



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)

**ANÁLISIS DE GENES Y PROTEÍNAS DE CÉLULAS NK Y MONOCITOS DE
PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA LOCALIZADA Y DIFUSA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

EDITH ARACELI FERNÁNDEZ FIGUEROA

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER-FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR:

DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ-IIB

DR. ARMANDO PÉREZ TORRES-FACULTAD DE MEDICINA

DRA. CLAUDIA RANGEL ESCAREÑO-INMEGEN (EXTERNO)

MÉXICO, D. F. MARZO 2013



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.

Este trabajo se realizó en el
Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de
Medicina Experimental de la Facultad de Medicina (UNAM)
y en el
Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por hacer de un número de cuenta una profesionista.
- Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por el constante apoyo durante este Doctorado.
- Al CONACyT por la beca otorgada.
- Al PAPIIT (IN220109), al CONACyT (102155, 47256-M) y al INMEGEN por el apoyo para realizar este trabajo.
- Al personal de los bancos de sangre del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" y del Centro Médico Nacional Siglo XXI por el apoyo en la donación de "buffy coats".
- A los integrantes de mi comité tutorial: Dra. Ingeborg Becker Fauser, Dra. Gladis Fragoso González, Dr. Armando Pérez Torres y Dra. Claudia Rangel Escareño por sus comentarios y paciencia durante horas en cada tutorial y fuera de ellos.
- A los miembros del jurado que evaluaron mi trabajo: Dra. Yolanda López Vidal, Dr. Julio Granados Arreola, Dra. Claudia Rangel Escareño y Dr. Julio César Carrero Sánchez por sus aportaciones a este trabajo.
- A la Dra. Ingeborg Becker por todas las oportunidades que me ha brindado en su laboratorio, por confiar en mi para aprender tantas cosas y por tantísima paciencia, sobre todo durante los últimos meses.

-
- A la Dra. Yolanda López por todos sus consejos.
 - A Gladis Fragoso por escucharme tan pacientemente en días difíciles y por tantos consejos para mejorar este trabajo.
 - A Armando Pérez por llegar justo a tiempo y con tanto entusiasmo a ser parte de mi comité.
 - A Claudia Rangel.... infinitas gracias: por aceptar este reto, por tu amistad, dedicación, por enseñarme que todo problema tiene una solución. Pero sobre todo por la confianza que me brindaste cada día para terminar este trabajo (y por seguir).
 - A Emilio Cordova por despertar mi curiosidad por la investigación, pero sobretodo por tanto “molestar”.
 - A Iván Imaz por su apoyo en el análisis de los datos de microarreglos, por tanto estira y afloja, por su paciencia laboral.
 - A Norma Salaiza por todo el apoyo técnico... por su dedicación al hacer y al enseñarme tanto en el laboratorio, y aun más por tu amistad y cariño.
 - A Cristina Cañeda por compartir y discutir conmigo sus resultados de Doctorado (P.S. Por tantas sonrisas y pláticas... por enseñarme tanto del Viejo Mundo).
 - A Daniel Sokani por la donación de las figuras 1.2, 1.4 y 1.6 incluidas en esta tesis (P.S. Por tantas risas y sonrisas ;)).
 - A Karol Carrillo por su gran apoyo para realizar parte de este trabajo.

-
- A Haydee Miranda, Salvador Hernández, Julio Canseco, Lyssia Castellanos, Valeria Quintanar, José Luis Cruz, Raúl Mojica y Dan Gutiérrez del INMEGEN por su disposición para enseñarme algo cuando tenía que trabajar en los laboratorios, pero más agradezco las sonrisas al ayudarme.
 - A Gabriela Mercado, Juan Pablo Reyes, Mauricio Rodríguez y Juan Carlos Fernández por sus comentarios a mi trabajo a lo largo de mi estancia en sus laboratorios.

DEDICADA A:

Mi mamá

Por tu ejemplo de lucha constante

TE QUERO!

A Zai, Viv y Bry.

“Nada te turbe, nada te espante, todo se pasa, Dios no se muda, la paciencia todo lo alcanza”

GRACIAS

- Karla y Fabi por ser mi dosis tan perfecta de amor...

”Este es el secreto más profundo que nadie conoce (esta es la raíz de la raíz y el brote del brote y el cielo del cielo de un árbol llamado vida)y esta es la maravilla que mantiene las estrellas separadas, llevo SU corazón conmigo (lo llevo en mi corazón)”. E. E. C.

- Cuca y Tere por abrirme siempre su corazón y por ese amor tan grande a mi pequeña familia.
- Lulú por compartir a tus dos pedacitos de felicidad conmigo.
- Brenda por estos años de tanta cercanía, por las risas cuando parecía que las olvidaba, por ser tan ”tu” siempre.
- Pilar por permanecer en mi vida, por tanta aventura..... ”Mamma ho fame, è finito il pane e dentro il frigo cosa c’è”.

A las dos por recordarme siempre que los tiempos de Dios son perfectos.

- Mariana A. Z. por ese regreso...el espacio solo fue tiempo. Por entender que tengo ”la boca muy grande y la diplomacia muy muerta” y por tu intento para sobrevivirla.
”Nuestra amistad no depende de cosas como el espacio y el tiempo”. M. V. LI.
- Lucillita Jr. por crecer a mi lado compartiendo este constante reto: ser hermanas.
- Mariana Ch. por compartir los claroscuros durante este Doctorado y por seguir aun a la distancia.

-
- Claudia Nyo por tu amistad y por tu apoyo en esas cosas de diseño que tanto ignoro.
 - Jesús por la cargada mutua y por el apoyo en tan difíciles meses.
 - MariElena por tu preocupación constante, por adoptarme, por enseñarme tanto.
 - Consuelito por tus platicas, tus risas y por tanto cariño.

A las dos por compartir su tiempo y corazón conmigo.

- Roy por tus abrazos tan cálidos, tus pláticas y por salir (sin victoria) tanto en mi defensa.
- Pedro por tu compañía, pláticas, viajes y por despertar mi tan dormida paciencia.
- Rafa, tengo una lista interminable de razones para quererte.... pero la principal es tu tan peculiar forma de hacerme reír y hacer que olvide momentos difíciles.
- Arturo por permitirnos re-conocernos, valió mucho la pena, gracias por compartir tantos cafecitos "pecadores".

A los cuatro por tantas risas, abrazos, salidas, enojos, bufadas y por hacerme parte de su tan especial historia. Por "diversas" razones ¡los quiero!.

- Haydee M. por tu amistad, por compartir conmigo ese divertido humor negro que tanto me hace reír y me reconforta saber que no soy la única "así" en el mundo, o no tu?!
- Vale Q. por tu amistad y por demostrarme que tanta paciencia. . . .si existe.
- Rocely C. por tu amistad y tantas porras en mi "baja calórica".



- Margarita, Raquel y Diego por tantas platicas, abrazos, risas y complicidades que me han hecho disfrutar mucho más mi estancia en el DME.
- Maribell y Karla por hacerme tan amenos los días en proteómica con tantas risas, abrazos, cariñoS y ayuda, pero sobretodo gracias por ser parte de mi camino.

Índice general

1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. Leishmaniasis	24
1.1.1. Distribución de la leishmaniasis	26
1.1.2. Formas clínicas y agentes causales de la leishmaniasis	32
1.2. Superficie celular del parásito	35
1.2.1. Lipofosfoglicano (LPG)	35
1.3. Respuesta Inmune	38
1.3.1. Respuesta Inmune Innata (RII)	38
1.3.2. Monocitos/Macrófagos	39
1.3.3. Células NK (Natural Killer)	41
1.4. Receptores de la Respuesta Inmune Innata	44
1.4.1. Receptores Tipo Toll (TLRs)	44
1.5. Vía de señalización de JAK/STAT	50
1.6. Inflamación	53
1.6.1. Inflamasoma	54
1.6.2. Respuesta inmune e inflamación durante la infección por <i>Leishmania spp.</i>	55
1.7. Bases genéticas de susceptibilidad a enfermedades	57
1.7.1. Polimorfismos genéticos	57
1.8. Proteómica	62
2. JUSTIFICACIÓN	63



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	66
3.1. Hipótesis	67
3.2. Objetivo General	67
3.2.1. Objetivos Particulares	67
4. MATERIALES Y MÉTODOS	68
4.1. Consideraciones éticas	69
4.1.1. Pacientes y controles	69
4.2. Purificación del Lipofosfoglicano (LPG) de <i>Leishmania mexicana</i>	70
4.3. Células: origen, cultivo e interacción.	71
4.3.1. Separación de células mononucleares a partir de sangre periférica humana	71
4.3.2. Purificación de monocitos	71
4.3.3. Purificación de células NK	72
4.3.4. Ensayos de interacción	72
4.3.5. Obtención de suero a partir de sangre periférica humana	73
4.4. Biología Molecular	74
4.4.1. Extracción de DNA genómico (TRÍzol)	74
4.4.2. Extracción de DNA genómico por adsorción a membrana en columna	75
4.4.3. Purificación de RNA total (TRÍzol)	75
4.4.4. Procesamiento de muestras para el microarreglo Human Gene 1.0 ST de Affymetrix	76
4.4.5. Reprecipitación de RNA	77
4.4.6. PCR en tiempo real	78
4.5. Genotipificación	79
4.6. Proteómica	80
4.6.1. Precipitación de proteínas séricas con TCA 77%/acetona	80
4.6.2. Cuantificación de proteínas por el método DC de BIORAD compatible con detergentes	80
4.6.3. Western-blot (Wb)	81
4.6.4. Cuantificación de proteínas séricas utilizando el 2-D Quant Kit	82
4.6.5. Geles bidimensionales (2D)	83
4.6.6. Adquisición de imágenes y análisis de datos para geles 2D	84



4.6.7.	Digestión de proteínas a partir de geles 2D	84
4.6.8.	Identificación de proteínas por espectrometría de masas	85
4.7.	ELISA	86
4.8.	Inmunocitoquímica (ICQ) e Inmunohistoquímica (IHQ)	87
4.8.1.	Biopsias	87
4.8.2.	Inmunocitoquímica en células mononucleares	87
4.8.3.	Inmunohistoquímica en tejidos congelados	88
4.8.4.	Inmunohistoquímica en tejidos parafinados	90
4.9.	Análisis estadístico	91
4.9.1.	Análisis de los SNPs	91
4.9.2.	Análisis de inmunohistoquímica, Western-blot y ELISA	91
4.9.3.	Análisis de los datos de microarreglos	91
5.	RESULTADOS	93
5.1.	Análisis de SNPs	94
5.1.1.	Tablas de Contingencia	95
5.1.2.	Estadísticos para IL-1 β -511 (C/T)	98
5.2.	Análisis de IL-1 β	100
5.2.1.	IL-1 β en suero	100
5.2.2.	Producción de IL-1 β por monocitos	103
5.3.	Expresión de IL-1 β y número de parásitos en lesiones de pacientes	105
5.3.1.	Inmunocitoquímica para IL-1 β	105
5.3.2.	Inmunohistoquímica para IL-1 β y <i>Leishmania mexicana</i> en lesiones de pacientes	106
5.4.	Genómica: Microarreglos de expresión	111
5.4.1.	Integridad de las muestras de RNA	111
5.4.2.	Análisis de microarreglos	112
5.4.3.	Validación por PCR en tiempo real	149
5.5.	Proteómica	152
5.5.1.	Geles 2D	152
5.5.2.	Identificación de proteínas	154



6. DISCUSIÓN	158
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	166
7.1. Conclusiones	167
7.2. Perspectivas del trabajo	168
8. Artículo publicado	188
9. Preparación de soluciones	198
9.1. PBS 1X (Amortiguador salino de fosfatos)	199
9.2. Solución Lítica	199
9.3. Citrato de Sodio 0.1 M en etanol al 10%	199
9.4. Ácido tricloroacético 77%-acetona	199
9.5. Amoriguador de lisis celular RIPA	200
9.6. Amortiguador de rehidratación	202
9.7. BSA a 5 y a 1 mg/mL	203
9.8. Reactivos para Western-blot	203
9.8.1. Geles 1D	204
9.8.2. Amortiguador Laemmli 2X	204
9.8.3. Amortiguador de corrida 1X	205
9.8.4. TBST 10X	205
9.8.5. Amortiguador de transferencia semi-seco 1X	205
9.8.6. Leche y/o BSA al 5%	205
9.9. Soluciones para geles 2D	206
9.9.1. Azul de bromofenol 1%	206
9.9.2. Amortiguador de equilibrio (reductor)	206
9.9.3. Amortiguador de equilibrio (alquilante)	206
9.9.4. Azul de Coomassie	207
9.9.5. Solución desteñidora	207
9.10. Soluciones para digestión de proteínas	207
9.11. Solución de extracción de péptidos	208



9.12. Amortiguador de lavado para placas de ELISA 209



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AEC	Aminoetilcarbazol
BSA	Albúmina sérica bovina
CH	Cámara húmeda
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTT	Ditiotritol
ECD	Ectodominios
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico
HCl	ácido clorhídrico
HWE	Hardy Weinberg equilibrium
hr	Horas
IDV	Integrity density value
IFN- γ	Interferon gamma
IHC	Inmunohistoquímica
IL-	Interleucina-
ISRE	Interferon Stimulated Response Element



JAK	Janus Kinase
kVh	Kilo volts por hora
LC	Leishmaniasis Cutánea
LCD	Leishmaniasis Cutánea Difusa
LCL	Leishmaniasis Cutánea Localizada
LMC	Leishmaniasis Mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniasis Visceral
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
μm	Micrómetros
μL	Microlitros
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
Na_3VO_4	Ortovanadato de Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaF	Fluoruro de Sodio
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NH_4HCO_3	Bicarbonato de Amonio
NK	Natural Killer
NP-40	Nonident P-40
OCT	Optimum Cutting Temperature



OR	Odds Ratio
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	Polimorfismos Genéticos
pH	Potencial de Hidrógeno
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PRR	Pattern Recognition Receptors
PSA	Persulfato de amonio
RII	Respuesta Inmune Innata
RIN	RNA Integrity
RMA	Robust Multiarray Average
RNA	ácido ribonucleico
RT	Retrotranscripción
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
seg	Segundos
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TA	Temperatura ambiente
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
TFA	ácido trifluoroacético



TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alfa
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V	Volts
xg	Fuerza centrifuga
°C	Grados centígrados



ABSTRACT

Leishmania mexicana can cause both localized (LCL) and diffuse (DCL) cutaneous leishmaniasis, yet little is known about factors regulating disease severity in these patients. We analyzed if the disease was associated with single nucleotide polymorphisms (SNPs) in CD14 260, IL-10 (-819, -592, -1082), IL-1Ra 2018, IL-6 -174, IL-8 -251, IL-1 β -511, IRAK-1 532 and TNF- α (-308, -238) in 58 Mexican mestizo patients with LCL, 6 with DCL and 123 control cases. Additionally, we analyzed the in vitro production of IL-1 β by monocytes, the expression of this cytokine in sera of these patients, as well as the tissue distribution of IL-1 β and the number of parasites in lesions of LCL and DCL patients. Our results show a significant difference in the distribution of IL-1 β (-511 C/T) genotypes between patients and controls (heterozygous OR), with respect to the reference group CC, which was estimated with a value of 3.23, 95 % CI = (1.2, 8.7) and p-value = 0.0167), indicating that IL-1 β (-511 C/T) represents a variable influencing the risk to develop the disease in patients infected with *Leishmania mexicana*. Additionally an increased in vitro production of IL-1 β by monocytes and an increased serum expression of the cytokine correlated with the severity of the disease, since it was significantly higher in DCL patients, heavily infected with *Leishmania mexicana*. The distribution of IL-1 β in lesions also varied according to the number of parasites harbored in the tissues: in heavily infected LCL patients and in all DCL patients, the cytokine was scattered diffusely throughout the lesion. In contrast, in LCL patients with lower numbers of parasites in the lesions, IL-1 β was confined to the cells. These data suggest that IL-1 β possibly is a key player determining the severity of the disease in DCL patients. The analysis of polymorphisms in the other SNPs showed no differences between patients with different disease severities or between



patients and controls.

Another important goal was to answer if other factors existed that regulate disease severity in these patients. To answer this we analyzed the pattern of gene expression in NK cells using microarrays. We compared the gene expression between patients with DCL, LCL and healthy controls. We observed that 90% of the genes in NK cells of DCL patients were inhibited, whereas in LCL patients only 50% of the genes were inhibited when we comparing to the gene pattern of healthy controls. Previous studies in our group have shown that TLR-2 in human NK cells recognizes *Leishmania major* LPG leading to translocation of transcription factor NF- κ B and to IFN- γ and TNF- α protein production in healthy controls. Our present results show that genes of two important signaling pathways of the innate immune response (TLR and JAK/STAT) are down-regulated in patients with DCL, whereas in patients with LCL many of these genes are up-regulated, which suggests that DCL patients cannot respond with an effective immune answer to *Leishmania mexicana* infections.



RESUMEN

Leishmania mexicana es una especie de parásito protozoario que causa leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y difusa (LCD) y aún hay muchas dudas sobre los factores que regulan la gravedad de la enfermedad en estos pacientes. En el presente trabajo se analizó si esta enfermedad estaba asociada con algún o algunos SNPs en CD14 260, IL-10 (-819, -592, -1082), IL-1Ra 2018, IL-6 -174, IL-8 -251, IL-1 β -511, IRAK-1 532 y TNF- α (-308, -238) en 58 pacientes mestizos mexicanos con LCL, 6 con LCD y 123 sujetos sanos. Además, se analizó la producción *in vitro* de IL-1 β por monocitos, la expresión de esta citocina en el suero de estos pacientes, así como la distribución de IL-1 β y el número de parásitos en las lesiones de ambos grupos de pacientes. Nuestros resultados mostraron una diferencia significativa en la distribución de la IL-1 β (-511 C/T) entre los genotipos de pacientes y controles (OR de los heterocigotos) cuando se utilizan los homocigotos para CC como grupo de referencia en cuyo caso el OR tuvo un valor de 3,23, IC 95% = (1,2, 8,7) y valor de $p= 0,0167$, lo que indica que la IL-1 β (-511 C/T) representa una variable que influye en el riesgo de desarrollar la enfermedad en pacientes infectados con *Leishmania mexicana*. Además, encontramos un aumento en la producción *in vitro* de IL-1 β por los monocitos y un aumento de la expresión de esta citocina en suero, lo que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad, ya que esta diferencia fue estadísticamente significativa en los pacientes con LCD infectados con abundantes parásitos de *Leishmania mexicana*. La distribución de IL-1 β en las lesiones también varió de acuerdo con el número de parásitos contenidos en las lesiones. En pacientes con LCL gravemente infectados y en todos los pacientes con LCD, se encontró la citocina difusamente distribuida en toda la lesión. Por el contrario, en pacientes con LCL, con un menor número de parásitos en las lesiones, la IL-1 β se localizó dentro de las células. Estos datos sugieren que la IL-1 β posiblemente juega un papel



clave en determinar la gravedad de la enfermedad en pacientes con LCD. El análisis en el resto de los SNPs no mostró diferencias significativas.

