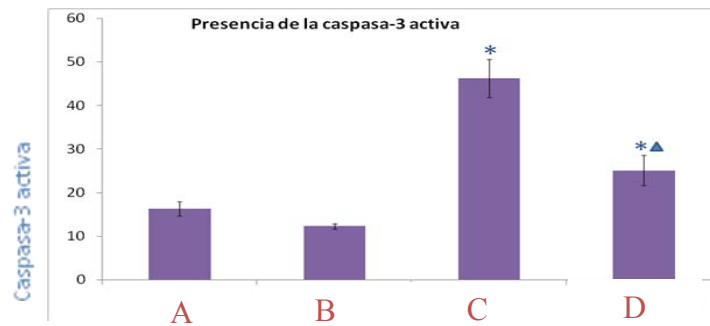


Figura 19. Efecto de los amastigotes de *Leishmania mexicana* en la activación de la caspasa-3 inducida por la camptotecina en las moDC. A. Presencia del fragmento de 17-kDa de la caspasa-3 determinada por inmunodetección después de 12 h de incubación con los amastigotes de *Leishmania mexicana* ya sea en presencia o ausencia de la camptotecina. **B.** Análisis densitométrico de la banda de 17-kDa (caspasa-3) y β -actina) presentes en el inmunoblot. A) moDC sin estímulo, B) moDC + amastigotes, C) moDC + camptotecina D)moDC + amastigotes + camptotecina

VI.10 Efecto de los amastigotes de *L. mexicana* en la apoptosis inducida en las moCD's analizado por microscopía de barrido

Como se muestra en la Figura, después de la incubación con la camptotecina durante 12 horas la moDC muestra una morfología completamente diferente ya que dicha célula se encuentra sin dendritas, con una morfología irregular, sin la presencia del núcleo no central de morfología de riñón, hay degradación de partes del citoplasma, además se observa un cuerpo apoptótico típico de la culminación de muerte celular apoptótica (Figura 20 C). Por otra parte la fotografía de la moDC que se infectó con los amastigotes de *Leishmania mexicana* muestra que la célula fagocitó más de diez amastigotes y la morfología de dicha célula permaneció intacta, muy parecida a las moDC sin

infectar que se incubaron con medio únicamente (Figura 20 A), con las dendritas típicas bien desarrolladas a causa de la activación de las células con los amastigotes (Figura 20 B). En la imagen de las células infectadas con los amastigotes de *L. mexicana* y tratadas con la camptotecina, la morfología de las moCD's se encuentra alterada; hay degradación de partes del citoplasma, el borde es irregular y las dendritas han desaparecido. En dicha imagen también se observa un cambio en la morfología y agrupación de los amastigotes que fueron fagocitados por la moCD puesto que los amastigotes se encuentran más alargados y agrupados en "clusters" dentro de las células aunque cabe destacar que no hay presencia de cuerpos apoptóticos (Figura 20 D). Estos resultados muestran que la infección de las moCD's con los amastigotes de *Leishmania mexicana* inhibe la aparición de cuerpos apoptóticos lo cual significa la culminación de la apoptosis pero no evita otro tipo de cambios morfológicos en las células como la degradación de partes del citoplasma y la ausencia de las dendritas.

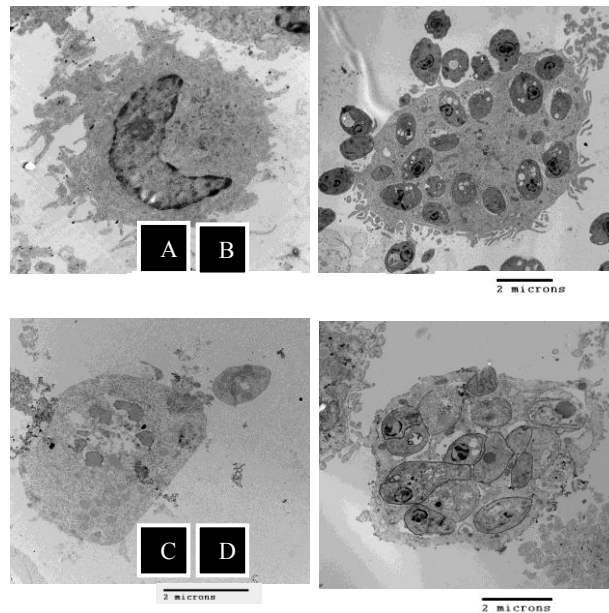


Figura 20. Efecto de los amastigotes de *L. mexicana* en los cambios morfológicos asociados a la apoptosis en las moCD's. A.-moCD's sin estímulo 10000 \times , B. moCD's + amastigotes 6000 \times , C. moCD's + camptotecina 10000 \times , D. moCD's + amastigotes + camptotecina 7500 \times

VII. DISCUSIÓN

La apoptosis es un proceso estrictamente regulado que mantiene la homeostasis del hospedero en un organismo sano. Es importante señalar que diferentes estudios recientes han revelado que cuando hay apoptosis en las células hospederas, en especial en las células del sistema inmune, está asociada a parásitos protozoarios (Gavrilescu and Denkers, 2003).