Otro objetivo importante de este trabajo fue analizar si existían otros factores que regulan la gravedad de la enfermedad en estos pacientes. Analizamos el perfil de expresión de genes en células NK utilizando microarreglos de expresión. Se comparó la expresión de genes entre los pacientes con LCD, con LCL y controles sanos. Observamos que los pacientes con LCD tenían cerca del 90% de los genes inhibidos mientras que los pacientes con LCL tenían solo el 50% inhibidos cuando se compararon ambos grupos con el patrón de genes de los controles sanos. Nuestro grupo previamente reportó que el receptor TLR-2 de células NK humanas reconoce al LPG de *Leishmania major* con translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo y producción de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ y TNF- α en sujetos sanos. En el presente trabajo reportamos que genes de dos importantes vías de señalización para la activación de la respuesta inmune innata (TLR y JAK/STAT) se encontraron inhibidos en los pacientes con LCD, mientras que en pacientes con LCL se encontraron sobreexpresados. Esto nos permite sugerir que los pacientes con LCD no generan una buena activación de la respuesta inmune innata, importante desde el inicio de la infección por *Leishmania mexicana*.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN



1.1. Leishmaniasis

La leishmaniasis es una de las enfermedades infecciosas más importantes alrededor del mundo que incluye a un grupo de enfermedades que cursan como úlceras cutáneas o como graves afecciones viscerales. La leishmaniasis es transmitida por vector y causada por el protozoo parásito intracelular obligado del género *Leishmania* que afecta tanto a los seres humanos como a otras especies de mamíferos como roedores y perros. El vector que transmite la enfermedad al hospedero vertebrado es la hembra hematófaga de un mosquito del género *Lutzomyia* (Nuevo Mundo) o *Phlebotomus* (Viejo Mundo), que inocula al parásito en la dermis de la piel mediante su piquete al momento de alimentarse. Los promastigotes inoculados son rápidamente fagocitados por células del sistema fagocítico mononuclear y dentro de estas, los parásitos se transforman en parásitos intracelulares obligados, los amastigotes. Estos amastigotes se dividen y se multiplican dentro de la célula hasta que se liberan en el tejido para infectar nuevas células. El ciclo de vida se completa cuando la mosquita hembra se alimenta con sangre del hospedero infectado llevándose células infectadas con amastigotes [1, 2, 3, 4, 5, 6] (Figura 1.1).

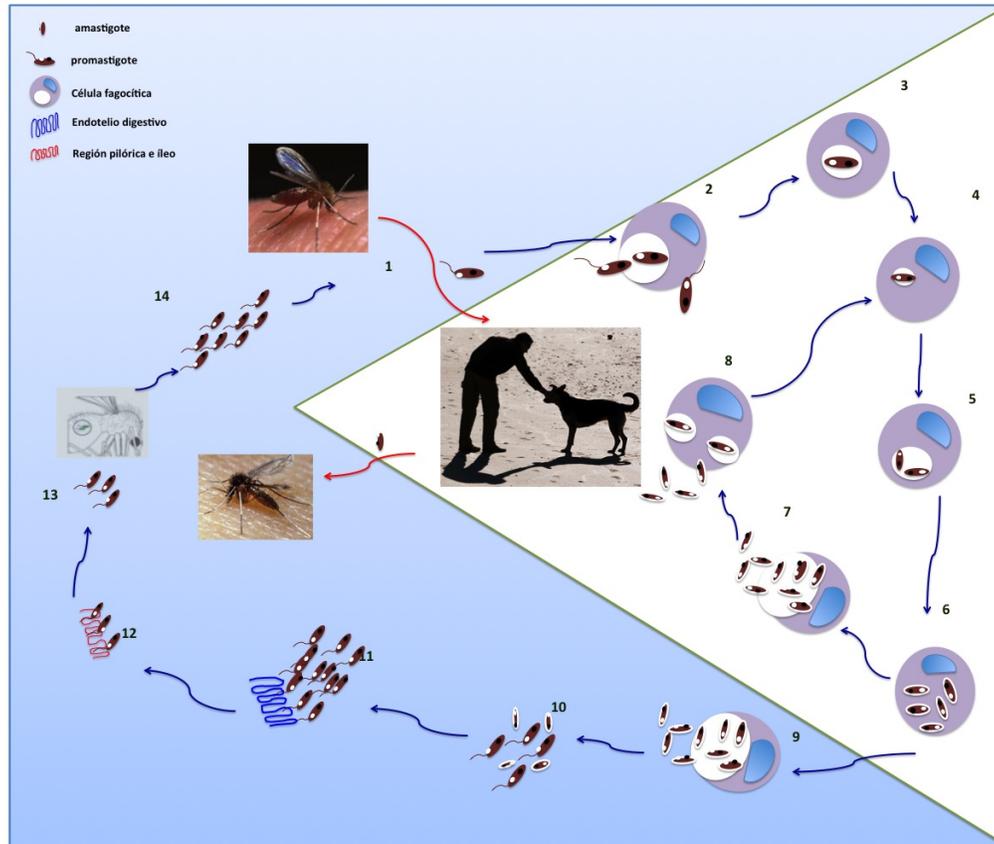


Figura 1.1: **Ciclo de vida de *Leishmania* spp. en los hospederos vertebrado e invertebrado.**

1) Los promastigotes son inoculados con la picadura del flebotomo. 2) Células del sistema fagocítico mononuclear reconocen y fagocitan al parásito. 3) Fusión del fagosoma con el lisosoma. 4) Diferenciación del promastigote en amastigote. 5) Multiplicación de amastigote dentro de la vacuola parasitófora. 6) Multiplicación intravacuolar de amastigotes. 7) Ruptura de la célula fagocítica y liberación de amastigotes. 8) Fagocitosis de amastigotes. 9) Ingestión de una célula parasitada por flebotomo al ingurgitar sangre, ruptura de la célula y liberación de amastigotes en el tracto digestivo del flebotomo. 10) Multiplicación de amastigotes y diferenciación a promastigotes. 11) Multiplicación de los promastigotes e inserción de flagelos entre los microvilli del endotelio digestivo. 12) Multiplicación en la región pilórica e íleo. 13) Migración de promastigotes al tracto digestivo. 14) Promastigotes infectivos libres en la probóscide. Tomado y modificado de [6].



1.1.1. Distribución de la leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad endémica que afecta a la población de países tropicales y de la cuenca del Mediterráneo, particularmente afecta a 88 países del sur de Europa, Centro y Sur de América, África, Medio Oriente y la India. La Organización Mundial de la Salud considera a la leishmaniasis una enfermedad importante en el trópico con más de 350 millones de hombres, mujeres y niños en riesgo de contraer la enfermedad. Se calcula que 12 millones de individuos están infectados con el parásito, de los cuales solo se notifican 1.5 millones [1, 5, 6] (Figura 1.2).

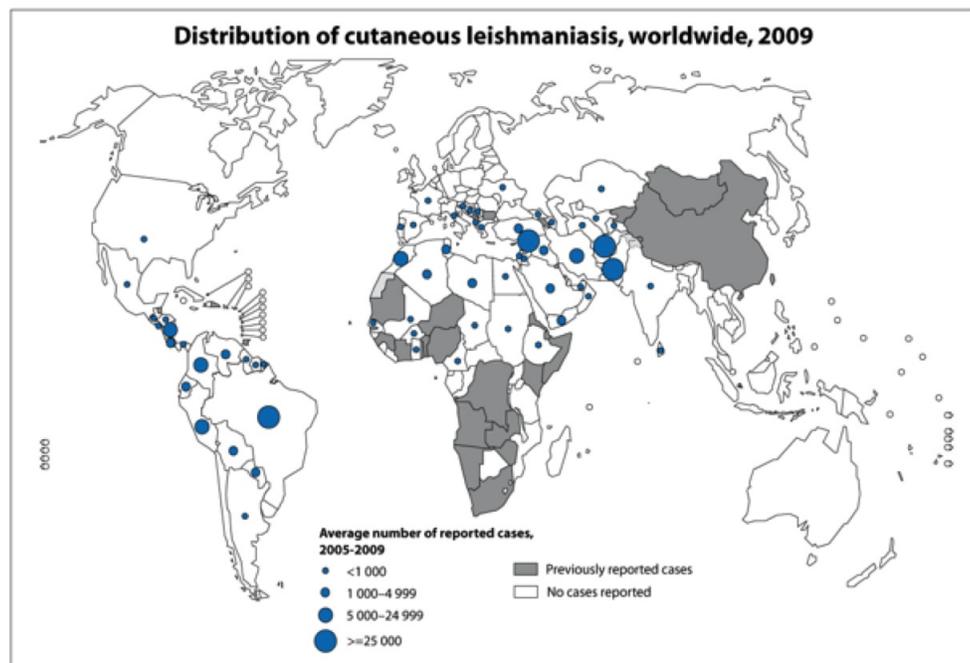


Figura 1.2: **Distribución Mundial de Leishmaniasis Cutánea Localizada.**



El interés en el estudio de esta enfermedad se incrementó por el aumento de su incidencia a nivel mundial, en parte atribuido a las guerras, refugiados, las movilizaciones humanas a zonas endémicas y a la falta en el control en algunas partes del mundo [7, 8].

En México, la leishmaniasis en sus diversas formas clínicas (descritas más adelante) se conoce desde la época prehispánica. La leishmaniasis cutánea fue descrita en la península de Yucatán por Seidelin en 1912, quien la nombró "úlceras de los chicleros" y él mismo identificó al parásito en una impronta. El primer estudio epidemiológico sobre esta enfermedad lo realizaron Beltrán y Bustamante en 1942 y Biagi aisló y cultivó al parásito nombrándolo *Leishmania tropica mexicana*. Garnham la clasificó serológicamente como *Leishmania mexicana*. Sin embargo, Lainson y Shaw la reclasificaron como *Leishmania mexicana mexicana* [9, 10].

En México, el número de casos reportados de LC en el periodo de 2003 a 2010 es variable (entre 400-950), dependiente del lugar. Los casos están distribuidos en 20 estados del país (Figura 1.3) aunque la mayoría de los pacientes se encuentra en Nayarit, Veracruz y en el sureste del país, principalmente en Campeche, Chiapas, Quintana Roo y Tabasco [9, 11] (Figura 1.4).

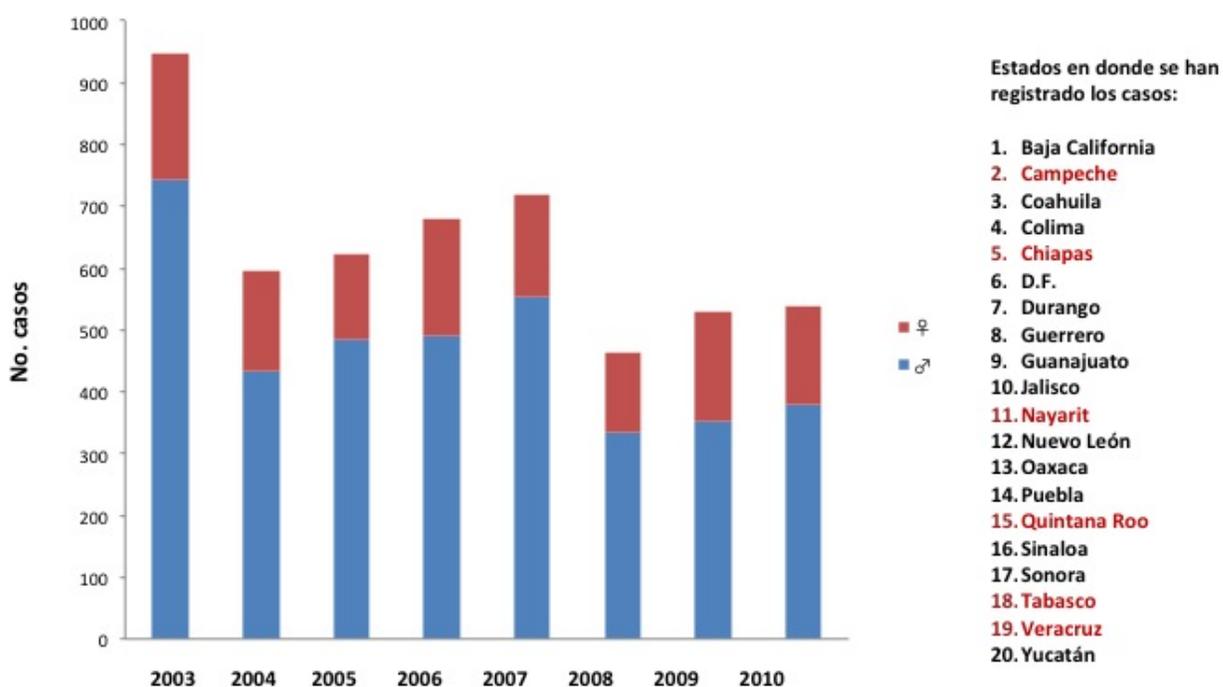


Figura 1.3: **Número de casos de leishmaniasis cutánea registrados por género en México (2003-2010).** Los estados escritos en color rojo son los que reportan el mayor número de casos. Fuente: Secretaría de Salud, 2010. Programa de Leishmaniasis en México.



Figura 1.4: Distribución de casos de Leishmaniasis Cutánea en la República Mexicana. Los puntos rojos indican los lugares donde se han reportado casos de LC. Fuente: Secretaría de Salud, 2010. Programa de Leishmaniasis en México. Mapa realizado por Sánchez Montes Daniel (2012).



Los casos con LCD son muy escasos y entre 1981 y 2007 se reportaron en los estados de Guerrero, Michoacán, Tabasco, Quintana Roo, Veracruz y Coahuila (Figura 1.5).

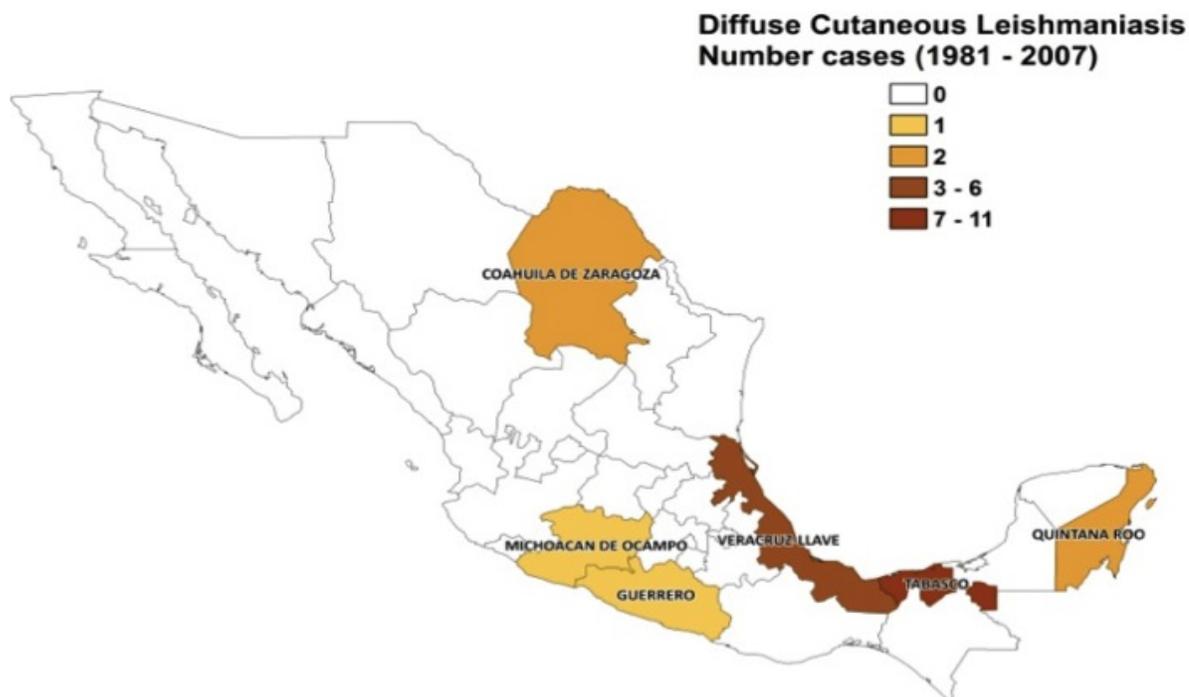


Figura 1.5: **Distribución de Leishmaniasis Cutánea Difusa en México.** Fuente: Secretaría de Salud, 2010. Programa de Leishmaniasis en México. Tomado de [12]

En la Figura 1.6 se observa el número de casos (barras) y la tasa de incidencia (línea roja) desde 1995 y hasta el año 2011 de los pacientes reportados con leishmaniasis cutánea. El estado de Tabasco es el que presenta el mayor número de casos (7 231 con LCL y 11 con LCD del año 1981 al 2010) y adicionalmente en este Estado existen informes sobre leishmaniasis desde la primera mitad del siglo pasado [9, 11].

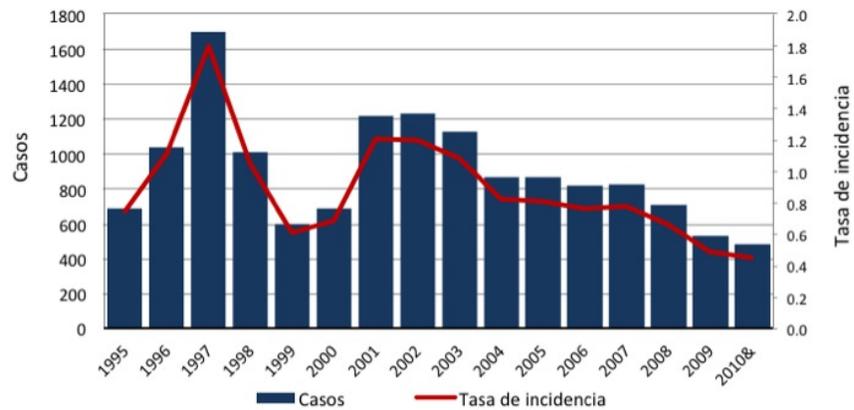


Figura 1.6: Número de casos (barras) y tasa de incidencia (línea roja) de Leishmaniasis Cutánea en México. Fuente: SINAVE/DGAE/CENAVECE/Secretaría de Salud. Información preliminar al corte de la semana epidemiológica no.: 52 del 2010. *Tasa por 100 mil habitantes. Fuente: Secretaría de Salud, 2010. Programa de Leishmaniasis en México.

Un total de 30 casos de LMC se han reportado en los estados de Tabasco, Chiapas, Campeche, Veracruz y Oaxaca. Adicionalmente, entre 1981 y 2010 se reportaron 127 casos de LV, siendo Chiapas el Estado que presenta el mayor número (121 casos) y el resto se encontraron en Oaxaca, Guerrero, Morelos, Puebla y el Estado de México [9, 11].



1.1.2. Formas clínicas y agentes causales de la leishmaniasis

Existen cuatro formas clínicas de leishmaniasis (Figura 1.7): **A)** leishmaniasis cutánea localizada (LCL), que afecta solamente la piel en el sitio del piquete; **B)** leishmaniasis cutánea difusa (LCD), que se disemina a lo largo de todo el tegumento; **C)** leishmaniasis mucocutánea (LMC), que afecta la piel y las mucosas y **D)** leishmaniasis visceral (LV), que afecta bazo, hígado y médula ósea.