La principal observación reportada en el presente estudio es que la infección *in vitro* con los amastigotes de *Leishmania mexicana* de las moDC apoptóticas da como resultado la inhibición de dicha apoptosis. El proceso de apoptosis fue identificado por los siguientes parámetros: unión de la anexina V-FITC a la fosfatidilserina, detección de la fragmentación del DNA, activación de la caspasa-3 y el morfológico de las moDC.

La modulación de la apoptosis en las células del hospedero es un mecanismo que han desarrollado varios tipos de bacterias intracelulares tales como *Chlamydia* (Perfettini et al., 2003) y *Rickettsiae* (Clifton et al., 1998) y varios protozoarios intracelulares que incluyen a: *Toxoplasma gondii* (Sher et al., 1993) (Subauste et al., 1991), *Plasmodium* spp (Bonelo et al., 2000) (Blum-Tirouvanziam et al., 1995) (Rodrigues et al., 1991), *Trypanosoma cruzi* (Nickell et al., 1993), *Encephalitozoon cuniculi* (Khan et al., 1999), *Theileria* spp (Heussler et al., 1999), *Leishmania major* (da Conceicao-Silva et al., 1994) y *Leishmania mexicana* (Valdes-Reyes et al., 2009). Una de las formas como se modula la apoptosis es mediante la inhibición de la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ a través del complejo de histocompatibilidad MHC clase I (Gavrilescu and Denkers, 2003) y en respuesta a la liberación por parte de los linfocitos T citotóxicos de las moléculas de granzima y perforina. Algunos patógenos intracelulares no sólo son capaces de inhibir la apoptosis espontánea de las células hospederas sino también pueden inhibir la apoptosis inducida por una amplia variedad de agentes como estaurosporina, capmtotecina y luz UV (Gao and Abu Kwaik, 2000) (Heussler et al., 2001).

El parásito intracelular *Leishmania* induce una respuesta inmune que se puede dividir en varias fases basadas en el tipo celular que se activa. En la primera fase ocurre una invasión silenciosa de los macrófagos residentes en la piel, en la segunda fase las células del sistema

inmune se activan, migran y se desarrollan las lesiones en la piel y en la tercera fase las DC y los linfocitos T migran a órganos linfoides secundarios y coincide con la involución de la lesión (Von Stebut, 2007), lo cual destaca la importancia de las DC en la resolución de la enfermedad. Las DC contribuyen en la resolución de la enfermedad a través de la activación de diversas células del sistema inmune a través del MHC clase I, II y moléculas coestimuladoras, la liberación de la IL-12 y la inducción de la respuesta adaptativa por los linfocitos T (Moll, 1993) (von Stebut et al., 1998) (von Stebut et al., 2000).

Las células dendríticas son una población hospedera de *Leishmania*, por lo cual resulta necesario para dicho parásito mantener la sobrevivencia de estas células como una forma de mantener la propia. Existen observaciones previas que han mostrado que la infección con la forma de promastigote de *Leishmania* inhibe la apoptosis en varios tipos de células tales como los neutrófilos (Aga et al., 2002), los macrófagos (Akarid et al., 2004) (Moore and Matlashewski, 1994), los monocitos humanos de una línea celular (Lisi et al., 2005) y las moDC (Valdes-Reyes et al., 2009). En los macrófagos infectados con *Leishmania major*, el efecto antiapoptótico se relacionó con la inhibición de la liberación mitocondrial del citocromo c sin involucrar a la vía del NF- κ B, que se encuentra relacionada con la resistencia a la apoptosis inducida por la eliminación de M-CSF por un factor soluble secretado por los macrófagos infectados con dicho parásito (Akarid et al., 2004). Por otro lado la inhibición de la apoptosis espontánea de los neutrófilos el efecto se asoció con una reducción significativa de la actividad de la caspasa-3 en las células polimorfonucleares (Aga et al., 2002).

Recientemente nuestro grupo de trabajo analizó el efecto del parásito sobre la viabilidad de las células dendríticas derivadas de los monocitos humanos y tratadas con el inductor de apoptosis camptotecina y demostró que *in vitro* los promastigotes de *L. mexicana* la inhiben. El efecto inhibitorio fue analizado por ensayos del análisis morfológico de las moDC, detección de la fragmentación del DNA asociado a apoptosis, así como la translocación de la fosfatidilserina a la membrana externa celular. En este trabajo también se demostró que el retraso de la apoptosis en las moDC mediado por los promastigotes de *L. mexicana* está asociado con una notable disminución en la actividad de la caspasa- 3 (Valdes-Reyes et al., 2009).

El efecto inhibitorio de la apoptosis en diferentes células del sistema inmune causado por *Leishmania* se ha relacionado con varias moléculas, algunas pertenecientes al parásito y otras secretadas por la célula infectada. Una de estas moléculas reportada en la inhibición de la maquinaria apoptótica en los macrófagos del hospedero, así como en los monocitos humanos de la línea celular U-937, es el LPG, componente más abundante de la superficie de los promastigotes de *Leishmania* (Moore and Matlashewski, 1994) (Lisi et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, existen antecedentes sobre la inhibición de la apoptosis aunque todos los experimentos fueron hechos con la fase de promastigote del parásito. Hasta la fecha no existe ningún reporte sobre el efecto de los amastigotes sobre la apoptosis de las células hospederas del parásito. Por otra parte las células dendríticas son una importante célula hospedera para *Leishmania* y se ha reportado que *in vivo* este tipo de células fagocitan principalmente a los amastigotes de *Leishmania* (Locksley et al., 1988) (Blank et al., 1993) (von Stebut et al., 1998) (von Stebut et al., 2000) (Konecny et al., 1999) (Henri et al., 2002). Dada la importancia de los amastigotes en la enfermedad y las marcadas diferencias que existen entre las fases de promastigote y amastigote de *Leishmania*, en este trabajo se analizó el efecto de los amastigotes en la apoptosis inducida con camptotecina de las células dendríticas derivadas de monocitos.

Lo primero que hicimos en este estudio fue analizar el efecto de los amastigotes de *L. mexicana* en la apoptosis inducida por la camptotecina y determinada por la translocación de la fosfatidilserina a la membrana celular externa. Como se esperaba, el inductor de apoptosis incrementó la apoptosis de las células dendríticas dando como resultado un 26% de células apoptóticas (anexina-V⁺/7AAD⁻) y 21% de células no viables (anexina-V⁺ 7AAD⁺) a las 12 horas de incubación. Cuando las moDC se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana* se observó una apoptosis muy similar a la obtenida con las células que sólo fueron incubadas en medio. En las células únicamente incubadas en medio, el 85% de las moDC fueron viables (anexina-V⁻/7AAD⁻) y sólo el 9% fueron apoptóticas y en las moDC infectadas con los amastigotes de *L. mexicana* el 9% de las moCD's fueron apoptóticas mientras que el 4.41% no fueron viables. Al momento de coincubar las moDC infectadas con los amastigotes de *L. mexicana* con la camptotecina se

observó un efecto inhibitorio en la apoptosis, ya que el 18% de dichas moDC fueron apoptóticas mientras que el 13% no fueron viables. Este fenómeno de inhibición de la translocación de la fosfatidilserina coincide con los reportados anteriormente con los promastigotes de *L. infantum* en la inhibición de la apoptosis en los monocitos humanos de una línea celular y los promastigotes de *L. mexicana* en las células dendríticas derivadas de monocitos humanos (Lisi et al., 2005) (Valdes-Reyes et al., 2009). En comparación con los resultados obtenidos con las moDC y los promastigotes de *L. mexicana*, se observa que el efecto inhibitorio de los amastigotes en la translocación de la PS es mucho menos marcado que el obtenido con la fase de promastigote. En este estudio, las moDC tratadas con la camptotecina mostraron un 46% de apoptosis y el 13% fueron no viables; al coincubar las moDC infectadas con los promastigotes de *L. mexicana* y la camptotecina sólo el 1% de las moDC fueron apoptóticas y no hubo células no viables (Valdes-Reyes et al., 2009). Cabe destacar que en el estudio con los promastigotes la inducción de la apoptosis con la camptotecina se realizó en un tiempo diferente de 18 h, mientras que en el presente trabajo con los amastigotes la incubación de la apoptosis se hizo por 12 h.

Los datos obtenidos respecto a que los amastigotes de *L. mexicana* incrementan la viabilidad de las células dendríticas tratadas con la camptotecina nos llevó a analizar el efecto del parásito en la apoptosis con el parámetro apoptótico de la fragmentación del DNA, que fue analizado por el marcaje enzimático de los fragmentos del DNA con dUTP fluoresceinado con la técnica de TUNEL. Se observó claramente un efecto inhibitorio de la apoptosis ya que al infectar las moCD's con los amastigotes de *L. mexicana* e incubarlas con la camptotecina hubo una disminución notable de la fragmentación del DNA. Se observa claramente un abatimiento total de la apoptosis en las moCD's infectadas con los amastigotes y tratadas con la camptotecina, obteniendo una tinción muy similar a la de las células incubadas en medio únicamente. Este efecto inhibitorio de la apoptosis por parte del parásito también coincide con los reportados anteriormente con los promastigotes en los neutrófilos, los macrófagos, los monocitos humanos de una línea celular y en las moDC (Aga et al., 2002) (Ruhland et al., 2007) (Moore and Matlashewski, 1994) (Lisi et al., 2005) (Valdes-Reyes et al., 2009). Resulta interesante que a diferencia de la inhibición de la translocación de la PS, el resultado de la inhibición de la fragmentación del DNA fue más

contundente en el caso de la infección con los amastigotes que con los promastigotes. Por otra parte también se observa que la apoptosis espontánea es abatida por completo con los amastigotes mientras que los promastigotes no muestran una disminución tan importante de esta apoptosis espontánea.