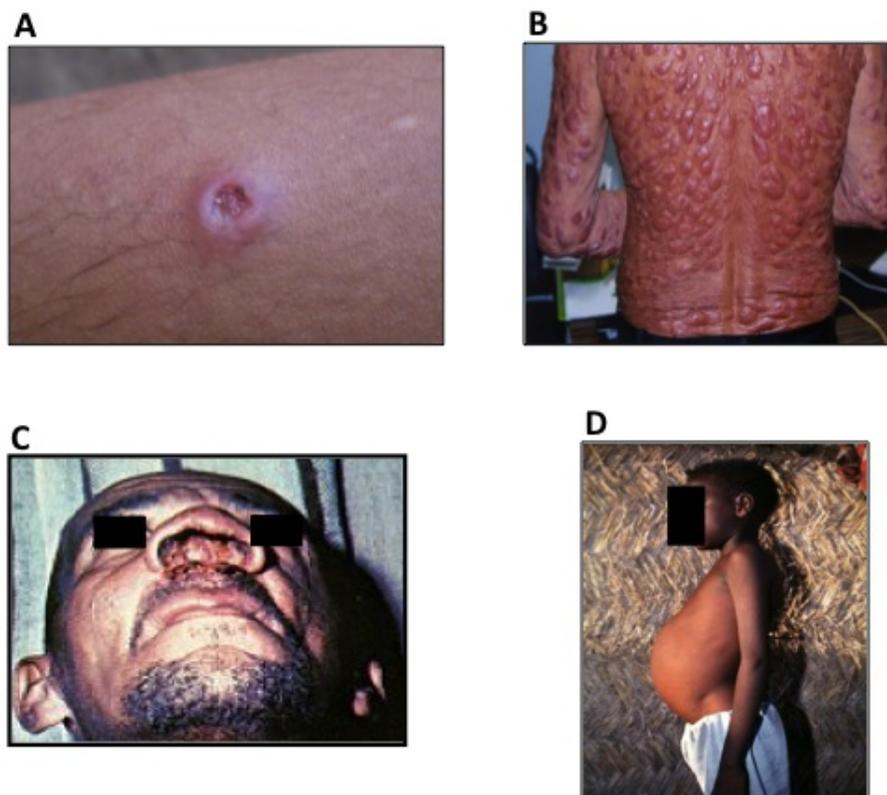


Figura 1.7: Diferentes formas clínicas de leishmaniasis. A. Úlcera característica de LCL. B. Nódulos diseminados en todo el tegumento característicos de la LCD. C. Lesión nasal presente en la LMC. D. Hepatoesplenomegalia por LV.



En el Viejo Mundo, donde prevalece la leishmaniasis cutánea (LC), los agentes causales son *L. tropica* (Asia y Europa Oriental), *L. aethiopica* (África) y *L. major*. En América, la leishmaniasis es una enfermedad mucho más compleja producida por varias especies: *L. mexicana*, reportada en México y América Central; *L. amazonensis*, que se localiza principalmente en la selva del Amazonas y está estrechamente relacionada con los casos de LCD; *L. chagasi* es el agente etiológico de la leishmaniasis visceral también conocida como kala-azar [7, 8, 13].

El tiempo de incubación de la leishmaniasis hasta la primera manifestación clínica varía de 2 meses (úlceras de leishmaniasis cutánea) hasta más de 2 años (en el caso de las lesiones mucocutáneas). En el Nuevo Mundo, la LC presenta un amplio espectro clínico y la lesión típica es una úlcera redonda con un borde muy infiltrado que se produce en el sitio de la picadura (Figura 1.7 A). Sin embargo, también se presentan lesiones atípicas en pacientes inmunocomprometidos, como nódulos sin úlceras. En México y América Central, las úlceras típicamente involucran el pabellón de las orejas (úlceras del chichero) mientras que en Brasil, los miembros inferiores son más comúnmente afectados (úlceras Bauru) [5, 7].

La LCD se caracteriza por una distribución difusa de nódulos y lesiones que afectan a la cara y las extremidades (Figura 1.7 B). El rostro muestra una infiltración masiva similar a las lesiones de la lepra lepromatosa, con nódulos sin tendencia hacia la ulceración y en algunos casos se registran lesiones verrucosas. Esta forma clínica generalmente sigue un curso prolongado, no visceraliza y la IDR (Intradermo-reacción) de Montenegro es negativa. La histopatología y las improntas de la lesión muestran numerosos amastigotes y la respuesta al tratamiento suele ser deficiente. Una forma intermedia entre LCL y LCD es conocida como BDCL (borderline disseminated cutaneous leishmaniasis), y generalmente es causada por *L. amazonensis*. Después de 2 años de la aparición de la lesión primaria de



la piel, se presenta un infiltrado en forma de placa eritematosa que generalmente se desarrolla en el rostro y en extremidades superiores e inferiores. En esta forma clínica no hay diseminación linfática de la infección y la prueba de hipersensibilidad cutánea suele ser negativa [5, 7, 13].

La LV o kala-azar se caracteriza por la propagación del parásito a la médula ósea, el bazo y el hígado. Tiene un período de incubación de 1 a 36 meses y se asocia con fiebre, anorexia, diarrea, palidez, dolor abdominal, tos, y linfadenopatía, los cuales se presentan repentinamente, o bien, progresan lentamente. Otros signos son hepatoesplenomegalia y hemorragia oral, nasal e intestinal [7].



1.2. Superficie celular del parásito

Leishmania, al ser un organismo que vive dentro de células fagocíticas, necesita un mecanismo especializado para penetrar a su célula blanco [14]. Los promastigotes de *Leishmania* están cubiertos por un glucocalix denso, compuesto por varias moléculas ancladas por glucosilfosfatidilinositol (GPI) como: proteofosfoglicanos (PPG), glucoinositolfosfoglicanos (GIPLS), fosfatasas ácidas de secreción, lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína 63 (gp63). La gp63 es una metaloproteasa dependiente de zinc, que entre otras funciones protege al parásito de la degradación por enzimas lisosomales a través de la conversión proteolítica de C3b a C3bi en la superficie del parásito. El LPG y la gp63 son reconocidos como el enlace entre los promastigotes y la célula hospedera, además de participar en la inhibición de los procesos proteolíticos del macrófago [15, 16].

1.2.1. Lipofosfoglicano (LPG)

El LPG es la molécula más abundante en la superficie de los promastigotes de *Leishmania*, es sintetizada por todas las especies del parásito (Figura 1.8) y está compuesta por 4 regiones principales: **I**) región de anclaje de GPI, un lípido 1-O-alkil-2-liso-fosfatidilinositol; **II**) región central de fosfosacáridos constituida por gluco heptasacáridos fosforilados; **III**) región de disacáridos fosforilados, que es un gran dominio de fosfoglicanos con 15-30 unidades repetitivas de Gal-Man-P (dependiendo de la especie hay sustituciones de estos azúcares); **IV**) casquete terminal de oligosacáridos esta constituido por galactosa o manosa [14, 15, 17].

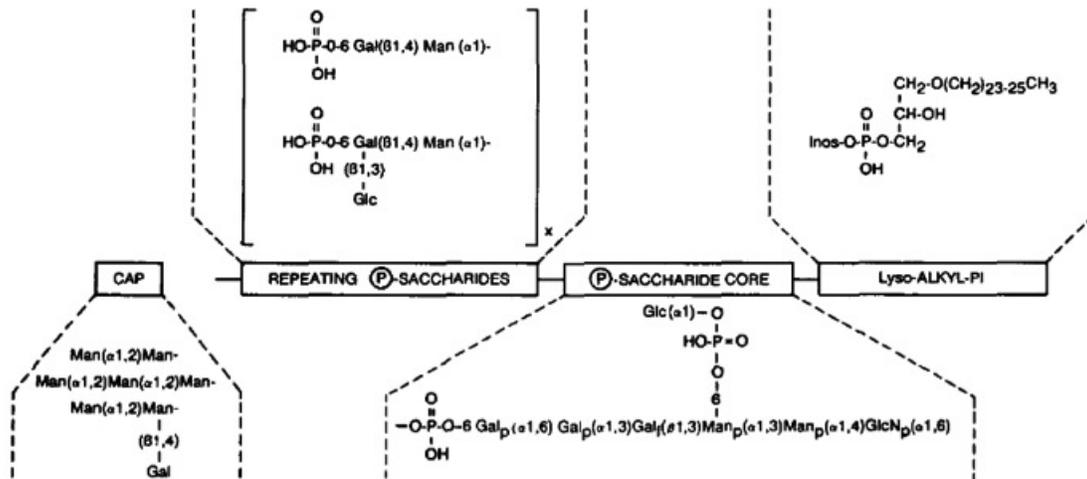


Figura 1.8: Estructura esquematizada del LPG de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Tomado de [17].

El LPG es un importante factor de virulencia durante el ciclo de infección de *Leishmania* en mamíferos. Ha sido relacionado con la supervivencia del parásito dentro del vector y con la regulación de la adhesión e invasión celular dentro de la célula hospedera. LPG participa en la resistencia al complemento, evadiendo el complejo de ataque a membrana C5b-C9.

Adicionalmente, protege al parásito contra productos tóxicos del macrófago debido a la elongación del LPG en la superficie del parásito. Parásitos de *L. major* deficientes de LPG son incapaces de establecer una infección en ratones y en macrófagos [14]. También se ha reportado que el LPG es capaz de inhibir el estallido oxidativo en un 70% a través de la inhibición de la actividad de la proteína cinasa C (PKC) y de la translocación de ésta a la membrana celular. Por otro lado, el LPG es capaz de inhibir la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), provocando la disminución de la síntesis de óxido nítrico (NO) [18]. El papel del LPG en la evasión de la respuesta inmune puede ser complementado por la gp63.



Durante los estadios iniciales de infección del macrófago, el LPG de *Leishmania donovani* inhibe la fusión de los lisosomas con los fagosomas promoviendo la sobrevivencia intracelular de los promastigotes, mientras que la gp63 inhibe enzimas líticas en los fagolisosomas [19]. Por último, el LPG también inhibe la quimiotaxis de monocitos y leucocitos polimorfonucleares, además de alterar la expresión de moléculas de adhesión en las células de Langerhans y disminuir su actividad migratoria [20, 21, 22].



1.3. Respuesta Inmune

Las diferentes funciones de la respuesta inmune están dadas por la respuesta inmune innata y la adquirida, las cuales se diferencian por la especificidad, diversidad y memoria [21].

Los vertebrados han desarrollado dos mecanismos de protección contra las infecciones: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa, las cuales forman un sistema integrado de defensa en el que existe una cooperación funcional de numerosas células y moléculas. La inmunidad innata no proporciona sólo una primera defensa contra los microorganismos, sino también desempeña diversas funciones importantes en la inducción de la respuesta inmune adaptativa. Fenómenos de la respuesta inmune innata como la inflamación, proporcionan una señal de alarma que dispara respuestas inmunitarias adaptativas. Así mismo, la activación del complemento representa un mecanismo de la inmunidad innata en la cual participa la respuesta inmune adaptativa mediante la activación de la vía clásica por anticuerpos específicos. Para la eliminación eficaz de un microorganismo es indispensable la participación del sistema inmune innato y en etapas tardías, por el sistema inmune adaptativo, que intensifica la respuesta mediante la producción de anticuerpos específicos. Adicionalmente, linfocitos T protegen mediante su secreción de citocinas que incrementa la capacidad efectora de las células del sistema inmune innato [21, 23].

1.3.1. Respuesta Inmune Innata (RII)

La respuesta inmune innata (inmunidad natural) es la primer línea de defensa contra microorganismos patógenos, que actúa de manera rápida pues, es activada en minutos. El reconocimiento de los patógenos por parte de la RII se caracteriza por tener diversidad limitada, no tener memoria y tener una respuesta muy parecida frente a diferentes de agentes infecciosos. Sin embargo, la RII tiene una alta capacidad discriminatoria entre lo propio y



lo extraño, como son los microorganismos patógenos [23]. Los elementos esenciales de la inmunidad innata consisten en mecanismos de defensa como las barreras físicas y químicas, tales como los epitelios y sustancias antimicrobianas, el sistema del complemento, etc. [26]

Las células que participan en la RII son las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos, macrófagos), células dendríticas, leucocitos polimorfonucleares y las células NK (Natural Killer). Todas estas células reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; Pathogen Associated Molecular Patterns) a través de receptores celulares denominados receptores de reconocimiento patrón (PRR, Pattern Recognition Receptors). La fagocitosis y la muerte de los microorganismos, son mecanismos efectores inespecíficos de la inmunidad natural del hospedero, y estos no inducen una memoria inmunológica [23, 24, 26].

1.3.2. Monocitos/Macrófagos

Los macrófagos forman parte del sistema fagocítico mononuclear que, junto con los neutrófilos y las células dendríticas, constituyen el principal mecanismo contra agentes extraños como los microorganismos [25].

Los macrófagos y el resto de las células del sistema inmune tienen como origen común la médula ósea. Los monocitos se diferencian en respuesta a factores como el M-CSF [27]. De la médula ósea, el monocito pasa a los tejidos a través del torrente circulatorio, utilizando moléculas de adhesión que interactúan con adhesinas del endotelio vascular. Una vez en los tejidos, los monocitos maduran hacia macrófagos donde sus funciones dependerán del tejido en el que se encuentren [28]. Los macrófagos juegan un papel importante en la RII pero además, están adaptados para inducir la respuesta inmune adquirida tanto humoral



como mediada por células. Los macrófagos son capaces de fagocitar microorganismos y eliminarlos, además de secretar citocinas como TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-6, que participan en el reclutamiento de células inflamatorias y en inducir la respuesta inflamatoria. Durante la respuesta inmune específica estas células funcionan como células presentadoras de antígenos (APC), además, liberan proteínas del complemento, que junto con los anticuerpos producidos por los linfocitos B, opsoniza a un gran número de antígenos facilitando el reconocimiento de los microorganismos por distintos receptores como Fc γ o CR1, CR2, CR3 y CR4 [25].

La activación del macrófago es importante para desarrollar funciones como la presentación de antígeno, lisis de células tumorales y actividad microbicida. La principal citocina responsable de la activación de los macrófagos es el IFN- γ (producida inicialmente por células NK durante la activación de la RII), aunque otras moléculas como el GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-2, IL-4 y TNF- α también activan a los macrófagos [29, 30].

Existen genes que se inducen por la presencia de IFN- γ y TNF- α que actúan de manera sinérgica. En la activación por TNF- α se activa el factor de transcripción NF- κ B que se encuentra latente en el citosol y una vez activado se trasloca al núcleo e induce la transcripción de varios genes. La mayoría de los genes inducibles sinérgicamente por IFN- γ y TNF- α contienen cajas ISRE y NF- κ B en su promotor. Este sinérgismo entre el TNF- α producido por los macrófagos y el IFN- γ producido por los linfocitos T y las células NK, promueve mecanismos inductores de protección.



1.3.3. Células NK (Natural Killer)

Actualmente se conoce a las células NK como un componente central del sistema inmune innato. Las células NK fueron originalmente identificadas por su habilidad para lisar células tumorales en ausencia de estimulación previa. Estas células que representan una tercera población de linfocitos, no expresan marcadores de células T o B y son distinguidas de los otros linfocitos dado que no expresan receptores de distribución clonal para antígenos [31].

Bajo condiciones normales, las células NK se encuentran principalmente en sangre periférica (10-20% de linfocitos totales), bazo, hígado y médula ósea, pero pueden migrar hacia tejidos inflamados en respuesta a diferentes quimioatrayentes [24, 31]. Las células NK juegan un papel importante en el control del crecimiento tumoral y prevención de la rápida diseminación de tumores metastásicos en modelos murinos. Además, son fundamentales en la defensa contra infecciones virales (principalmente de herpesvirus), bacterianas (Gram-positivas y Gram-negativas) y parásitos protozoarios intracelulares como *Leishmania* [32, 33]. La activación de células NK incrementa la síntesis de quimiocinas y citocinas que inducen respuestas inflamatorias, modulan la hematopoyesis, controlan el crecimiento de monocitos y granulocitos e influyen en el tipo de respuesta adaptativa subsecuente [31].

Las células NK reconocen moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I) a través de receptores de superficie. Las células NK lisan aquellas células que no presentan o que expresan insuficientes cantidades de MHC I. Lo anterior sucede frecuentemente en células tumorales y células infectadas con virus [34].

En humanos, las células NK tienen receptores inhibitorios que pertenecen a tres familias:



la familia de los receptores KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors), los cuales son expresados sólo en determinadas células NK y reconocen diferentes grupos alélicos de moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C. Los receptores inhibitorios son el KIR2DL (cola citoplasmática larga), KIR3DL, NKG2A/CD94 y NKG2B/CD94. La segunda familia de receptores inhibitorios consta de los receptores ILT de tipo Ig. Un miembro de esa familia es el ILT2, que presenta una especificidad amplia por un gran número de alelos del MHC I. La tercer familia consta de heterodímeros compuestos de las lectinas tipo C, como NKG2A o NKG2B, unidas en forma covalente a CD94 [31, 34, 35]. Normalmente, las células NK reconocen moléculas MHC I a través de sus receptores inhibitorios y solo en caso de una alteración en moléculas MHC I estos receptores no transmiten una señal inhibitoria llevando a la activación de las células NK. Los receptores con función inhibitoria de las células NK se caracterizan por su habilidad en reclutar y activar las proteínas con función de tirosina fosfatasa SHP-1 y SHP-2 a través de ITIMs presentes en sus tallos citoplasmáticos.

Algunos miembros de las familias KIR y CD94/NKG2 no contienen ITIM, sino que se asocian a moléculas accesorias portadoras de ITAM (como DAP2) produciendo señales activadoras de estas células. Entre los receptores KIR activadores de las células NK se encuentran: KIR2DS (cola citoplasmática corta), KIR3DS, NKG2C/CD94 y NKG2E/CD94. Los receptores activadores reconocen estructuras alteradas asociadas al MHC I y su activación lleva a la inducción de la actividad citolítica de las células NK, destruyendo todas aquellas células que expresen alteraciones en el número o estructuras del MHC I, como ocurre durante algunas infecciones virales o en células tumorales [31, 36]. Los receptores con función activadora de las células NK incluyen varios grupos de moléculas con estructuras diferentes y solo se conocen algunos de los ligandos a los que se unen. Estos receptores están asociados con moléculas de señalización que contienen dominios ITAM como las



proteínas Fcε RIγ, ζ y DAP12. Los receptores activadores de NK intervienen en vías de transducción de señales en las que participan las proteínas tirosinas cinasas Syk y ZAP-70, así como moléculas adaptadoras que se asocian a receptores antigénicos de linfocitos y de los receptores Fc de Ig. CD16 es uno de los receptores activadores de las células NK [23, 24].