La inducción de la apoptosis con la camptotecina implica un paso dependiente de la mitocondria, controlado por los miembros de de la familia Bcl-2/Bax, que lleva a la permeabilización de la membrana interna mitocondrial y ocasiona la liberación hacia el citosol de las proteínas del espacio intermembranal como el citocromo c, lo que resulta en la activación secuencial de una familia de proteasas que cortan enzimas reparadoras, proteínas del citoesqueleto y proteínas estructurales del núcleo (Green and Reed, 1998) (Wei et al., 2001). Por esta razón, analizamos el efecto de los amastigotes de *Leishmania mexicana* sobre la activación de la caspasa-3. En este trabajo se muestra que los amastigotes de *L. mexicana* incrementan la supervivencia de las moDC mediante un mecanismo que implica la inhibición de la actividad de la caspasa-3, esto se demuestra ya que se redujo significativamente la actividad de dicha caspasa en las moDC infectadas con los amastigotes y tratadas con la camptotecina. Este fenómeno también es congruente con los resultados reportados con los promastigotes de *L. infantum* en los monocitos de una línea celular y los promastigotes de *L. mexicana* en las moDC (Valdes-Reyes et al., 2009) (Lisi et al., 2005). En el caso de las moDC hubo un mayor efecto inhibitor de la activación de la caspasa-3 con la fase de amastigote que con la fase de promastigote.

Por último, analizamos el efecto de los amastigotes con base en algunos cambios morfológicos típicos de la apoptosis. Utilizando microscopía electrónica, mostramos que la incubación con la camptotecina da como resultado una morfología apoptótica típica de las moDC, en donde no se observaba el núcleo se observaba condensado y se visualizan cuerpos apoptóticos. Por el contrario, la morfología de las células sin tratamiento es típica de una moDC, con un núcleo no condensado, periférico, con forma de riñón y dendritas cortas, lo que muestra que las moCD's no se encontraban activadas. Una vez que las moCD's fueron infectadas con los amastigotes de *L. mexicana*, se observan muchos parásitos al interior de la célula y otros en proceso de ser fagocitados, lo que muestra la gran capacidad que tienen estas células de fagocitar

a los amastigotes de *Leishmania*. Al tratar a las moCD's infectadas con los amastigotes con la camptotecina no se observa la presencia de los cuerpos apoptóticos, pero interesantemente, la morfología de la célula cambió completamente dejando de tener una morfología típica de una moDDC. Las proyecciones cambiaron de unas dendritas finas tipo espinas a unas más gruesas y muy escasas. También se observan cambios en la forma del núcleo, ya que desaparece la forma típica arriñonada e irregular de las moDC y se convierte en un óvalo. Es importante destacar que no sólo la morfología típica de las moDC cambia sino también la morfología de los amastigotes. Dichos amstigotes dejan de ser totalmente redondos y se agrupan más en cúmulos dentro de la célula. Por lo anterior, resultaría muy interesante analizar la funcionalidad de dichas células infectadas y tratadas con la camptotecina. Esta funcionalidad se podría analizar a través de la expresión del MHC clase I, II y moléculas coestimuladoras, en la liberación de la IL-12 y en la inducción de la respuesta adaptativa por los linfocitos T.

Por otra parte, los diferentes trabajos sobre la inhibición de la apoptosis de diferentes células por los promastigotes de *Leishmania* indican que probablemente éstos emplean un mecanismo común para bloquear la apoptosis de la célula infectada, el cual no ha sido identificado. Basados en los resultados anteriores, en donde encontramos algunas diferencias en la inhibición de la apoptosis entre los amastigotes y los promastigotes, es probable que el mecanismo empleado por las dos fases del parásito sea diferente. Ruhland y colaboradores (2007) demostraron que los promastigotes de *Leishmania* activan la vía de señalización de PI3K/Akt para conferir a la célula hospedera resistencia a la apoptosis.

En este estudio describimos la inhibición de la apoptosis inducida y la tendencia de la inhibición de la apoptosis espontánea en las moDC's por los amastigotes de *L. mexicana*. Existen varios reportes que demuestran que los organismos intracelulares inhiben la apoptosis inducida y no la apoptosis espontánea de la célula hospedera (Gao and Abu Kwaik, 2000) (Heussler et al., 2001) (Nash et al., 1998) aunque existen también reportes como el de Aga y colaboradores (2002) en el que se demuestra que un parásito intracelular como *Leishmania* es capaz de inhibir la apoptosis espontánea de las células. En consecuencia cabe la posibilidad que los diferentes

organismos patógenicos sean capaces de utilizar más de un mecanismo para permitir la supervivencia de su célula hospedera.

En esta investigación obtuvimos datos que ahondan en la inhibición de la apoptosis inducida con la camptotecina por los amastigotes de *L. mexicana* en las moDC, la cual se ve reflejada en la disminución de la translocación de la fosfatidilserina a la membrana externa celular, así como en la fragmentación del DNA, la activación de la caspasa-3 y los cambios morfológicos; siendo el efecto inhibitor analizado con estos tres últimos parámetros más contundente con los amastigotes que con los promastigotes.

En investigaciones posteriores es necesario clarificar el efecto en la funcionalidad de las moDC en los que la apoptosis fue inhibida por los amastigotes, el impacto de dicha apoptosis en la supervivencia y replicación del parásito, así como identificar las moléculas propias del parásito o secretadas por las células hospederas que llevan a cabo esta inhibición de la apoptosis y la vía o vías por medio de la cual *Leishmania* inhibe la apoptosis, vislumbrando si es efectivamente un mecanismo diferente al de los promastigotes.

VIII CONCLUSIONES

Las células dendríticas son una población celular hospedera de *Leishmania*, que además participa de manera importante en la respuesta inmune contra dicho parásito. Las células dendríticas derivadas de los monocitos humanos coincubadas con el inductor apoptótico camptotecina presentan el mayor porcentaje de apoptosis a una concentración de camptotecina 10 μ M y a las 24hrs de incubación.