Además, la células NK tienen receptores de citotoxicidad naturales que detectan la presencia de infecciones, entre estos se encuentran NKG2D, NKp30, NKp44 y NKp46, que se asocian a FcRγ y ζ y se expresan solo en las células NK [36].

En la leishmaniasis humana y experimental se ha visto que las células NK son productoras tempranas de IFN-γ, el cual es un mediador crucial de la resistencia innata contra el parásito *Leishmania*, así como un potente activador de macrófagos. La producción temprana de IL-12 por parte de los macrófagos induce la activación de células NK. *Leishmania* es capaz de inhibir la síntesis de IL-12 en macrófagos, lo cual limita la activación de las células NK [37, 38, 39]. Promastigotes de *Leishmania* activan directamente a células NK a través del reconocimiento de LPG en fase procíclica y metacíclica por medio de TLR-2. Este reconocimiento provoca el incremento de la expresión del receptor TLR-2 en la membrana de células NK e induce la secreción de IFN-γ, TNF-α y la traslocación nuclear de NF-κB [34, 37, 38].



1.4. Receptores de la Respuesta Inmune Innata

Las interacciones hospedero-patógeno inician generalmente a través del reconocimiento de estructuras moleculares conservadas, esenciales para el ciclo de vida de los patógenos. El reconocimiento rápido de los PAMPs se lleva a cabo mediante PRRs que activan complejos de señalización que culminan en la inducción de la inflamación mediada por varias citocinas y quimiocinas, lo que subsecuentemente trae como resultado la eliminación del patógeno. Diversos PRRs, como los TLRs, receptores tipo RIG-1(RLRs), receptores tipo NODs (NLRs) y los receptores de DNA, han sido estudiados. Estos receptores son capaces de reconocer varias clases de moléculas como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos [40].

1.4.1. Receptores Tipo Toll (TLRs)

El descubrimiento de la familia de los TLRs comenzó con la identificación del receptor Toll, un receptor expresado en insectos que es esencial para el establecimiento del eje dorso-ventral durante la embriogénesis en *Drosophila*. Si algún componente en la vía de señalización de Toll está ausente durante este proceso genético, no se desarrollan los tipos celulares laterales o ventrales [41, 42, 43]. Los receptores Toll también tienen un papel esencial en la respuesta inmune innata de los insectos contra infecciones fúngicas en etapas adultas. El papel de los receptores Toll en la señalización de la respuesta inmune de *Drosophila* es inducir una respuesta contra infecciones microbianas y una de ellas es la inducción transcripcional de una serie de genes codificadores de péptidos antimicrobianos, que incluyen elementos κB , y sugieren que proteínas como NF- κB /Rel podrían ser activadores de la respuesta inmune en insectos. Las proteínas nucleares Dorsal, Dif y Relish de *Drosophila* participan en la regulación de la transcripción a través de sitios κB , y son consideradas



proteínas activadoras en respuesta a infecciones. Proteínas como: Spätzle, Toll, Pelle, Tube y Cactus son requeridas en respuesta a infecciones para la rápida inducción transcripcional de genes que codifican para péptidos antimicrobianos, como la drosomicina [44, 45].

Los TLRs (en mamíferos) son receptores de superficie celular e iniciadores de respuestas inflamatorias contra patógenos que están relacionados con la señalización hacia el factor de transcripción NF- κ B, que regula la transcripción de varios genes involucrados en la respuesta inmune. Los TLRs son glicoproteínas integrales de membrana tipo 1 con masa molecular de 87-115 kDa que reconocen patógenos y ligandos virales [44, 45]. Algunos de ellos se encuentran localizados en la superficie celular como el TLR-1, 2, 4 y 6, mientras que otros, como el TLR-3, 7 y 9, se encuentran secuestrados en compartimentos intracelulares [46, 47].

Los TLRs son capaces de reconocer diversos componentes patogénicos a través de estructuras denominadas ectodominios (ECD), los cuales comprenden entre 19 a 25 copias en tandem de un motivo conocido como regiones ricas en leucina (LRR; Leucine-rich repeats). Estas LRR se caracterizan por ser estructuras amino y carboxilo terminal que median el reconocimiento de PAMPs y, dependiendo de los cambios en estas regiones, se les atribuye el reconocimiento de ligandos específicos a cada uno de los receptores TLRs. Algunos ECD de los TLRs tienen su cara al exterior de la célula o en el lumen de un compartimento intracelular donde estos reconocen al patógeno [46, 48]. Los TLRs están formados por un esqueleto básico en forma de herradura solenoide que contiene hojas β -plegadas sobre su superficie, así como numerosas inserciones de unión a ligandos. Estas inserciones junto con las hojas β -plegadas podrían propiciar una superficie de unión 10 veces más plegada, que las superficies de unión en otros tipos de receptores [46]. Además de las regiones LRR, los TLRs se caracterizan por la presencia de una región intracelular o citoplasmática de-



nominada dominio del receptor de la familia Toll/IL-1 (TIR), debido a la homología que presenta esta región con el receptor de IL-1 [46, 49].

La estimulación de los TLRs por medio de PAMPs activa una cascada de señalización que induce la producción de citocinas pro-inflamatorias y la subsecuente respuesta inmune. La cascada de señalización río abajo de los TLRs es generada por su dominio TIR [50, 51].

Con excepción del TLR-10, ya han sido identificados ligandos específicos para los diferentes TLRs. El ligando para TLR-1 son lipoproteínas triaciladas, un ligando del TLR-3 es el RNA de doble cadena, mientras que el ligando para TLR-4 es lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared de bacterias Gram-negativas. Por otro lado, el TLR-5 reconoce la flagelina, un componente del flagelo bacterial. Para el TLR-6 los ligandos son lipoproteínas diaciladas y para TLR-7 es imidazoquinolina, una droga antiviral y su derivado R-848. Se ha reportado que el TLR-8 reconoce componentes de bacterias uropatogénicas y RNA de cadena sencilla. El TLR-9 reconoce CpG de DNA bacterial no metilado [21, 50, 51, 52] (Figura 1.9).

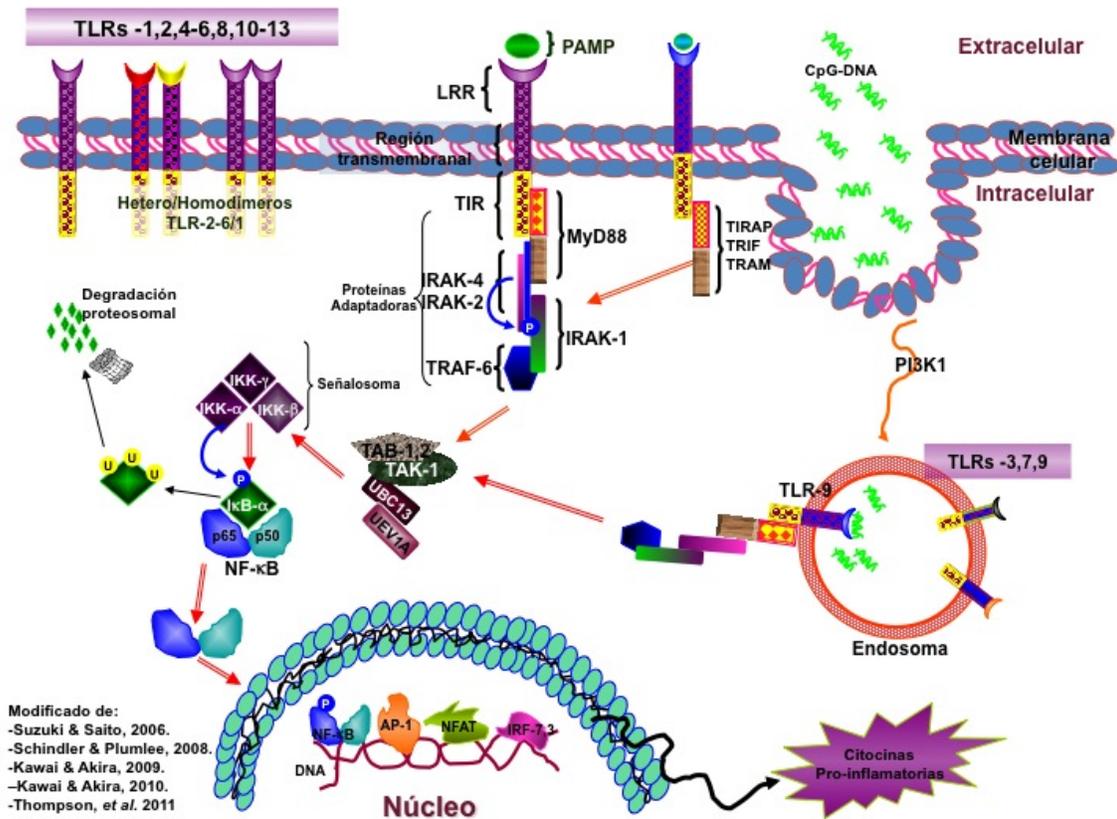


Figura 1.9: Ubicación celular y señalización a través de los receptores tipo Toll (TLRs).

Las respuestas mediadas por los TLR son controladas principalmente por la vía dependiente de la proteína adaptadora MyD88, la cual es usada por todos los TLRs a excepción de TLR-3, y la vía dependiente de TRIF, la cual es utilizada por TLR-3 y TLR-4. TRAM y TIRAP son proteínas adaptadoras utilizadas por TLR-4 y TLR-2-TLR-4 respectivamente. MyD88 recluta IRAK-4, IRAK-1, IRAK-2 y TRAF-6 e inducen una respuesta inflamatoria a través de la activación de NF- κ B y otros factores de transcripción como MAPK e IRF-5. TRAF-6 activa TAK-1 en complejo con TAB-2 y TAB-3 que activan a su vez al complejo IKK que consiste de NEMO (IKK- γ e IKK- α β), el cual cataliza la fosforilación de las I κ B. NF- κ B induce se separa de las proteínas I κ B y se transloca al núcleo de la célula para inducir genes que codifican para IL-6, IL-12p40, IL-1 α , IL-1 β y TNF- α . TRIF recluta a TRAF-6, TRADD y TRAF-3 para inducir la activación del inflammasoma durante la señalización a través de TLR-4. Por otro lado, TLR-3 que reside en endosomas y reconoce dsRNA, recluta a TRIF para activar esta vía e inducir la producción de interferones Tipo I (IFN- α e IFN- β) e IL-12 mediante los factores de transcripción IRF-3 y 7.



El TLR-2 reconoce diversos componentes microbianos, incluyendo peptidoglicanos de bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, lipoproteínas, lipo-arabinomananos de *Mycobacterium tuberculosis*, lipopéptidos bacterianos, anclajes de fosfatidilinositol de *Trypanosoma cruzi*, porinas de *Neisseria meningitides*, lipofosfatidilserina de *Schistosoma mansoni*, componentes de la pared celular de levaduras como el zimozan y el lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania major* [49, 51, 53]. Este reconocimiento tan diverso de PAMPs a través del TLR-2 parece deberse a la formación de heterodímeros entre TLR-2 y otros TLRs como TLR-1 y TLR-6. Estos reconocen diferencias estructurales entre lipopéptidos bacterianos y lipopéptidos de hongos. La unión de peptidoglicanos puede ser reconocido por un homodímero de TLR-2 o un heterodímero de TLR-2 y un TLR-1 o 6 [50].

La producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos y células dendríticas en respuesta a zimozan requiere de TLR-2 y TLR-6. Durante la fagocitosis de zimozan tanto TLR-2 como TLR-6 son reclutados al fagosoma. La heterodimerización inicia la señalización del TLR generando la activación de NF- κ B y la producción de citocinas como TNF- α [47].

Los TLRs son una familia de receptores que provocan la activación de diversas moléculas involucradas en la señalización, la cual se desencadena por el reconocimiento de diversos ligandos. El inicio de la señalización en los TLRs es por mediada por las regiones TIR que reclutan proteínas adaptadoras [51, 54].

La unión TLR-2—ligando activa una señalización que recluta a proteínas adaptadoras comenzando por la interacción del receptor con MyD-88 (Myeloid Differentiation primary response protein-88) a través del dominio TIR, la cual interactúa con la proteína cinasa serina/treonina IRAK-4 (Interleukin-1Receptor Associated Kinase-4) que induce el reclutamiento de IRAK-1, este complejo induce la fosforilación y disociación de IRAK-1 para



su posterior asociación con TRAF-6 (TNF receptor associated factor-6). Cuando TRAF-6 se disocia de IRAK-1 y se une a las proteínas TAK-1 (Transforming growth factor- β -Activated Kinase), TAB-1 (TAK-1 Binding protein-1) y TAB-2 trae como consecuencia la ubiquitinación de TRAF-6. Posteriormente, TAK-1 fosforila y activan un complejo denominado señalosoma que involucra a las proteínas: IKK- α , β y γ (inhibitor of κ B kinase- α , β y γ), cuya función es fosforilar a las proteínas inhibidoras de NF- κ B: I κ B produciendo su degradación y promoviendo la separación de NF- κ B originalmente secuestrado en el citoplasma. Este factor está compuesto de homodímeros y heterodímeros de la familia Rel como p50, p52, c-Rel, Rel B y p65. Los heterodímeros citoplasmáticos inactivos de NF- κ B son liberados por medio de la fosforilación de I κ B, provocando así su traslocación al núcleo donde interactúan con elementos mediadores de la activación de transcripción de genes [55, 56, 57] (Figura 1.9).



1.5. Vía de señalización de JAK/STAT

Los monocitos/macrófagos representan la principal diana del IFN- γ (producida entre otras células por linfocitos NK) [31]. El receptor del IFN- γ , que se encuentra en la membrana celular, reconoce al IFN- γ y tras la unión y la consiguiente oligomerización con las cinasas JAK 1 y 2, estas interaccionan entre sí y se activan por fosforilación recíproca y fosforilan determinados residuos de tirosina que se encuentran en la región intracitoplasmática de la cadena α del receptor. Dichos residuos son reconocidos por el dominio SH2 de la proteína STAT-1 α (Signal Transducer and Activator of Transcription) que es blanco de fosforilación por proteínas JAK. STAT-1 α se dimeriza dando lugar al complejo transcripcional GAF, que se transloca al núcleo para inducir la expresión de numerosos genes, entre ellos Fc γ R1 y factores de transcripción necesarios para la regulación de genes como IFN- α/β , MHC I y la iNOS.

Actualmente se conocen siete proteínas STAT: STAT-1-4, STAT5a, STAT5b y STAT6 que participan en respuesta al reconocimiento de diversas citocinas [58, 59] (Figura 1.9). Los mecanismos de represión de la vía JAK/STAT son básicamente cinco: la endocitosis de los complejos JAK-Receptor, efectos dominantes negativos de las diversas variantes de STAT, la familia de proteínas PIAS (Protein Inhibitors of Activated STATs), la familia de proteínas SOCS (Suppressors Of Cytokine Signaling) y las tirosina fosfatasa [60] (Figura 1.10).

En la literatura existen evidencias de la participación de la vía de señalización JAK/STAT en la infección por *Leishmania sp.* Los ratones C57BL/6 (resistentes a la infección por *Leishmania major*) deficientes de STAT-1 (C57BL/6 STAT-1^{-/-}), se ha demostrado, desarrollan grandes lesiones con abundantes parásitos [61]. Otros estudios demostraron que la infección por *Leishmania donovani* atenua la fosforilación STAT-1 que se induce por el IFN- γ en monocitos humanos y en la línea celular U-937 [58]. La misma especie de *Leish-*



mania es capaz de inducir la expresión del gen SOCS-3 y de disminuir significativamente la fosforilación de STAT-1 en macrófagos humanos [62].

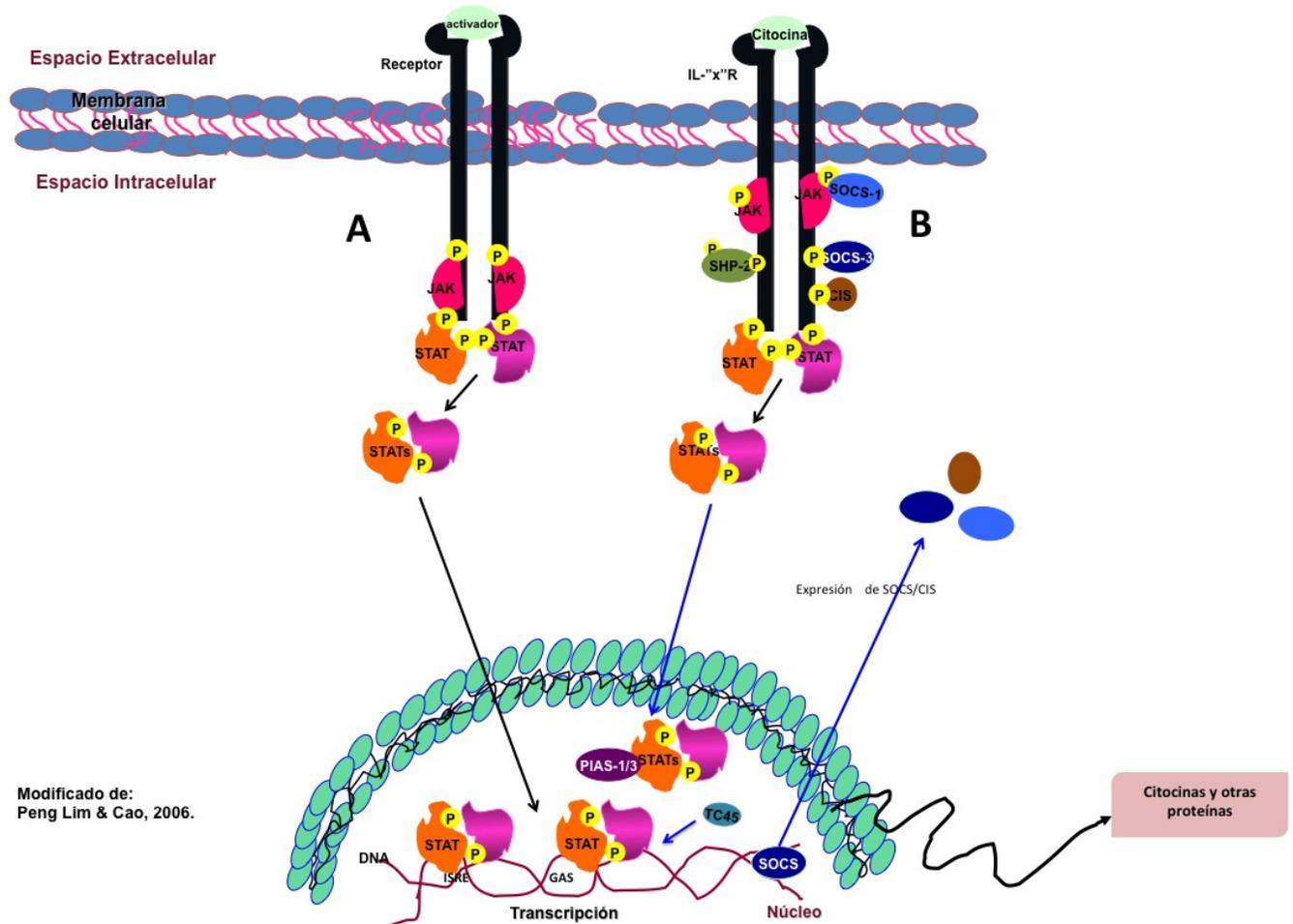


Figura 1.10: **Activación (A) e inactivación (B) de la vía JAK/STAT.** **A)** La vía de JAK/STAT es activada por citocinas, factores de crecimiento, receptores acoplados a proteína G o proteínas adaptadores como MEK K1-C para finalmente unirse a sus elementos de DNA: ISRE y GAS. La señalización comienza cuando el receptor en la membrana celular reconocen a la molécula que les activa, de esta forma el receptor recluta a las proteínas JAKs que a su vez fosforilan a las proteínas STATs que activadas por esta fosforilación pueden unirse y translocarse al núcleo de la célula, por ejemplo, IFN- γ estimula la activación de homodímeros de STAT-1 e inducen la transcripción de genes que contienen elementos GAS. **B)** La inactivación de esta vía esta regulada por las proteínas SOCS, PIAS, TC45 o SHP-2.



1.6. Inflamación

La inflamación es un conjunto de interacciones entre factores solubles y células inducida por estímulos nocivos y daño tisular. Se conocen los acontecimientos celulares y moleculares que están implicados en la respuesta inflamatoria aguda a la infección y, en menor medida, a la lesión tisular. En general, se considera que una respuesta inflamatoria controlada es beneficiosa (por ejemplo, en la protección contra una infección), pero puede ser perjudicial si existe una desregulación (por ejemplo, causando shock séptico) [63, 64].

La respuesta inflamatoria es coordinada por una amplia gama de mediadores inflamatorios que forman redes reguladoras muy complejas entre los que se encuentran los inductores y los mediadores de la inflamación. Los mediadores, efectores de la inflamación, alteran los estados funcionales de órganos y tejidos. Muchos de estos mediadores inflamatorios tienen efecto sobre el tejido vascular y en el reclutamiento de leucocitos y algunos como la histamina y la serotonina están preformados y almacenados en los gránulos de los mastocitos, basófilos y plaquetas [63, 64]. El efecto principal y más inmediato de estos mediadores es obtener un exudado inflamatorio a nivel local: las proteínas del plasma y leucocitos (principalmente neutrófilos) que normalmente están restringidos a los vasos sanguíneos ahora tienen acceso, a través de las vénulas poscapilares, al tejido extravascular y al sitio de la infección o lesión. El endotelio vascular permite la extravasación de neutrófilos mediante la adhesión de células al endotelio mediado por selectinas, integrinas y receptores de quimiocinas en los leucocitos y espacios extravasculares. Al llegar al lugar de los tejidos afectados, los neutrófilos se activan, ya sea por contacto directo con agentes patógenos o mediante la acción de citocinas secretadas por las células de los tejidos residentes [63, 65]. Una respuesta inflamatoria aguda adecuada resulta en la eliminación de los agentes infecciosos, seguida de una fase de reparación, la cual es mediada por macrófagos reclutados o



residentes en el tejido. El cambio de mediadores lipídicos de prostaglandinas inflamatorias a lipoxinas anti-inflamatorias, es crucial para la transición de la inflamación a la reparación. Pero, si durante la respuesta inflamatoria aguda no se logra eliminar al agente patógeno, el proceso inflamatorio persiste y adquiere nuevas características. El infiltrado de neutrófilos se sustituye por macrófagos y por linfocitos T. Si el efecto combinado de estas células aún es insuficiente, se genera un estado inflamatorio crónico con la formación de granulomas [63, 64].

1.6.1. Inflamasoma

La inflamación generada por microorganismos es debida a los PAMPs que son detectados por PRRs del hospedero que incluyen a los TLRs y NODs, este reconocimiento estimula la expresión de mediadores pro-inflamatorios como IL-1 β e IL-18. Adicionalmente, el reconocimiento de "señales de daño" llevan a la activación y ensamblaje de diversas proteínas presentes en el citosol de las células que constituyen un inflamasoma [63, 64, 65]. NALP3, que pertenece a una gran familia de receptores intracelulares NODs (NLRs), es capaz de convertir la procaspasa-1 inactiva a su forma activa, la caspasa-1, y esta enzima escinde la forma inactiva del precursor de la IL-1 β e IL-18 generando las formas activas que son secretadas [66]. La IL-1 β es una citocina que se activa en respuesta a una infección y es producida principalmente por monocitos y, en bajas concentraciones, causa fiebre, hipotensión y promueve la producción de otras citocinas pro-inflamatorias como la IL-6 [67, 68]. Diversos estudios han demostrado que la activación del inflamasoma NLRP3 se da en respuesta a diversos microorganismos como *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *M. tuberculosis* [68].



1.6.2. Respuesta inmune e inflamación durante la infección por *Leishmania spp.*

La respuesta inmune contra la infección por *Leishmania* depende principalmente del tipo de célula del hospedero y de la especie de parásito. La resolución de la infección depende de una respuesta tipo Th1 junto con la producción de interleucina-2 (IL-2) e IFN- γ . Mientras que la susceptibilidad a la enfermedad se asocia con la falta de respuesta Th1, el desarrollo se asocia con una respuesta de Th2, caracterizada por la presencia de IL-4 e IL-10. El TNF- α producido por macrófagos activados y células NK también es importante para el control de las infecciones por *Leishmania*, ya que, junto con el IFN- γ , participa en la activación de macrófagos y en la producción de óxido nítrico e intermediarios reactivos del oxígeno que ayudan a la eliminación del parásito [7, 69, 70, 71, 72, 73, 74].

La LC se asocia con una respuesta inmune protectora, mientras que en la LV y la LCD la respuesta inmune no es capaz de eliminar al parásito. En el caso de la LMC, la intensa reacción inflamatoria genera un cuadro clínico muy grave, adicionalmente, la susceptibilidad a lesiones de la mucosa se relacionan con una respuesta Th1 hiperactiva, con un aumento de la producción de TNF- α e IFN- γ y una disminución en la producción de IL-10. Durante el desarrollo de la LMC, el mayor daño tisular se asocia con una baja expresión del receptor de IL-10, asociado a células citotóxicas CD4⁺ e inflamatorias, lo cual pudiera participar como posible mecanismo de progresión [7, 69, 72, 74].

Durante la infección por *Leishmania*, el sistema inmune innato de la piel desencadena dos vías de respuesta inmune complementarias: el reclutamiento de células proinflamatorias y la promoción e inducción de la respuesta inmune adaptativa incluyendo células T y la formación de anticuerpos [4, 5]. Diversas células del sistema inmune innato como los mastocitos, macrófagos y células dendríticas son las responsables de la detección de parásitos,



mismas que, junto con la infiltración de neutrófilos, producen mediadores pro-inflamatorias que ayudan a contener y controlar al patógeno en los sitios de infección. Al mismo tiempo, estas células promueven la respuesta inmune adaptativa de células T, que se requieren para resolver eficazmente la infección de este parásito [3, 5, 75, 76].

Poco se sabe sobre los factores implicados en la modulación de la evolución de la leishmaniasis y entre los posibles factores se proponen los mediadores tempranos de la inflamación como las citocinas proinflamatorias y las quimiocinas que atraen a neutrófilos, cuya presencia se asocia con la inflamación excesiva y progresión de la enfermedad. La disminución del infiltrado por neutrófilos se correlaciona con un mejor control de la enfermedad [77]. El papel facilitador de los neutrófilos está asociado con su capacidad para fagocitar a los parásitos y favorecer su transporte fuera del sitio de infección, evitando así los efectos tóxicos del complemento y de la respuesta inmune local. Estudios hechos en el modelo murino mostraron que durante la infección por *Leishmania* los neutrófilos entran en los vasos linfáticos favoreciendo la distribución de los parásitos hacia los tejidos periféricos [78].

Los macrófagos constituyen el principal reservorio del parásito *in vivo* y a pesar de que no producen IL-12 después de la infección con *L. major*, son capaces de producir citocinas proinflamatorias como TNF- α en los sitios de infección y de producir NO mediante el cual participan en el control local de la infección [3].



1.7. Bases genéticas de susceptibilidad a enfermedades

La variabilidad biológica está basada en función de la interacción de la herencia y el ambiente, incluyendo el medio geográfico (naturaleza del suelo, ambiente térmico, recursos alimenticios), y en el caso del hombre, el medio cultural en el cual vive. Todos estos factores ambientales pueden quedar integrados en la ecología humana [79].

Existen dos tipos principales de variabilidad: la cuantitativa y la cualitativa, las cuales emplean métodos propios, preponderantemente métricos en el primer caso y sobre todo genéticos en el segundo. Los rasgos fundamentales de tipo hereditario de la variabilidad humana los estudia la Genética Humana, mientras que los cuantitativos o métricos son abordados por la Antropometría y la Antropología cuantitativa, nutriéndose ambas de la Bioestadística [79].

1.7.1. Polimorfismos genéticos

La variabilidad genética entre los humanos y los polimorfismos genéticos (PG) son una variante alélica que existe de forma estable en una población. Para ser considerado un PG debe presentar una frecuencia de al menos el 1 % en la población. Son, por lo tanto, diferentes de las mutaciones las cuales son mucho menos frecuentes y van asociadas habitualmente a enfermedades hereditarias [80]. Polimorfismo (del griego, poli: muchos; morfo: formas) es una secuencia de DNA con dos o mas formas alternas conocidas como alelos, donde el alelo más raro tiene una frecuencia mayor del 1 % en la población. Un marcador molecular es un polimorfismo que se usa para “marcar” o diferenciar dos cromosomas o individuos [79].



*** Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)**

Dentro de estos PG encontramos los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (por sus siglas en inglés: Single Nucleotide Polymorphisms), que son variaciones de secuencias que involucran la sustitución de un nucleótido cuando se comparan dos cromosomas homólogos. La gran mayoría de los SNPs son bi-alélicos, es decir, alternan entre dos nucleótidos, están presentes a lo largo del genoma humano con un espaciado promedio de 400 pb bases y hay cerca de 10 millones de ellos en la cadena de DNA. Se cuenta con un mapa de alrededor de 1.4 millones de SNPs a lo largo del genoma humano, 60,000 de los cuales (alrededor del 3%) se encuentran dentro de regiones no-codificantes (intrones y promotores), sin embargo, también se encuentran en regiones codificantes o exones [80, 81, 82].

Cuando el SNP se encuentra dentro de la región codificadora del gen o exón, la probabilidad de que se altere la función biológica de la proteína es mayor, ya que el cambio de base puede traducirse en la sustitución de un aminoácido por otro [80, 81]. La presencia de SNPs que ocurren en regiones del gen que no se traducen en proteína son aún más frecuentes que aquellas que se encuentran en regiones codificantes. Sin embargo, también tienen efectos biológicos, *e. g.* un SNP en la región promotora de un gen altera la afinidad por la unión con factores de transcripción, o la actividad de "enhancer", variando de esta forma los niveles de transcripción del gen y produciéndose como consecuencia, cambios en los niveles de la proteína [80, 81, 83].

La variabilidad fenotípica entre dos individuos, así como la susceptibilidad o resistencia individual a diferentes enfermedades se fundamenta primordialmente en las diferencias de secuencias existentes en el DNA, en sitios o en nucleótidos específicos (SNPs), así como en menor grado, en la presencia de pequeñas inserciones, deleciones, polimorfismos en secuencias repetidas y rearrreglos cromosómicos [81].



*** SNPs asociados a enfermedades infecciosas**

La variación genética observada entre individuos confiere un efecto de susceptibilidad o protección hacia una enfermedad en una persona específica cuando se le compara con una población. Gran parte de las enfermedades son complejas porque éstas derivan de una combinación de variantes genéticas, y cada una proporciona un efecto sutil, aditivo y personalizado. Dependiendo de los componentes genéticos implicados en diversas enfermedades, serán las posibles manifestaciones clínicas presentes en estas [84]. Hay genes que influyen en enfermedades complejas y están relacionados con defectos en la respuesta inmune, como es el caso de las enfermedades infecciosas e inflamatorias. En estos casos, los SNPs se consideran herramientas de gran alcance para la búsqueda de los genes responsables.

Las enfermedades infecciosas representan un problema de salud mundial en términos de mortalidad y morbilidad, presentándose con mayor frecuencia en países en desarrollo. Una compleja combinación del ambiente, patógeno y factores genéticos del hospedero juegan un papel importante en determinar la susceptibilidad a microorganismos particulares [85, 86, 87, 88]. La naturaleza de la enfermedad y los genes del hospedero que determinan la compleja respuesta inmune, determinan la susceptibilidad diferencial de la población. Actualmente únicamente se identificaron una pequeña fracción de SNPs asociados con susceptibilidad [88].

Se han realizado análisis enfocados en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas como la sepsis, el VIH/SIDA, la tuberculosis, malaria, leishmaniasis, etc; siendo ésta última una enfermedad con muy pocos reportes.

El conocimiento de la respuesta inmune adaptativa a diversas enfermedades infecciosas generadas por microorganismos intracelulares mostró la importancia del desarrollo de una



respuesta tipo Th1. Poco se ha estudiado la respuesta inmune innata y su papel en definir el curso de una respuesta inmune adaptativa [89].

En leishmaniasis existen estudios limitados sobre SNPs en genes de citocinas y la susceptibilidad a la infección. Un estudio en Iran, analizó SNPs en las citocinas (TNF- α -308 (A/G), TNF- β +252 (G/A), IFN- γ +874 (A/T) e IL-4 -590 (C/T)), con el fin de buscar una correlación entre estos SNPs y la susceptibilidad a la LC en pacientes que habían curado de leishmaniasis cutánea (CLC), controles asintomáticos infectados (CAI), pacientes con leishmaniasis cutánea crónica (LCC) y controles normales (sin infección) (CN). Este estudio no mostró diferencia entre grupos para los SNPs en TNF- α -308 (A/G) y TNF- β +252 (G/A), sin embargo, comparando el grupo LCC con el de CN, se encontró que el SNP para IFN- γ +874 (A/T) es menos común en el grupo LCC y el SNP en IL-4 -590 (C/T) tuvo diferencias significativas al comparar el grupo CLC con el grupo CAI. Los autores sugieren que las variantes genéticas en el promotor para IL-4 podría influir el riesgo a desarrollar leishmaniasis cutánea. Así mismo el SNP en el gen para IFN- γ influye en la progresión de la enfermedad hacia una leishmaniasis cutánea crónica [78].

En un análisis del SNP para IFN- γ +874 (T/A) en pacientes con leishmaniasis tegumentaria americana, que incluyó a pacientes con LC y con LMC, no se encontró asociación con la susceptibilidad o gravedad hacia la leishmaniasis. Sin embargo, en este estudio se propone que este SNP podría estar involucrado en la patogénesis de la leishmaniasis, ya que niveles elevados de IFN- γ en pacientes con LC no pudieron prevenir el desarrollo de la enfermedad [90].

En un gran número de enfermedades inflamatorias sistémicas se ha encontrado que se producen concentraciones excesivas de IL-1 β . En enfermedades parasitarias como la enfermedad de Chagas, se analizaron los SNPs en IL-1 α (-889 (C/T), +4845 (G/T)), IL-1 β



(-511(C/T), -31(T/C), +3954 (T/C), +5810 (G/A)) e IL-1RN (+8006 (T/C), +8061 (C/T), +1110 (T/C)) en pacientes seropositivos con cardiomiopatía, seropositivos sin cardiomiopatía e individuos asintomáticos de una población Colombiana, donde la infección por *Trypanosoma cruzi* es endémica. Este estudio encontró diferencias significativas para el genotipo IL-1 β +5810 (G/G) cuando se compararon los pacientes con cardiomiopatía vs los individuos asintomáticos. Los autores concluyen que estos resultados mostraron que en la población colombiana el alelo IL-1 β +5810 G está asociado a cardiomiopatía chagásica y demostraron que la homocigocidad para el alelo de riesgo es un factor de susceptibilidad a la cardiomiopatía [91].

Por otro lado, los SNPs de IL-1 β están asociados con la susceptibilidad a diversas enfermedades inflamatorias, tales como el cáncer gástrico [92, 93], la enfermedad periodontal [94], enfermedades inflamatorias del intestino [95] y la poliposis nasal [96], entre otros. Adicionalmente, SNPs en IL-1RA están asociados con un aumento significativo en el riesgo de desarrollar aveolitis fibrosante [97].

El SNP en IL-8 (-251) se asoció con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad gastroduodenal [98]. Vairaktaris *et al.* (2007) [99] sugieren que la IL-8 (-251) podría ser un importante factor de riesgo genético para el cáncer oral.



1.8. Proteómica

El estudio de proteínas que se expresan a partir de un genoma, así como sus modificaciones (fosforilación, acetilación, ubiquitinación, etc) es de importancia, pues en muchos casos no son los cambios en los genes los que dan lugar a algunas enfermedades, sino alteraciones a nivel de traducción de proteínas y modificaciones postraduccionales de las proteínas que determinan su función biológica [100].

El estudio del perfil de proteínas en el suero durante alguna infección es importante para entender la patogénesis de la enfermedad. Esta información genera biomarcadores que permiten identificar blancos terapéuticos. Existen estudios proteómicos en fluidos del cuerpo humano, que durante los últimos años permitieron identificar potenciales candidatos de biomarcadores para diversas enfermedades [1].

En infecciones por *Leishmania donovani* se encontraron proteínas expresadas diferencialmente entre pacientes con leishmaniasis y controles, que sugieren su potencial uso como marcadores pronósticos de la enfermedad [1].

Capítulo 2

JUSTIFICACIÓN



Poco se sabe acerca de los factores que intervienen en la modulación de la evolución de la leishmaniasis en pacientes con LCL y LCD. Uno de los posibles factores serían los mediadores de la inflamación, ya que la respuesta inflamatoria excesiva se asoció con la progresión de la enfermedad. En modelos experimentales de ratón, se observó que el reclutamiento de neutrófilos contribuye a la susceptibilidad de la enfermedad. Uno de los factores responsables de la infiltración de neutrófilos es la IL-1 β , que también induce otros mediadores innatos tales como proteínas de fase aguda y quimiocinas como CXCL8 (IL-8). Niveles elevados de RNAm de IL-1 β se detectaron en biopsias de pacientes con leishmaniasis cutánea americana, sin embargo, aun no se reportaron SNPs para IL-1 β en leishmaniasis [101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108].

Por otro lado, datos no publicados (Tesis de Doctorado, Cañeda Guzmán, C.) indican que células NK estimuladas con LPG de pacientes con LCL y LCD infectados con *Leishmania mexicana*, tienen un patrón diferencial en la producción de IFN- γ , TNF- α y expresión de TLR-2. Células NK de pacientes con LCL producen estas citocinas e incrementan la expresión del receptor en su membrana cuando son estimuladas con LPG de *Leishmania major*, mientras que las células NK de pacientes con LCD disminuyen su producción de citocinas y reducen la expresión de su receptor.