La muerte apoptótica de las células dendríticas derivadas de los monocitos humanos por la acción de la camptotecina tiene como consecuencias los cambios morfológicos típicos de apoptosis, la degradación del DNA, la activación de caspasa 3 y la translocación de la fosfatidilserina.

Los amastigotes de *Leishmania mexicana* son capaces de inhibir la apoptosis inducida con la camptotecina en las células dendríticas derivadas de monocitos humanos reduciendo

patrones apoptóticos tales como la degradación del DNA, la activación de la caspasa-3 y la translocación de la fosfatidilserina.

IX BIBLIOGRAFÍA

Aga, E., Katschinski, D.M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Muller, K., Solbach, W., and Laskay, T. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol* 169, 898-905.

Ahuja, S.S., Reddick, R.L., Sato, N., Montalbo, E., Kostecky, V., Zhao, W., Dolan, M.J., Melby, P.C., and Ahuja, S.K. (1999). Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *J Immunol* 163, 3890-3897.

Akarid, K., Arnoult, D., Micic-Polianski, J., Sif, J., Estaquier, J., and Ameisen, J.C. (2004). *Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *J Leukoc Biol* 76, 95-103.

Akiyama, Y., Stevenson, G.W., Schlick, E., Matsushima, K., Miller, P.J., and Stevenson, H.C. (1985). Differential ability of human blood monocyte subsets to release various cytokines. *J Leukoc Biol* 37, 519-530.

Arur, S., Uche, U.E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A.E., Mohler, W., and Han, D.K. (2003). Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* 4, 587-598.

Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-692.

Balamurugan, K., Rajaram, R., and Ramasami, T. (2004). Caspase-3: its potential involvement in Cr(III)-induced apoptosis of lymphocytes. *Mol Cell Biochem* 259, 43-51.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Barry, M., and McFadden, G. (1998). Apoptosis regulators from DNA viruses. *Curr Opin Immunol* 10, 422-430.

Bayir, H., Fadeel, B., Palladino, M.J., Witasz, E., Kurnikov, I.V., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Amoscato, A.A., Jiang, J., Kochanek, P.M., *et al.* (2006). Apoptotic interactions of cytochrome c: redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1757, 648-659.

Beck, G., and Habicht, G.S. (1996). Immunity and the invertebrates. *Sci Am* 275, 60-63, 66.

Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., Melamed, M.R., and Darzynkiewicz, Z. (1999). Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 35, 181-195.

Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., and Sacks, D. (2000). A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* 165, 969-977.

Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M.C., and Sacks, D. (2002). CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 168, 3992-4000.

Berberich, C., Ramirez-Pineda, J.R., Hambrecht, C., Alber, G., Skeiky, Y.A., and Moll, H. (2003). Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol* 170, 3171-3179.

Beretta, G.L., Perego, P., and Zunino, F. (2006). Mechanisms of cellular resistance to camptothecins. *Curr Med Chem* 13, 3291-3305.

Blanco, E., Kessinger, C.W., Sumer, B.D., and Gao, J. (2009). Multifunctional micellar nanomedicine for cancer therapy. *Exp Biol Med (Maywood)* 234, 123-131.

Blank, C., Fuchs, H., Rappersberger, K., Rollinghoff, M., and Moll, H. (1993). Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis* 167, 418-425.

Blum-Tirouvanziam, U., Servis, C., Habluetzel, A., Valmori, D., Men, Y., Esposito, F., Del Nero, L., Holmes, N., Fasel, N., and Corradin, G. (1995). Localization of HLA-A2.1-restricted T cell epitopes in the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *J Immunol* 154, 3922-3931.

Bonelo, A., Valmori, D., Triponez, F., Tiercy, J.M., Mentha, G., Oberholzer, J., Champagne, P., Romero, J.F., Esposito, F., Nebie, I., *et al.* (2000). Generation and characterization of malaria-specific human CD8(+) lymphocyte clones: effect of natural polymorphism on T cell recognition and endogenous cognate antigen presentation by liver cells. *Eur J Immunol* 30, 3079-3088.

Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., and Cidlowski, J.A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 5, 21-26.

Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., and Henson, P.M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272, 26159-26165.

Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O., and Irimie, A. (2009). Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* 48, 811-821.

Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919-923.

Clifton, D.R., Goss, R.A., Sahni, S.K., van Antwerp, D., Baggs, R.B., Marder, V.J., Silverman, D.J., and Sporn, L.A. (1998). NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4646-4651.

Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.

Crozat, K., Guiton, R., Guillems, M., Henri, S., Baranek, T., Schwartz-Cornil, I., Malissen, B., and Dalod, M. (2010). Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol Rev* 234, 177-198.

Cryns, V., and Yuan, J. (1998). Proteases to die for. *Genes Dev* 12, 1551-1570.

Cuello-Carrion, F.D., and Ciocca, D.R. (1999). Improved detection of apoptotic cells using a modified in situ TUNEL technique. *J Histochem Cytochem* 47, 837-839.

Chauhan, D., Pandey, P., Ogata, A., Teoh, G., Krett, N., Halgren, R., Rosen, S., Kufe, D., Kharbanda, S., and Anderson, K. (1997). Cytochrome c-dependent and -independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 272, 29995-29997.