La producción de IFN- γ en etapas tempranas de la infección es modulada por el parásito a través de vías de señalización de JAK/STAT en diversas especies de *Leishmania* a través de la activación de reguladores negativos de la vía [62]. Sin embargo, para *Leishmania mexicana*, y en particular en células NK y monocitos de pacientes con LCL y LCD se desconoce la modulación de JAK/STAT por el parásito.

Los antecedentes sugieren que se están activando distintos genes en células NK entre ambos grupos de pacientes. Dado que hasta este momento se desconocen los factores que



modulan la evolución de la leishmaniasis en pacientes LCL y LCD, en el presente trabajo exploramos SNPs en genes de la respuesta inmune innata y vías de señalización de TLRs y JAK/STAT en ambos grupos de pacientes y buscamos su asociación con la susceptibilidad a la leishmaniasis.

Capítulo 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



3.1. Hipótesis

Existe una expresión diferencial de genes y proteínas de la respuesta inmune innata (vía de TLR-2 y JAK/STAT) entre pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y difusa que se correlaciona con la gravedad en el cuadro clínico.

3.2. Objetivo General

Analizar comparativamente la expresión de genes y proteínas relacionados con las vías de señalización TLR-2 y JAK/STAT en muestras de pacientes con LCL y LCD infectados con *Leishmania mexicana*.

3.2.1. Objetivos Particulares

1. Estudiar la variabilidad genética (SNPs) de diversas moléculas involucradas en la respuesta inmune innata contra la infección por *Leishmania mexicana*.
2. Validar los datos obtenidos en el objetivo 1.
3. Analizar las diferencias en la expresión de genes de las vías de señalización de TLR-2 y JAK/STAT de células NK en estado basal y estimuladas con LPG entre pacientes con LCL y LCD.
4. Realizar estudios de identificación de proteínas expresadas en sueros de pacientes con ambas formas clínicas y sujetos sanos.

Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS



4.1. Consideraciones éticas

4.1.1. Pacientes y controles

Este estudio se desarrolló de acuerdo a los principios expresados en la Declaración de Helsinki. Fue aprobado por el Comité Institucional de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMED/CI/RGG/013/01/2008) y fueron estrictamente seguidos los lineamientos establecidos por las autoridades sanitarias mexicanas.

Todos los pacientes incluidos en este estudio firmaron un consentimiento informado para la recolección de muestras y posterior análisis. Se incluyeron diferente número de pacientes y controles para cada uno de los objetivos. Los pacientes provienen de la Región de "La Chontalpa", Tabasco y los controles de Cunduacán, Tabasco y de los bancos de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI y del Hospital General de México. Para los controles se utilizaron "buffy coats" de donadores de sangre sanos y para los casos se utilizó sangre periférica de pacientes con leishmaniasis cutánea. Los detalles para cada grupo de pacientes y controles se especifican en los resultados.

Los pacientes fueron diagnosticados clínicamente como LCL o LCD en la oficina de la Jurisdicción Sanitaria del Municipio de Cunduacán, Tabasco, mediante una tinción con Giemsa de un raspado de las lesiones y una prueba de hipersensibilidad cutánea de Montenegro. Además, el diagnóstico se confirmó en el Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM a través de una prueba de ELISA y/o una inmunohistoquímica contra *Leishmania mexicana*.



4.2. Purificación del Lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana*

Los promastigotes de *Leishmania mexicana* fueron cultivados en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado a 28 °C. Se hicieron pases a los parásitos cada 4 o 5 días, crecían con una densidad de 1×10^6 /mL y se cosecharon en la fase estacionaria de su crecimiento para la purificación del LPG. Los parásitos se centrifugaron a 350 x g por 10 min a 20 °C, la pastilla se lavó con PBS 1X 3 veces, finalmente los parásitos se resuspendieron en paraformaldehído al 0.2%, se colocaron en la cámara de Neubauer y cuando se inmovilizaron, se contaron. Para la purificación de LPG se cultivaron 10^{10} promastigotes y se siguió el protocolo descrito por McConville *et al.* (1987) [109], con algunas modificaciones. Después de los lavados, el sobrenadante se removió, la pastilla se resuspendió en PBS 1X y se incubó en una solución de cloroformo/metanol/agua (1:2:0.5, v/v) por 2 hr a TA. El material insoluble fue utilizado para la extracción de LPG utilizando 1-butanol al 9% en agua (2x 500 μ L), el sobrenadante se secó al vacío y la LPG fue purificada de esta fracción por cromatografía utilizando octil-sefarosa en HPLC usando un gradiente de 1-propanol (5–60%) en una solución de acetato de amonio 0.1 M. Para optimizar la pureza del LPG se utilizaron dos columnas de octil-sefarosa en vez de una. Se corroboró que la LPG fuera negativa a endotoxina realizando un ensayo con amebocitos lisados de *Limulus sp.* utilizando un amebocyte lysate assay (Sigma, E-Toxate Kit) y para descartar la contaminación por LPS se utilizó Polimixina B (5 μ g/mL). Se utilizó una muestra del LPG purificado para realizar un SDS-PAGE y se tiñó con plata para analizar si existía contaminación con proteínas, la prueba fue negativa.



4.3. Células: origen, cultivo e interacción.

4.3.1. Separación de células mononucleares a partir de sangre periférica humana

La sangre se diluyó 1:3 con PBS 1X, se homogenizó, se hizo un gradiente utilizando Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich, Hystopaque-1077 No. Cat. 10771) y se centrifugó a 805 x g por 20 min a 20°C. Del gradiente se separaron 40 mL de plasma y se guardó a TA hasta su uso. La interfase (células mononucleares) se recuperó en un tubo de 50 mL y se lavó con PBS 1X centrifugando a 453 x g por 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 1 mL de PBS 1X, se adicionaron 20 mL de solución lítica (NH₄Cl 0.15 M, KHCO₃ 7.8 mM, EDTA 0.12 mM, pH= 7.4), se incubó en hielo durante 10 min y se lavó con PBS 1X centrifugando a 453 x g por 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 5mL de PBS 1X y con esta solución se hizo un gradiente sobre los 40 mL de plasma que se habían separado. Se centrifugó a 129 x g por 10 min a 20°C, el sobrenadante se separó cuidadosamente con una pipeta y se desechó. La pastilla se resuspendió en 1 mL de PBS 1X, se paso a un tubo nuevo para lavar con 40 mL de PBS 1X y se centrifugó a 290 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó, la pastilla se resuspendió en 40 mL de PBS 1X y se contaron las células mononucleares en una cámara de Neubauer.

4.3.2. Purificación de monocitos

Las células mononucleares se incubaron con perlas magnéticas anti-CD14 (Miltengy Biotech No. Cat. 130050201) (1μL/1x10⁶ células) por 15 min a 4°C en oscuridad, se lavaron con PBS 1X centrifugando a 453 x g por 10 min a 4°C, el sobrenadante se decantó, la



pastilla se resuspendió en 1 mL de PBS 1X por cada 100×10^6 células marcadas y se purificaron utilizando una columna MACS LS (Miltenyi Biotec, No. Cat. 130-042-401). La fracción negativa se recuperó y guardó hasta su uso. La fracción positiva se recuperó (monocitos), se lavó con PBS 1X centrifugando a $453 \times g$ por 10 min a $4^\circ C$. El sobrenadante se desechó, las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Life Technologies, No. Cat. 31800-022) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) e inactivado a $28^\circ C$ y se contaron en la cámara de Neubauer.

4.3.3. Purificación de células NK

A partir de la fracción negativa de las células que se marcaron con anti-CD14, o bien de las células mononucleares, se purificaron células NK (Miltenyi Biotec, NK cell isolation kit No. Cat. 130092657) incubándolas con el anticuerpo 1 ($1 \mu L / 1 \times 10^6$ células) por 10 min a $4^\circ C$ en oscuridad y el anticuerpo 2 ($2 \mu L / 1 \times 10^6$ células) por 15 min bajo las mismas condiciones que el anticuerpo 1. Las células se lavaron con PBS 1X centrifugando a $453 \times g$ por 10 min a $4^\circ C$, el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 1 mL de PBS 1X por cada 100×10^6 células marcadas. Se siguió el mismo procedimiento que con la purificación de monocitos, solo que en este caso las células NK corresponden a la fracción negativa.

4.3.4. Ensayos de interacción

Las células mononucleares o purificadas (monocitos y NKs) se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado (10% de SFB inactivado, l-glutamina 2 mM, amortiguador HEPES 10 mM, penicilina $100 \mu g/mL$, gentamicina $160 \mu g/mL$, $NaHCO_3$ 17 mM), se dividieron en diferentes condiciones dependiendo, del experimento a realizar, en cajas de



poliestireno (Costar, Ultra Low Cluster, No. Cat. 3471 o 3473) y se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO₂ toda la noche hasta su uso.

Para la cuantificación de IL-1 β por el método de ELISA, después de reposar toda la noche, se recolectaron los sobrenadantes de los monocitos y se congelaron hasta su uso. Las células se recuperaron, se lavaron dos veces con PBS 1X, se centrifugaron a 425 x g por 10 min a 4 °C, la pastilla celular se resuspendió en TRIzol y se congeló a -70 °C hasta su uso.

Para la inmunocitoquímica de IL-1 β en células mononucleares, se dejaron reposar las células toda la noche y algunas células se estimularon por 18 hr con LPS (100 ng/ μ L) y otras se mantuvieron sin ningún estímulo. Las células se recuperaron, se lavaron dos veces con PBS 1X centrifugando a 425 x g por 10 min a 4 °C, la pastilla celular se resuspendió en 50 μ L de PBS 1X hasta su uso.

Para los ensayos de microarreglos, las células NK se dividieron en dos condiciones, una de ellas fue estimulada con LPG metacíclico de *L. mexicana* (20 μ g/mL) durante 6 hr mientras que la segunda condición se mantuvo durante el mismo tiempo de incubación sin estimulación alguna. Se recuperaron los sobrenadantes de ambas condiciones, se centrifugaron a 425 xg durante 10 min a 4 °C, los sobrenadantes se recuperaron y se guardaron a -70 °C y las células se lavaron 2 veces con PBS 1X. Se centrifugaron a 425 x g durante 10 min a 4 °C, la pastilla de células se resuspendió en TRIzol y se congeló a -70 °C hasta su uso.

4.3.5. Obtención de suero a partir de sangre periférica humana

Las muestras de sangre periférica humana se tomaron utilizando tubos Vacutainer para suero sin anticoagulante, se incubaron por dos horas a 37 °C, se centrifugaron a 576 x g por 10 min a 4 °C, se recuperó el suero, se diluyó 1:2 con glicerol (Sigma-Aldrich No. Cat. G6279) y se conservó a -20 °C hasta su uso.



4.4. Biología Molecular

4.4.1. Extracción de DNA genómico (TRIZOL)

Las células mononucleares se resuspendieron en 1 mL de TRIZOL (Invitrogen Ref. 15596-018) frío, se agitaron por 5 min vortex/hielo, se incubaron 5 min en hielo y se congelaron a -70°C hasta su uso.

Se descongelaron las muestras en hielo, se les adicionaron 200 μL de cloroformo (Sigma-Aldrich No. Cat. C-2432) frío, se agitaron hasta homogenizar y se incubaron por 3 min en hielo. Se centrifugaron a 13 000 x g por 15 min a 4°C , se desechó la fase acuosa (transparente) y a la fase blanca y rosa se le adicionaron 500 μL de etanol absoluto (Sigma-Aldrich No. Cat. E-7023) frío. Se mezcló por 30 seg en vortex, se centrifugó a 13 000 x g por 10 min a 4°C , se desechó el sobrenadante y al botón se le adicionó 1 mL de citrato de sodio 0.1 M disuelto en etanol al 10%. Se agitó por 30 min a TA, se centrifugó a 2 151 x g por 5 min a 4°C , se desechó el sobrenadante y se repitió dos veces más el lavado con citrato de sodio 0.1 M. Se desechó el sobrenadante, se agregaron 1.5 mL de etanol al 75%, se agitó por 20 min a TA, se centrifugó a 2 151 x g por 5 min a 4°C , se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla al vacío. La pastilla se resuspendió en agua DEPC 0.1% o amortiguador TE (TEK nova No. Cat. T0223) y se incubó por 15 min a 60°C . La cuantificación de las muestras de DNA se hizo utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop, ND-1000) en el programa ND-1000 v.3.2.1, para ver la integridad de las muestras se hicieron geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (AppliChem, No. Cat. A1152,0100) corriendolos por 45 min a 60 V y se visualizaron con un fotodocumentador (Kodak, Gel Logic 440 imaging system) en el programa KODAK1D36. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su uso.



4.4.2. Extracción de DNA genómico por adsorción a membrana en columna

Para la purificación se utilizó el QIAmp blood Maxi kit (QUIAGEN, No. Cat. 51194). En un tubo cónico de 50 mL se pipetearon 500 μ L de proteasa y se transfirió el buffy coat al mismo tubo hasta ajustar a 5 mL (en caso de faltar volumen se ajustó a 5 mL con PBS 1X). Se añadieron 6 mL de amortiguador AL, se mezcló vigorosamente por inversión durante 30 segundos y con vortex durante 1 min. Se incubó a 70 °C por 10 min, se añadieron 5 mL de etanol absoluto, se mezcló por inversión 30 seg y en vortex por 15 seg. La mezcla anterior se transfirió cuidadosamente a una columna QIAmp Maxi tratando de no humedecer el contorno superior de la columna, se centrifugó a 1690 x g por 3 min a 4 °C, se retiró la columna, se desechó el sobrenadante, se limpió la boca del tubo con una kimwipe y se colocó de nuevo la columna. Se añadieron cuidadosamente a la columna 5 mL de amortiguador AW1, se centrifugó a 4696 x g por 1 min a 4 °C, se añadieron 5 mL de amortiguador AW2, se centrifugó a 4696 x g por 15 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y la columna se transfirió a un tubo nuevo de 50 mL. Se añadieron 0.4 mL de amortiguador TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 0.5 mM, pH= 9) sobre la membrana de la columna, se incubó por 5 min a TA, se centrifugó a 4696 x g por 5 min a 4 °C, se adicionaron nuevamente 0.4 mL de amortiguador TE sobre la membrana de la columna, repitiendo el centrifugado, se recuperó el sobrenadante (DNA) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4.4.3. Purificación de RNA total (TRIzol)

Las células se resuspendieron en 1 mL de TRIzol utilizando 2×10^6 células NK, se agitaron por 5 min vortex/hielo, se incubaron 5 min y se congelaron a -70 °C hasta su uso.

Se descongelaron las muestras en hielo, se les adicionaron 200 μ L de cloroformo frío,



se agitaron hasta homogenizar y se incubaron por 3 min en hielo. Se centrifugaron a 10 294 x g por 15 min a 4 °C, se separó la fase acuosa (transparente) en un tubo nuevo, se le adicionaron 500 μ L de isopropanol frío (Sigma-Aldrich No. Cat. I-9516) y se agitó en vortex. Las muestras se dejaron precipitar toda la noche a -20 °C, se centrifugaron a 10 294 x g por 10 min a 4 °C, se removió el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol diluido al 75 % con agua DEPC 0.1 %, se centrifugó a 10 294 x g por 10 min a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se repitió el paso anterior con etanol absoluto, de nuevo se removió el sobrenadante, se dejó secar el etanol y la pastilla se resuspendió en agua libre de RNases (Quiagen Mat. No. 1017979). La cuantificación de RNA y la integridad de las muestras se realizó como ya se describió para las muestras de DNA. Las muestras se congelaron a -70 °C hasta su uso.

4.4.4. Procesamiento de muestras para el microarreglo Human Gene 1.0 ST de Affymetrix

Las muestras de RNA que se seleccionaron para el procesamiento de microarreglos se descongelaron, se tomó 1 μ L y se analizó la pureza de cada una en un Bioanalizador siguiendo las instrucciones del proveedor (Agilent Technologies, 2100 Bioanalyzer) observando un electroferograma con dos picos bien definidos en 18S y 28S. Para realizar los microarreglos se utilizaron muestras con un RIN mayor a 7 [110] y una concentración mínima de 30 ng/ μ L. Las muestras que no cubrían estas características se reprecipitaron y se repitió el análisis de pureza.

Las muestras de RNA con la calidad adecuada se procesaron de acuerdo al protocolo WT sense target manual del fabricante de microarreglos Affymetrix, Inc. A partir de una muestra con un contenido de 150 ng de RNA se realizó la síntesis de la primera hebra de DNA



complementario utilizando la transcriptasa reversa Superscript II y los primers (hexámeros al azar) que incorporaron la secuencia del promotor de T7. La síntesis de la segunda hebra complementaria de cDNA se generó a partir del producto de la reacción anterior utilizando una DNA polimerasa. El DNA de doble cadena se utilizó para generar una hebra de cRNA mediante una reacción de transcripción *in vitro* donde se obtuvieron múltiples copias de RNA en antisentido. Este RNA se usó como templado para una nueva síntesis de cDNA mediante una reacción de transcripción donde, a diferencia de la primera se incorporaron dUTPs, de nuevo se utilizaron primers con el promotor de T7 y la Superscript II transferasa. La cadena de cDNA generada se trató con uracil DNA glicosilasa y apurina pirimidin endonucleasa I (APEI) que reconoció específicamente los dUTPs presentes en la hebra generando fragmentos de 40 a 70 nucleótidos, los cuales se marcaron utilizando el kit de marcaje patentado por Affymetrix. El DNA marcado se hibridó a los microarreglos, se incubaron por 18 hr a 45 °C, se lavaron con un amortiguador de baja astringencia, enseguida con uno de alta astringencia y se tiñeron con anticuerpo anti estreptavidina marcado con fluorescencia. Los microarreglos se leyeron en un escáner de alta resolución y el análisis de calidad se realizó utilizando el programa Expression Console de Affymetrix.

4.4.5. Reprecipitación de RNA

Se midió el volumen de RNA que se tenía, se le agregó una décima parte de este volumen de acetato de sodio 3 M pH= 5.2 y 3 veces un volumen de isopropanol, se dejó incubar a -20 °C toda la noche y se centrifugó a 20 817 x g por 15 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante, se agregaron de entre 100 a 500 μ L (dependiendo el tamaño de la pastilla) de etanol al 75 % y se centrifugó a 20 817 x g por 15 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se dejó evaporar el exceso de etanol. La pastilla se resuspendió en agua libre de RNAsas, se cuantificó, se



verificó la integridad como ya se describió y se congelaron las muestras a -70°C hasta su uso.

4.4.6. PCR en tiempo real

El RNA total fue retrotranscrito utilizando el High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, No. Cat. 4387406). Se mezclaron $10\ \mu\text{L}$ de amortiguador RT, $1\ \mu\text{L}$ de mezcla de enzima, “x” μL de RNA y se ajustó a $20\ \mu\text{L}$ con agua libre de nucleasas. La mezcla se agitó en vortex por 10 seg, se dió un pulso en una microcentrífuga hasta eliminar las burbujas y se hizo la RT en un termociclador incubando la reacción a 37°C por 60 min y a 95°C por 5 min. El cDNA se mantuvo a -70°C hasta su uso.

Para la PCR en Tiempo Real se utilizaron sondas TaqMan (Applied Biosystems, Gene Expression Assays), usando el equipo ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystem) y el programa SDSv.2.3 para la extracción de los datos. Las curvas de validación se realizaron utilizando la misma muestra de cDNA para todas las sondas haciendo una dilución 1:2 partiendo de una concentración de 20 ng y llegando a una de 0.625 ng, se aforaron a $9\ \mu\text{L}$ con agua libre de RNases, se incorporaron a la mezcla de reacción ($10\ \mu\text{L}$ de master mix, $1\ \mu\text{L}$ de la sonda de interés) en una placa de 96 pozos, se selló, se mezcló y se centrifugó a $1690\ \times\ \text{g}$ por 2 min. El perfil de incubación para la PCR fue el siguiente: a 50°C por 2 min, 95°C por 10 min y 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C durante 1 min. Todas las amplificaciones se realizaron monoplex, por duplicado, y se obtuvo la eficiencia de cada una de las sondas.



4.5. Genotipificación

La presencia de los SNPs fue analizada haciendo ensayos de discriminación alélica utilizando sondas TaqMan marcadas con fluoróforos VIC y FAM (Applied Biosystems). Las muestras de DNA se ajustaron con agua libre de RNases o amortiguador TE a $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se colocaron $10 \mu\text{L}$ de cada muestra en placas de 96 pozos (Applied Biosystems, MicroAmp Optical, No. Cat. 4306740) dejándolas secar a TA cubiertas del polvo hasta su uso.

Se hizo la mezcla de reacción tomando para cada muestra $2.5 \mu\text{L}$ de Universal PCR master Mix 2x (Applied Biosystems, No. Cat. 4304437), $0.25 \mu\text{L}$ de la sonda de interés y $2.25 \mu\text{L}$ de agua grado biología molecular, se dispensó en el pozo correspondiente en la placa con el DNA seco y se mezcló por pipeteo por 15 seg. La placa se selló con una cubierta óptica (Applied Biosystems, Optical adhesive film kit, No. Cat. 4313663), se centrifugó a $1690 \times g$ por 2 min y se realizó una PCR en punto final utilizando un equipo 7900 HT Real Time PCR System con el programa SDS v2.2.2 seleccionando la aplicación cuantificación absoluta y siguiendo el programa para sondas TaqMan que incluyeron un paso a 50°C durante 2 minutos, una etapa de activación de la polimerasa a 95°C durante 10 min seguido por 40 ciclos a 95°C durante 15 seg y 60°C durante 1 min. Al finalizar el termociclado se hizo una lectura de punto final en el mismo equipo y programa utilizando la aplicación para discriminación alélica. Los criterios para tomar en cuenta los resultados para un posterior análisis fueron una amplificación del 90% de todos los SNP por muestra.



4.6. Proteómica

4.6.1. Precipitación de proteínas séricas con TCA 77 %/acetona

Se utilizaron 100 μ L de suero y se adicionaron 800 μ L de agua desionizada estéril y 100 μ L de TCA frío al 77 % (disuelto en acetona), se mezcló lentamente por inversión y luego en vortex por 30 seg. La muestra se incubó 12 hr a -20°C , se centrifugó a 15 000 x g por 15 min a 4°C , se desechó el sobrenadante, se agregaron 400 μ L de acetona fría y se mezcló con vortex hasta disolver la pastilla o bien hasta que se despegara del fondo del tubo, se centrifugó a 15,000 x g por 15 min a 4°C y se lavó dos veces más con acetona como se describió. La pastilla se secó en un concentrador a TA y la muestra se resuspendió en amortiguador RIPA modificado (Tris-base, pH 7.4 10mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 MM, NaF 10mM, NP-40 1 %, PMSF 1 MM, Aprotinina 10 μ g/mL, Leupeptina 1 μ g/mL, Na₃VO₄ pH= 10 10mM, DTT 1 MM) cuando los extractos se utilizaban para geles 1D y en amortiguador de rehidratación (urea 7M, thiourea 2M, CHAPS 2 %, amortiguador IPG 2 % (w/v), azul de bromofenol 0.002 %, DTT 40mM) cuando las muestras se utilizaban para el corrimiento de geles bidimensionales (2D). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.6.2. Cuantificación de proteínas por el método DC de BIORAD compatible con detergentes

Para la determinación de proteínas disueltas en amortiguador RIPA modificado se utilizó el método compatible con detergentes (Bio-Rad DC protein assay, No. Cat. 500-0113, 500-0114 y 500-115) y los datos fueron extrapolados en una curva estandar de BSA que iba de 1 a 15 μ g. Como blanco se utilizó el amortiguador RIPA que fue utilizado para diluir



las muestras y se determinó proteína con 3 μL de muestra. Cada una de las condiciones se realizó por duplicado en una placa de 96 pozos. A la curva standard y las muestras se les adicionaron 25 μL de reactivo A', 200 μL de reactivo B, se homogenizaron por pipeteo, se eliminaron las burbujas, la placa se dejó reposar por 15 min y se leyó en un espectrofotómetro (BIO-TEK) a 650 nm utilizando el programa KC4 v3.4.

4.6.3. Western-blot (Wb)

Para el análisis de proteínas por Wb se utilizaron geles de acrilamida-bis-acrilamida (AM-RESCO, No. Cat. 0341 y 0172) al 15 %. Las muestras se ajustaron a 120 μg de proteína, se les agregó amortiguador Laemmli 2x (Tris HCl pH= 6.8 0.5 M, SDS 10%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, pironina Y 0.004%, azul de bromofenol 0.004%), se hirvieron por 3 min a 95 °C y se corrieron en los geles a 60 V por 30 min y a 100 V hasta terminar la corrida. La transferencia de los geles se realizó en membranas de PVDF-Immobilon de 0.45 μm (Millipore No. Cat. IPVH00010) activadas previamente con metanol durante 1 min. Los geles se incubaron en amortiguador de transferencia durante 10 min (Tris HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) y posteriormente se realizó la transferencia en un equipo transblot semi-seco (Bio-Rad) durante 15 min a 25 V. Las membranas transferidas se incubaron durante 5 min en TBST (Tris HCl pH= 7.4 100 mM, NaCl 1.5 M, Tween 20 0.05%), se tiñeron con solución de rojo de Ponceau S (Sigma No. Cat. P7170) para verificar que las proteínas se hayan transferido y se lavaron con TBST hasta desteñir las membranas. Los sitios inespecíficos se bloquearon con leche al 5% en TBST durante 1 hora en agitación constante a TA, se lavaron 4 veces con TBST. Se colocó el anticuerpo anti-IL-1 β (Cell Signaling Technology, No. Cat. 2021S) específico para la forma activa de la proteína, a una dilución 1:1000 en BSA al 5% en TBST durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente



se retiró el anticuerpo y se lavaron las membranas con TBST. Se agregó un segundo anticuerpo (anti-conejo) conjugado con peroxidasa (Cell Signaling Technology, Anti-rabbit HRP-linked, No. Cat. 7074S) a una dilución 1:3000 con 5% de leche en TBST durante 1 hr a temperatura ambiente. Se retiró el anticuerpo y las membranas se lavaron durante 2 horas con TBST. Las membranas se incubaron por 3 min con Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore Corporation, No. Cat. WbLUF0100) y se revelaron por quimioluminiscencia utilizando placas Kodak (Kodak Professional, Developer HC-110, No. Cat. 140-8988). El análisis densitométrico se realizó mediante el registro de la intensidad de las bandas con un analizador MultiImage (Alpha INNOTECH Corporation) basado en el porcentaje del valor de la integridad de densidad (IDV).

4.6.4. Cuantificación de proteínas séricas utilizando el 2-D Quant Kit

Las muestras de suero fueron reprecipitadas con TCA 77%/acetona, las pastillas se resuspendieron en amortiguador de rehidratación y se incubaron por toda la noche a -20°C . Para la determinación de proteína se utilizó un método basado en la reprecipitación de proteínas (Amersham Biosciences, 2-D Quant Kit, No. Cat. 80-6483-53) utilizando tubos de 2 mL. Los datos fueron extrapolados en una curva estándar de BSA de 1 a 50 μg y como blanco se utilizó agua. Se determinó proteína con 5 μL de muestra y cada una de las condiciones se analizó por duplicado. A la curva estándar y las muestras se les adicionaron 500 μL de precipitante, se agitaron en vortex y se incubaron 3 min a TA. A cada una de las muestras se adicionaron 500 μL de co-precipitante, se agitaron en vortex, se centrifugaron a 10 000 x g por 5 min, se desechó el sobrenadante cuidadosamente y los tubos se secaron al vacío. A las pastillas se les adicionaron 100 μL de solución de cobre, 400 μL de agua destilada y se agitaron en vortex hasta disolver el precipitado. Se les adicionó 1 mL de reactivo de color,



se incubaron por 20 min a TA y se leyeron en celdas de plástico en un espectrofotómetro a 480 nm.

4.6.5. Geles bidimensionales (2D)

Las muestras de suero se ajustaron a la misma concentración (1.5 mg) en un volumen final de 445.5 μ L con amortiguador de rehidratación más 4.5 μ L de anfolitas pH 4-7 y con esta solución se rehidrataron tiras pH 4-7 de 24 cm (GE, Healthcare, Immobiline Drytrip Gels) durante toda la noche a TA cubiertas con aceite mineral. El isoelectroenfoco se hizo en un equipo Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System (GE, Healthcare) a 0.8-60 kVh por 9.5 hr y se guardaron a -70 °C hasta su uso. Las tiras se descongelaron a TA y se incubaron en amortiguador de equilibrio reductor-DTT (urea 6M, Tris-base 75 mM pH 8.8, glicerol 29.3 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0.002 %, DTT 10mg/mL) durante 15 min a TA en agitación contante, se decantó el sobrenadante y se incubaron con amortiguador de equilibrio alquilante utilizando Iodacetamida (GE Healthcare, No. Cat. RPN6302) a 25mg/mL bajo las condiciones anteriores. Para la segunda dimensión se utilizaron geles SDS-PAGE que se corrieron en un sistema de electroforesis vertical con geles de poliacrilamida al 12 % de 25 cm x 20 cm, se corrieron a 30 V durante 6 hr, 50 V 16 hr y 70 V hasta terminar el corrimiento. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie brillante R-250 (Bio-Rad, Bio-Safe Commassie Stain) (etanol absoluto 50 %, ácido acético glacial 10 %, azul de Coomassie 2 %, agua desionizada 40 %) por 1.5 hr, se lavaron 2 veces con agua destilada, se destiñeron haciendo dos lavados con solución desteñidora (metanol 40 %, ácido acético glacial 10 %, agua desionizada 50 %) durante 60 min y se mantuvieron en ácido acético al 10 % hasta su uso. Se hicieron 3 replicas técnicas de cada grupo a comparar.



4.6.6. Adquisición de imágenes y análisis de datos para geles 2D

Se obtuvo una imagen digital de los geles teñidos utilizando un escaneo densitométrico (Amersham Biosciences Corporation, Image Digital) y se analizaron con el programa Image Master 2D Platinum vs 7.0 (GE Healthcare).

4.6.7. Digestión de proteínas a partir de geles 2D

Para la identificación de las proteínas de interés, las manchas del gel se cortaron con puntas para micropipeta nuevas y estériles (1-2 mm³) y la muestra se fragmentó en pequeños pedazos con una navaja de bisturí sobre un vidrio limpió y con un poco de agua desionizada esteril para evitar que se deshidrata el gel, se colocaron en tubos de 1.5 mL y se removió el exceso de líquidos. Se agregaron 500 µL de una solución de acetonitrilo 50%-NH₄HCO₃ 50 mM, se incubó durante 5 min a 50 °C, se mezcló en vortex 10 seg, se dio un pulso en una microcentrífuga, se eliminó el sobrenadante y se repitió el procedimiento hasta que el gel estuviera libre de azul de coomassie. Se agregaron 100 µL de acetonitrilo 100%, se incubó durante 5 min a TA, se dio un pulso en la microcentrífuga, se eliminó el sobrenadante y las piezas del gel se dejaron secar a TA. Se añadieron 15 µL (o bien, un volumen suficiente para cubrir las piezas de gel) de solución de tripsina (25ng/µL, Promega), se incubaron durante 15 min a TA mezclando ocasionalmente en vortex, se dio un pulso en la microcentrífuga, se removió el excedente de solución y se añadieron 20 µL (o bien, un volumen suficiente para cubrir el gel hidratado) de NH₄HCO₃ 50mM. Se dio un pulso en la microcentrífuga y se incubó durante 12 hr a 37 °C. Se añadieron 20 µL NH₄HCO₃ 50mM, se incubó la muestra durante 10 min a TA mezclando ocasionalmente en vortex, se dio un pulso por 30 seg en una microcentrífuga y se transferió el sobrenadante a un tubo nuevo de 0.5 mL (SN1). A las piezas de gel se les adicionaron 20 µL de solución de



extracción (acetonitrilo 50%-ácido fórmico 5%), se incubaron durante 10 min a TA mezclando ocasionalmente en vortex, se dio un pulso por 30 seg en una microcentrífuga, el sobrenadante se transfirió al tubo SN1 y se repitió dos veces más el proceso de incubación con solución de extracción. El sobrenadante (proteínas digeridas) de los pasos anteriores se centrifugó al vacío a TA hasta reducir su volumen a 15 μ L. Las proteínas digeridas se concentraron/desalaron usando una extracción en fase sólida con puntas Zip Tips-C18 (Millipore Corporation) comenzando por lavar la Zip Tip 3 veces con 10 μ L de acetonitrilo 100% cada vez, posteriormente se lavó con solución de equilibrio (TFA 0.1%) 3 veces. El sobrenadante con las proteínas digeridas se pasó por la punta Zip Tip 20 veces, la punta se lavó 3 veces con solución de equilibrio y los péptidos pegados a la punta Zip Tip se eluyeron en un tubo nuevo que contenía 10 μ L de amortiguador de elusión (acetonitrilo 50%-TFA 0.1%).

4.6.8. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Los péptidos se analizaron usando un espectrómetro de masas 4800 Plus MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems). Los espectros masa/masa (MS/MS) fueron analizados utilizando el algoritmo Paragon (Programa Protein Pilot, Applied Biosystems) comparándolo con la base de datos de UniProt y Swiss-prot para la especie humano. Los parámetros de búsqueda se ajustaron para alquilación en cisteína con iodacetamida. Se utilizó un intervalo de confianza $\geq 99\%$ para la identificación de las proteínas (Unused ProtScore ≥ 2.0).



4.7. ELISA

La producción de IL-1 β en monocitos no estimulados fue analizada utilizando los sobrenadantes libres de células. Se siguió el protocolo descrito en el Human IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, No. Cat. 88-7010) utilizando una placa de 96 pozos (Costar, Corning, Microtiter plates, No. Cat. 9018) incubada con el anticuerpo de captura para IL-1 β a 4 °C durante toda la noche. La placa se lavó 5 veces con un amortiguador de lavado (PBS 1X, Tween-20 0.05 %), se bloqueó con una solución diluyente por 1hr a TA y se lavó de nuevo. La curva estandar (diluciones seriadas de 3.9 a 500 pg/mL) y 100 μ L de cada una de las muestras (duplicados) fueron incubadas a 4 °C durante toda la noche y se lavó de nuevo. Se incubó el anticuerpo de detección por 1 hr a TA, se lavó 5 veces la placa y se adicionó la avidina-HRP por 30 min a TA. Se lavó 7 veces la placa y se adicionó la solución sustrato durante 15 min a TA y enseguida se adicionaron 50 μ L de la solución que detenía la reacción (H₃PO₄ 1 M). La placa se leyó en un espectrofotómetro μ Quant (Bio-Tek) a 450 nm utilizando el programa KC4 v3.4 para el análisis de las muestras.



4.8. Inmunocitoquímica (ICQ) e Inmunohistoquímica (IHQ)

4.8.1. Biopsias

Las biopsias de cada individuo se obtuvieron de piel, en el caso de los controles del antebrazo y la espalda y para el caso de los pacientes del lugar donde se encontraba la lesión (brazo, antebrazo, espalda, cara, pierna o pantorrilla). Las biopsias se obtuvieron de lesiones activas de entre 1 y 2 cm de diámetro utilizando sacabocados (biopsy punches) de 4 a 6 mm (Stiefel Laboratories). Las muestras obtenidas se dividieron en dos grupos para su almacenamiento, el primer grupo se incluyó en compuesto O.C.T. y se congeló a -70°C hasta su uso. El otro grupo de biopsias se incubaron en formalina por 12 hr, se enjuagaron 3 veces con agua destilada y se sumergieron en alcoholes al 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96 y al 100% por 60 min en agitación constante comenzando por el alcohol al 10% y en gradación creciente. Posteriormente, los tejidos se incubaron en xileno por 10 min y enseguida que embebieron en parafina líquida incubándolos por 60 min a 60°C , pasado este tiempo se repitió el paso anterior utilizando parafina nueva. Los tejidos se montaron y se dejaron secar a TA (TA) para posteriormente desmontar y guardar a TA cubiertos del polvo hasta su uso.

4.8.2. Inmunocitoquímica en células mononucleares

Antes de analizar la expresión de IL- 1β y el número de parásitos en tejidos, se verificó que no hubiera reacción cruzada del anticuerpo anti-IL- 1β con parásitos de *Leishmania mexicana* y para analizar la expresión IL- 1β se utilizaron células mononucleares no estimuladas y estimuladas con LPS (100 ng/mL) por 18 hr haciendo una inmunocitoquímica.

Las células mononucleares resuspendidas en 50 μL de PBS 1X en estado basal y estimula-



das con LPS se montaron sobre portaobjetos cargados positivamente (Shandon Microscope Slides, Superfrost Plus, Thermo, Ref. 6776214) y se dejaron secar a TA por 20 min. Se fijaron en acetona anhidra PA fría (J. T. Baker) por 10 min, se dejaron secar por 1 min a TA, se lavaron en Tris-base 0.01 M, NaCl 0.15 M pH= 7.4 y se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena (Peroxo-Block, Invitrogen. No. Cat. 00-2015) por 30 seg, se lavó 2 veces incubando 5 min en PBS 1X pH= 7.3 (NaH₂PO₄·2H₂O 0.03 M, Na₂HPO₄ 0.12 M, NaCl 1.84 M) a TA, se bloquearon los sitios inespecíficos (Protein Block Solution, Abcam, Cambridge, UK) durante 10 min a TA en cámara húmeda (CH), se retiró la solución y se incubaron por 60 min a TA en CH con anti-IL-1 β (1:100, ab8320) diluido en PBS 1X. Todas las laminillas se lavaron 3 veces con PBS 1X y se continuó el procedimiento utilizando el EXPOSE mouse and rabbit specific HRP/AEC detection IHC kit (Abcam No. Cat. ab94705) comenzando por incubar las laminillas con el Enhancer Reagent por 10 min a TA en CH. La solución se retiró y se incubó el anticuerpo secundario por 30 min en CH. Las laminillas se lavaron 4 veces con PBS 1X, la reacción se reveló con AEC Single Solution observando al microscopio el revelado y la reacción se paró enjuagando con agua destilada 2 veces. Las células se contratiñeron con hematoxilina de Mayer (Bio Genex Ref. HK 100-9K) por 30 seg, se enjuagaron dos veces con agua corriente y se montaron en medio Aqua Mounter (Bio science Cat. BSB0091). Se fotografiaron 3 campos de cada una de las laminillas con el objetivo 40x y 3 campos con el objetivo 63x utilizando un microscopio de luz y una cámara a color AxioCam MRc5 (Zeiss, Alemania).