Chen, A.Y., and Liu, L.F. (1994). Design of topoisomerase inhibitors to overcome MDR1-mediated drug resistance. *Adv Pharmacol* 29B, 245-256.

Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010-1014.

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 37, 299-310.

da Conceicao-Silva, F., Perlaza, B.L., Louis, J.A., and Romero, P. (1994). Leishmania major infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ cytotoxic T cell responses. *Eur J Immunol* 24, 2813-2817.

Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.

Deveraux, Q.L., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1999). Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol* 19, 388-398.

Dey, A., Tergaonkar, V., and Lane, D.P. (2008). Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53 and NF-kappaB pathways. *Nat Rev Drug Discov* 7, 1031-1040.

Dong, H.P., Holth, A., Ruud, M.G., Emilsen, E., Risberg, B., and Davidson, B. (2010). Measurement of apoptosis in cytological specimens by flow cytometry: comparison of Annexin V, caspase cleavage and dUTP incorporation assays. *Cytopathology*.

Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-6046.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.

Ferguson, M.A. (1997). The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352, 1295-1302.

Filippi, C., Hugues, S., Cazareth, J., Julia, V., Glaichenhaus, N., and Ugolini, S. (2003). CD4+ T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells. *J Exp Med* 198, 201-209.

Flohe, S., Lang, T., and Moll, H. (1997). Synthesis, stability, and subcellular distribution of major histocompatibility complex class II molecules in Langerhans cells infected with Leishmania major. *Infect Immun* 65, 3444-3450.

Flohe, S.B., Bauer, C., Flohe, S., and Moll, H. (1998). Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite Leishmania major. *Eur J Immunol* 28, 3800-3811.

Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 83-87.

Gao, L., and Abu Kwaik, Y. (2000). Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. *Microbes Infect* 2, 1705-1719.

- Gao, L.Y., and Kwai, Y.A. (2000). The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 8, 306-313.
- Gavrilescu, L.C., and Denkers, E.Y. (2003). Apoptosis and the balance of homeostatic and pathologic responses to protozoan infection. *Infect Immun* 71, 6109-6115.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.
- Geske, F.J., and Gerschenson, L.E. (2001). The biology of apoptosis. *Hum Pathol* 32, 1029-1038.
- Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Henri, S., Curtis, J., Hochrein, H., Vremec, D., Shortman, K., and Handman, E. (2002). Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production. *Infect Immun* 70, 3874-3880.
- Herbomel, P., Thisse, B., and Thisse, C. (1999). Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* 126, 3735-3745.
- Herwaldt, B.L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.
- Heussler, V.T., Kuenzi, P., and Rottenberg, S. (2001). Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol* 31, 1166-1176.
- Heussler, V.T., Machado, J., Jr., Fernandez, P.C., Botteron, C., Chen, C.G., Pearce, M.J., and Dobbelaere, D.A. (1999). The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7312-7317.
- Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K., and Sasada, M. (1998). Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med* 187, 587-600.
- Horlock, C., Shakib, F., Mahdavi, J., Jones, N.S., Sewell, H.F., and Ghaemmaghami, A.M. (2007). Analysis of proteomic profiles and functional properties of human peripheral blood myeloid dendritic cells, monocyte-derived dendritic cells and the dendritic cell-like KG-1 cells reveals distinct characteristics. *Genome Biol* 8, R30.
- Iwasaki, A. (2007). Division of labor by dendritic cells. *Cell* 128, 435-436.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291-295.
- Janeway, C.A., Jr. (1993). How the immune system recognizes invaders. *Sci Am* 269, 72-79.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Janicke, R.U., Ng, P., Sprengart, M.L., and Porter, A.G. (1998). Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem* 273, 15540-15545.
- Kanegae, K., Tamura, M., Kabashima, N., Serino, R., Tokunaga, M., Oikawa, S., and Nakashima, Y. (2005). Synergistic induction of monocyte chemoattractant protein-1 by integrins and platelet-derived growth factor via focal adhesion kinase in mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 20, 2080-2088.

- Kepler, J.A., Wani, M.C., McNaull, J.N., Wall, M.E., and Levine, S.G. (1969). Plant antitumor agents. IV. An approach toward the synthesis of camptothecin. *J Org Chem* 34, 3853-3858.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Kasper, L.H., and Moretto, M. (1999). CD8+ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol* 162, 6086-6091.
- Kiechle, F.L., and Zhang, X. (2002). Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta* 326, 27-45.
- Konecny, P., Stagg, A.J., Jebbari, H., English, N., Davidson, R.N., and Knight, S.C. (1999). Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation in vitro. *Eur J Immunol* 29, 1803-1811.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenaabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14, 44-55.
- Le Borgne, M., Dubois, B., and Kaiserlian, D. (2007). [Dendritic cells of mucosa and skin: "recruited for vaccination"]. *Med Sci (Paris)* 23, 819-825.
- Leon, B., and Ardavin, C. (2008). Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol Cell Biol* 86, 320-324.
- Leon, B., Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2005). Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* 17, 313-318.
- Leon, B., Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26, 519-531.
- Linde, V., Flodgaard, H., Kastrop, J.S., and Bjorn, S. (2000). Measurement of apoptosis by the TUNEL method using scintillating microplates. *Anal Biochem* 280, 186-188.
- Lisi, S., Sisto, M., Acquafredda, A., Spinelli, R., Schiavone, M., Mitolo, V., Brandonisio, O., and Panaro, M. (2005). Infection with *Leishmania infantum* Inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *J Eukaryot Microbiol* 52, 211-217.
- Locksley, R.M., Heinzl, F.P., Fankhauser, J.E., Nelson, C.S., and Sadick, M.D. (1988). Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. *Infect Immun* 56, 336-342.
- Luder, C.G., Gross, U., and Lopes, M.F. (2001). Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol* 17, 480-486.
- McConville, M.J., and Blackwell, J.M. (1991). Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem* 266, 15170-15179.
- McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A., and Sacks, D.L. (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J* 11, 3593-3600.

- McMaster, W.R., Morrison, C.J., MacDonald, M.H., and Joshi, P.B. (1994). Mutational and functional analysis of the Leishmania surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology 108 Suppl*, S29-36.
- Mellman, I., Turley, S.J., and Steinman, R.M. (1998). Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol 8*, 231-237.
- Menetrier-Caux, C., Thomachot, M.C., Alberti, L., Montmain, G., and Blay, J.Y. (2001). IL-4 prevents the blockade of dendritic cell differentiation induced by tumor cells. *Cancer Res 61*, 3096-3104.
- Moll, H. (1993). Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today 14*, 383-387.
- Moore, K.J., and Matlashewski, G. (1994). Intracellular infection by Leishmania donovani inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol 152*, 2930-2937.
- Mougneau, E., Altare, F., Wakil, A.E., Zheng, S., Coppola, T., Wang, Z.E., Waldmann, R., Locksley, R.M., and Glaichenhaus, N. (1995). Expression cloning of a protective Leishmania antigen. *Science 268*, 563-566.
- Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., *et al.* (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol 8*, 1217-1226.
- Nash, P.B., Purner, M.B., Leon, R.P., Clarke, P., Duke, R.C., and Curiel, T.J. (1998). Toxoplasma gondii-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol 160*, 1824-1830.
- Nickell, S.P., Stryker, G.A., and Arevalo, C. (1993). Isolation from Trypanosoma cruzi-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. *J Immunol 150*, 1446-1457.
- Ohno, M., Takemura, G., Ohno, A., Misao, J., Hayakawa, Y., Minatoguchi, S., Fujiwara, T., and Fujiwara, H. (1998). "Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with In situ nick end-labeling. *Circulation 98*, 1422-1430.
- Olivier, M., Gregory, D.J., and Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev 18*, 293-305.
- Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol 8*, 1207-1216.
- Palucka, A.K., Connolly, J., Ueno, H., Kohl, J., Paczesny, S., Dhodapkar, M., Fay, J., and Banchereau, J. (2005). Spontaneous proliferation and type 2 cytokine secretion by CD4+T cells in patients with metastatic melanoma vaccinated with antigen-pulsed dendritic cells. *J Clin Immunol 25*, 288-295.
- Perfettini, J.L., Ojcius, D.M., Andrews, C.W., Jr., Korsmeyer, S.J., Rank, R.G., and Darville, T. (2003). Role of proapoptotic BAX in propagation of Chlamydia muridarum (the mouse pneumonitis strain of Chlamydia trachomatis) and the host inflammatory response. *J Biol Chem 278*, 9496-9502.

Pimienta, P.F., and de Souza, W. (1986). Structural observations on the attachment of promastigotes of *Leishmania mexicana amazonensis* to the surface of macrophages. *Microsc Electron Biol Celular* 10, 65-75.

Porter, A.G., and Janicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 99-104.

Pradelli, L.A., Beneteau, M., and Ricci, J.E. (2010). Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci* 67, 1589-1597.

Quinn, J., Fisher, P.W., Capocasale, R.J., Achuthanandam, R., Kam, M., Bugelski, P.J., and Hrebien, L. (2007). A statistical pattern recognition approach for determining cellular viability and lineage phenotype in cultured cells and murine bone marrow. *Cytometry A* 71, 612-624.

Randolph, G.J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282, 480-483.

Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, 753-761.

Reed, J.C. (2008). Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 111, 3322-3330.

Rodrigues, M.M., Cordey, A.S., Arreaza, G., Corradin, G., Romero, P., Maryanski, J.L., Nussenzweig, R.S., and Zavala, F. (1991). CD8+ cytolytic T cell clones derived against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein protect against malaria. *Int Immunol* 3, 579-585.

Rotta, G., Edwards, E.W., Sangaletti, S., Bennett, C., Ronzoni, S., Colombo, M.P., Steinman, R.M., Randolph, G.J., and Rescigno, M. (2003). Lipopolysaccharide or whole bacteria block the conversion of inflammatory monocytes into dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 198, 1253-1263.

Ruhland, A., Leal, N., and Kima, P.E. (2007). *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cell Microbiol* 9, 84-96.

Salazar-Gonzalez, R.M., Srinivasan, A., Griffin, A., Muralimohan, G., Ertelt, J.M., Ravindran, R., Vella, A.T., and McSorley, S.J. (2007). *Salmonella* flagellin induces bystander activation of splenic dendritic cells and hinders bacterial replication in vivo. *J Immunol* 179, 6169-6175.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.

Sato, N., Ahuja, S.K., Quinones, M., KostECKI, V., Reddick, R.L., Melby, P.C., Kuziel, W.A., and Ahuja, S.S. (2000). CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania* major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *J Exp Med* 192, 205-218.

Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., and Haslett, C. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2, 965-975.

Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-1687.

Scorrano, L. (2003). Divide et impera: Ca²⁺ signals, mitochondrial fission and sensitization to apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 1287-1289.

Scott, P. (2009). Finding Leishmania: a deadly game of hide-and-seek. *Cell Host Microbe* 6, 3-4.

Schneider, P., Rosat, J.P., Bouvier, J., Louis, J., and Bordier, C. (1992). Leishmania major: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol* 75, 196-206.

Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26, 421-452.

Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., and Pamer, E.G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59-70.

Sher, A., Oswald, I.P., Hieny, S., and Gazzinelli, R.T. (1993). Toxoplasma gondii induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 150, 3982-3989.

Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.

Silke, J., Kratina, T., Chu, D., Ekert, P.G., Day, C.L., Pakusch, M., Huang, D.C., and Vaux, D.L. (2005). Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16182-16187.

Silveira, F.T., Lainson, R., Gomes, C.M., Laurenti, M.D., and Corbett, C.E. (2008). Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102, 1075-1080.

Sousa, R.A., Reis, R.L., Cunha, A.M., and Bevis, M.J. (2003). Coupling of HDPE/hydroxyapatite composites by silane-based methodologies. *J Mater Sci Mater Med* 14, 475-487.

Span, L.F., Pennings, A.H., Vierwinden, G., Boezeman, J.B., Raymakers, R.A., and de Witte, T. (2002). The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. *Cytometry* 47, 24-31.

Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 139, 380-397.

Steinman, R.M., Pack, M., and Inaba, K. (1997). Dendritic cell development and maturation. *Adv Exp Med Biol* 417, 1-6.

Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191, 411-416.

Stuart, L.M., Lucas, M., Simpson, C., Lamb, J., Savill, J., and Lacy-Hulbert, A. (2002). Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* 168, 1627-1635.

- Subauste, C.S., Koniaris, A.H., and Remington, J.S. (1991). Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J Immunol* *147*, 3955-3959.
- Tacke, F., and Randolph, G.J. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* *211*, 609-618.
- Thornberry, N.A., Rosen, A., and Nicholson, D.W. (1997). Control of apoptosis by proteases. *Adv Pharmacol* *41*, 155-177.
- Valdes-Reyes, L., Argueta, J., Moran, J., Salaiza, N., Hernandez, J., Berzunza, M., Aguirre-Garcia, M., Becker, I., and Gutierrez-Kobeh, L. (2009). *Leishmania mexicana*: inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Exp Parasitol* *121*, 199-207.
- van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C.P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* *31*, 1-9.
- von Herbay, A., and Rudi, J. (2000). Role of apoptosis in gastric epithelial turnover. *Microsc Res Tech* *48*, 303-311.
- Von Stebut, E. (2007). Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol* *17*, 115-122.
- von Stebut, E., Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D.L., and Udey, M.C. (1998). Uptake of *Leishmania* major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med* *188*, 1547-1552.
- von Stebut, E., Belkaid, Y., Nguyen, B.V., Cushing, M., Sacks, D.L., and Udey, M.C. (2000). *Leishmania* major-infected murine langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* *30*, 3498-3506.
- von Stebut, E., and Udey, M.C. (2004). Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect* *6*, 1102-1109.
- Wanderley, J.L., and Barcinski, M.A. (2010). Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. *Cell Mol Life Sci* *67*, 1653-1659.
- Watanabe, I., Toyoda, M., Okuda, J., Tenjo, T., Tanaka, K., Yamamoto, T., Kawasaki, H., Sugiyama, T., Kawarada, Y., and Tanigawa, N. (1999). Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different in situ methods: antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) methods. *Jpn J Cancer Res* *90*, 188-193.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* *292*, 727-730.
- Williams, G.T. (1994). Apoptosis in the immune system. *J Pathol* *173*, 1-4.
- Woelbing, F., Kostka, S.L., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., Waisman, A., Nigg, A.P., Knop, J., Udey, M.C., and von Stebut, E. (2006). Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med* *203*, 177-188.

Zahn, S., Wirtz, S., Birkenbach, M., Blumberg, R.S., Neurath, M.F., and von Stebut, E. (2005). Impaired Th1 responses in mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 and challenged with physiological doses of *Leishmania major*. *Eur J Immunol* *35*, 1106-1112.

Zaph, C., Uzonna, J., Beverley, S.M., and Scott, P. (2004). Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med* *10*, 1104-1110.

Zhang, X., and Kiechle, F.L. (1998). Hoechst 33342 induces apoptosis and alters tata box binding protein/DNA complexes in nuclei from BC3H-1 myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* *248*, 18-21.

Zhang, Y., Haskins, C., Lopez-Cruzan, M., Zhang, J., Centonze, V.E., and Herman, B. (2004). Detection of mitochondrial caspase activity in real time in situ in live cells. *Microsc Microanal* *10*, 442-448.