4.8.3. Inmunohistoquímica en tejidos congelados

De biopsias congeladas se hicieron cortes seriados de 3-4 μ m utilizando un criostato (Miccrom HM 505N), se montaron sobre portaobjetos cargados positivamente (Shandon Mi-



crosscope Slides, Superfrost Plus, Thermo, Ref. 6776214) y se dejaron secar a TA por 10 min. Los cortes se fijaron en acetona anhidra PA fría (J. T. Baker) por 10 min, se dejaron secar por 1 min a TA y se rehidrataron en Tris-base 0.01 M, NaCl 0.15 M pH= 7.4. Se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena (Peroxo-Block, Invitrogen. No. Cat. 00-2015) por 30 seg, se lavó 2 veces incubando 5 min en PBS 1X pH= 7.3 (NaH₂PO₄.2H₂O 0.03 M, Na₂HPO₄ 0.12 M, NaCl 1.84 M) a TA, se bloquearon los sitios inespecíficos (Protein Block Solution, Abcam, Cambridge, UK) durante 10 min a TA en cámara húmeda (CH), se retiró la solución y los cortes se incubaron por 60 min a TA en CH con anti-IL-1 β (1:100, ab8320) o suero inmune de ratón anti-*Leishmania mexicana* (1:100) diluidos en PBS 1X. Todas las laminillas se lavaron 3 veces con PBS 1X y se continuó el procedimiento utilizando el EXPOSE mouse and rabbit specific HRP/AEC detection IHC kit (Abcam No. Cat. ab94705) comenzando por incubar los cortes con el Enhancer Reagent por 10 min a TA en CH, la solución se retiró y se incubó el anticuerpo secundario por 30 min en CH. Las laminillas se lavaron 4 veces con PBS 1X, los cortes se revelaron con AEC Single Solution observando al microscopio el revelado y la reacción se paró enjuagando con agua destilada 2 veces. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina de Mayer (Bio Genex Ref. HK 100-9K) por 30 seg, se enjuagaron dos veces con agua corriente y se montaron en medio Aqua Mounter (Bio science Cat. BSB0091). Se fotografiaron 7 campos de cada una de las laminillas con el objetivo 40x que correspondían a un área de 1 mm² y 5 campos con el objetivo 63x utilizando un microscopio de luz y una cámara a color AxioCam MRc5 (Zeiss, Alemania).



4.8.4. Inmunohistoquímica en tejidos parafinados

Se hicieron cortes seriados de 4-6 μm los cuales se montaron sobre portaobjetos cargados positivamente y se dejaron secar a TA. Se incubaron por 30 min a 60°C, se sumergieron en xilol por 10 min a 60°C, en etanol absoluto por 5 min, en etanol al 96% por 5 min y se dejaron en agua destilada hasta su uso. Los cortes se hirvieron en solución Retrieval pH= 9 (Dako, No. Ref. S2367) por 10 min a 96°C, se dejaron enfriar a TA y se lavaron 3 veces con solución de lavado (Tris HCl 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH= 7.4). La actividad de peroxidasa endógena se inhibió utilizando metanol/peróxido de hidrógeno al 3% (J. T. Baker, No. Cat. 2186-01 y No. Cat. 9070-03) por 15 min a TA en CH, las laminillas se lavaron 3 veces y enseguida los cortes se incubaron con suero anti-Leishmania (1:100) diluido en PBS 1X por 30 min a TA en CH. Las laminillas se lavaron 3 veces, se incubó el anticuerpo secundario (1:50) diluido en PBS 1X (Biotin goat a-mouse, Zymed, No. Cat. 62-6540) por 30 min a temperatura ambiente en CH, se enjuagaron 3 veces y se incubaron con el complejo AB/HRP (Dako Cytomation No. Cat. K0353) por 30 min a TA en CH. Se enjuagaron con Tris HCl pH= 7.6 0.1 M, se revelaron con AEC Single Solution observando al microscopio el revelado y la reacción se paró enjuagando con agua destilada 2 veces. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina de Mayer (Bio Genex Ref. HK 100-9K) por 30 seg, se enjuagaron dos veces con agua corriente y se montaron en medio Aqua Mounter (Bio science Cat. BSB0091). Se fotografiaron 7 campos de cada una de las laminillas con el objetivo 40x que correspondían a un área de 1 mm² y 5 campos con el objetivo 63x utilizando un microscopio de luz y una cámara a color AxioCam MRc5 (Zeiss, Alemania).



4.9. Análisis estadístico

4.9.1. Análisis de los SNPs

Para la determinación de genotipos el análisis estadístico se realizó con el programa Universal R. Se hicieron tablas de contingencia para cada SNP y la significancia estadística de estos se evaluó calculando la X^2 con p-value de $p \leq 0.05$ y también se calcularon los intervalos de confianza de Woolf y Newcombe [111]. Solo para los resultados estadísticamente significativos se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas. El equilibrio Hardy Weinberg se calculó en el grupo de sujetos control, en el grupo de casos (incluyendo LCL y LCD) y con casos más controles (considerandolos una sola población) calculando la X^2 de Pearson. Las frecuencias genotípicas fueron comparadas entre casos y controles. Los OR (Odds Ratio) de homocigotos, heterocigotos y serológicos se calcularon tomando como grupo de referencia los dos grupos de homocigotos.

4.9.2. Análisis de inmunohistoquímica, Western-blot y ELISA

El análisis estadístico de los datos de número de parásitos, Western-blot y la prueba de ELISA se realizó mediante la prueba de Mann Whitney y fue considerado estadísticamente significativo cuando había una $p \leq 0.05$. Estos análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Prism 5 (GraphPad Program).

4.9.3. Análisis de los datos de microarreglos

El análisis se realizó con el programa estadístico R versión 2.14.1 (<http://cran.r-project.org/bin/macosx/>) y Bioconductor utilizando las librerías de Affy y limma. El pre-procesamiento de los datos se llevo a cabo con el algoritmo estándar de RMA (Robust Multiarray Average) [112]. A



los datos se les aplicó corrección de fondo y al conjunto de datos completo se le aplicó la normalización por cuantiles [113] para asegurar que las intensidades tenían la misma distribución a lo largo de todos los microarreglos sujetos al proceso de normalización.

El análisis de enriquecimiento para cada una de las listas de los estados analizados se hizo en DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) seleccionando las siguientes bases de datos: Gene Ontology (componentes celulares, funciones moleculares y procesos biológicos), Anotaciones generales (Chromosome, Entrez gene, official gene symbol), Literatura (PubMed), Vías de señalización (KEGG, Reactome), Dominios de proteínas (Interpro, Smart) e Interacción de proteínas (Reactome).

Capítulo 5

RESULTADOS



5.1. Análisis de SNPs

Se analizaron 12 SNPs en 9 genes (Cuadro 5.1) relacionados con la activación de la respuesta inmune a infecciones por microorganismos y descritos como SNPs de susceptibilidad. Un total de 58 muestras de DNA de pacientes con LCL, 6 de pacientes LCD y de 123 muestras de sujetos sanos fueron utilizadas.

Cuadro 5.1: Lista de SNPs analizados en células mononucleares de pacientes con LCL, con LCD y sujetos sanos.

Gen	SNP	Alelos	ID rs
CD14	260	G/A	rs2569190
IL-10	-819	C/T	rs1800871
IL-10	-592	C/A	rs1800872
IL-10	-1082	A/G	rs1800896
IL-1R α	2018	T/C	rs419598
IL-6	-174	G/C	rs1800795
IL-8	-251	A/T	rs4073
IL-1 β	-511	A/G	rs16944
IRAK-1	532	C/T	rs1059703
TLR-4	299	C/T	rs4986791
TNF- α	-308	G/A	rs1800629
TNF- α	-238	G/A	rs361525



5.1.1. Tablas de Contingencia

Para cada uno de los genes analizados los resultados obtenidos fueron organizados en tablas de contingencia y la comparación entre grupos se hizo entre las frecuencias genotípicas de los heterocigotos, homocigotos y serológicos, tomando como grupo de referencia el alelo mayor y alelo menor donde se calcularon los intervalos de confianza de Woolf, los OR, la χ^2 y se obtuvo el p-value (Cuadro 5.2 y 5.3).



Cuadro 5.2: Tablas de contingencia y estadísticos obtenidos para los SNPs: CD14 260, IL-1Ra 2018, IL-8 -251, IL-10 -819, IRAK-1 532 y TLR-4 299.

TABLAS DE CONTINGENCIA					ESTADÍSTICOS						
	Homocigoto Mayor	Heterocigotos	Homocigoto Menor	Total		Grupo de referencia	OR	Lim. Inf (Woolf)	Lim. Sup. (Woolf)	X2	p-value
CD14 260											
	G		A		Heterocigoto	Alelo Mayor	1.20	0.51	2.80	0.17	0.68
Casos	10	29	19	58	Homocigoto	Alelo Mayor	1.45	0.58	3.65	0.64	0.43
Controles	26	63	34	123	Serológico	Alelo Mayor	1.29	0.57	2.88	0.38	0.54
Totales	36	92	53	181	Heterocigoto	Alelo menor	0.82	0.40	1.68	0.28	0.59
					Homocigoto	Alelo menor	0.69	0.27	1.73	0.64	0.43
					Serológico	Alelo menor	0.78	0.40	1.54	0.50	0.48
IL-1Ra 2018											
	T		C		Heterocigoto	Alelo Mayor	0.75	0.22	2.52	0.22	0.64
Casos	5	20	33	58	Homocigoto	Alelo Mayor	0.89	0.28	2.86	0.04	0.84
Controles	9	48	67	124	Serológico	Alelo Mayor	0.83	0.27	2.60	0.10	0.75
Totales	14	68	100	182	Heterocigoto	Alelo menor	0.85	0.43	1.65	0.24	0.62
					Homocigoto	Alelo menor	1.13	0.35	3.63	0.04	0.84
					Serológico	Alelo menor	0.89	0.48	1.67	0.13	0.72
IL-8 -251											
	A		T		Heterocigoto	Alelo Mayor	1.52	0.76	3.04	1.40	0.24
Casos	22	27	7	56	Homocigoto	Alelo Mayor	0.97	0.35	2.68	0.00	0.96
Controles	52	42	17	111	Serológico	Alelo Mayor	1.36	0.71	2.62	0.86	0.35
Totales	74	69	24	167	Heterocigoto	Alelo menor	1.56	0.57	4.26	0.76	0.38
					Homocigoto	Alelo menor	1.03	0.37	2.83	0.00	0.96
					Serológico	Alelo menor	1.27	0.49	3.26	0.24	0.62
IL-10 -819											
	C		T		Heterocigoto	Alelo Mayor	1.62	0.65	4.02	1.08	0.30
Casos	8	30	20	58	Homocigoto	Alelo Mayor	1.52	0.58	3.98	0.75	0.39
Controles	25	58	41	124	Serológico	Alelo Mayor	1.58	0.66	3.75	1.08	0.30
Totales	33	88	61	182	Heterocigoto	Alelo menor	1.06	0.53	2.12	0.03	0.87
					Homocigoto	Alelo menor	0.66	0.25	1.71	0.75	0.39
					Serológico	Alelo menor	0.94	0.49	1.81	0.04	0.85
IRAK-1 532											
	C		T		Heterocigoto	Alelo Mayor	0.41	0.14	1.17	2.86	0.09
Casos	11	11	36	58	Homocigoto	Alelo Mayor	0.54	0.22	1.32	1.87	0.17
Controles	13	32	79	124	Serológico	Alelo Mayor	0.50	0.21	1.20	2.48	0.12
Totales	24	43	115	182	Heterocigoto	Alelo menor	0.75	0.34	1.66	0.49	0.48
					Homocigoto	Alelo menor	1.86	0.76	4.54	1.87	0.17
					Serológico	Alelo menor	1.07	0.56	2.04	0.05	0.83
TLR-4 299											
	C		T		Heterocigoto	Alelo Mayor	NaN	NaN	NaN	NaN	NA
Casos	0	1	57	58	Homocigoto	Alelo Mayor	NaN	NaN	NaN	NaN	NA
Controles	0	3	121	124	Serológico	Alelo Mayor	NaN	NaN	NaN	NaN	NA
Totales	0	4	178	182	Heterocigoto	Alelo menor	0.71	0.07	6.95	0.09	0.77
					Homocigoto	Alelo menor	NaN	NaN	NaN	NaN	NA



Cuadro 5.3: Tablas de contingencia y estadísticos obtenidos para los SNPs: IL-1 β -511, IL-6 -174, IL-10 -592, IL-10 -1082, TNF- α -308 y TNF- α -238.

TABLAS DE CONTINGENCIA					ESTADÍSTICOS					
	Homocigoto Mayor	Heterocigotos	Homocigoto Menor	Total	Grupo de referencia	OR	Lim. Inf (Woolf)	Lim. Sup. (Woolf)	X2	p-value
IL1-β -511										
	C		T		Heterocigoto	Alelo Mayor	3.23	1.199	8.682	5.725 0.017
Casos	6	35	17	58	Homocigoto	Alelo Mayor	1.47	0.518	4.187	0.533 0.465
Controles	26	47	50	123	Serológico	Alelo Mayor	2.32	0.899	6.003	3.155 0.076
Totales	32	82	67	181	Heterocigoto	Alelo menor	2.19	1.084	4.424	4.863 0.027
					Homocigoto	Alelo menor	0.68	0.239	1.929	0.533 0.465
					Serológico	Alelo menor	1.65	0.845	3.229	2.174 0.140
IL-6 -174										
	G		C		Heterocigoto	Alelo Mayor	Inf	NaN	Inf	0.228 0.633
Casos	0	3	55	58	Homocigoto	Alelo Mayor	Inf	NaN	Inf	0.508 0.476
Controles	1	13	108	122	Serológico	Alelo Mayor	Inf	NaN	Inf	0.478 0.489
Totales	1	16	163	180	Heterocigoto	Alelo menor	0.45	0.12	1.66	1.495 0.221
					Homocigoto	Alelo menor	0.00	0	NaN	0.508 0.476
					Serológico	Alelo menor	0.421	0.116	1.526	1.826 0.177
IL-10 -592										
	C		A		Heterocigoto	Alelo Mayor	1.59	0.640	3.945	1.006 0.316
Casos	8	30	20	58	Homocigoto	Alelo Mayor	1.52	0.584	3.977	0.748 0.387
Controles	25	59	41	125	Serológico	Alelo Mayor	1.56	0.658	3.713	1.033 0.310
Totales	33	89	61	183	Heterocigoto	Alelo menor	1.04	0.522	2.082	0.014 0.906
					Homocigoto	Alelo menor	0.66	0.251	1.711	0.748 0.387
					Serológico	Alelo menor	0.93	0.480	1.790	0.050 0.822
IL-10 -1082										
	A		G		Heterocigoto	Alelo Mayor	0.86	0.129	5.683	0.026 0.873
Casos	2	16	40	58	Homocigoto	Alelo Mayor	0.64	0.103	3.967	0.235 0.627
Controles	3	28	94	125	Serológico	Alelo Mayor	0.69	0.112	4.237	0.164 0.686
Totales	5	44	134	183	Heterocigoto	Alelo menor	1.34	0.656	2.751	0.652 0.420
					Homocigoto	Alelo menor	1.57	0.252	9.738	0.235 0.627
					Serológico	Alelo menor	1.36	0.685	2.717	0.785 0.375
TNFα-308										
	G		A		Heterocigoto	Alelo Mayor	NaN	NaN	NaN	NaN NA
Casos	0	1	57	58	Homocigoto	Alelo Mayor	NaN	NaN	NaN	NaN NA
Controles	0	1	122	123	Serológico	Alelo Mayor	NaN	NaN	NaN	NaN NA
Totales	0	2	179	181	Heterocigoto	Alelo menor	2.14	0.132	34.833	0.299 0.584
					Homocigoto	Alelo menor	NaN	NaN	NaN	NaN NA
					Serológico	Alelo menor	2.14	0.132	34.833	0.299 0.584
TNFα -238										
	G		A		Heterocigoto	Alelo Mayor	NaN	NaN	NaN	NaN NA
Casos	0	2	56	58	Homocigoto	Alelo Mayor	NaN	NaN	NaN	NaN NA
Controles	0	14	111	125	Serológico	Alelo Mayor	NaN	NaN	NaN	NaN NA
Totales	0	16	167	183	Heterocigoto	Alelo menor	0.28	0.062	1.147	2.984 0.084
					Homocigoto	Alelo menor	NaN	NaN	NaN	NaN NA
					Serológico	Alelo menor	0.28	0.0622	1.147	2.984 0.0841



Dentro del grupo control, todos los SNPs se encontraron en equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) con un p-value de $p=0.0226$ y para los casos (incluidos los pacientes LCL y LCD) se encontraron en HWE con un p-value de $p=0.024$. Adicionalmente, se calculó el HWE con el programa Haplowiew 4.1 tomando en cuenta los casos y los controles como una sola población encontrando que no se encontraban en HWE y el valor de p-value fue de $p=0.4998$.

5.1.2. Estadísticos para IL-1 β -511 (C/T)

Los resultados estadísticamente significativos se observaron para el SNP en IL-1 β -511 (C/T). La comparación de las frecuencias genotípicas entre los pacientes con LCL y los controles para este SNP muestra que las frecuencias en homocigotos son mayores en los controles para ambos alelos. Sin embargo, la frecuencia de heterocigotos es mayor en los LCL comparado con los controles (60.3% y 38.2% respectivamente) (Cuadro 5.4).

Cuadro 5.4: Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas para el SNP en IL-1 β -511 (C/T) en casos y controles.

Sujetos	IL-1 β -511 (C/T) Núm. genotipos (%)			Frecuencias alélicas en %		Género % (M/F ¹)	Edad (años)
	CC	CT	TT	C	T		
Casos	6 (10.3)	35 (60.3)	17 (29.4)	40.5	59.5	M=29, F=26	11-64
Controles	26 (21.1)	47 (38.2)	50 (40.7)	40.2	59.8	M=35, F=66	7-88

¹M=Masculino, F=Femenino. (3 casos y 22 controles de género desconocido). Todos los pacientes fueron diagnosticados con una tinción de Giemsa de un raspado de la lesión, por la prueba de hipersensibilidad de Montenegro y/o por una prueba de ELISA contra antígenos de *Leishmania*.



Estos datos sugieren que posiblemente exista un riesgo asociado al desarrollo de la enfermedad cuando se tiene el genotipo heterocigoto. Como ya se mencionó antes, se calculó el OR comparando el genotipo heterocigoto, los homocigotos y serológicos. Los resultados se mostraron en el cuadro 5.5 y como se observa, los resultados significativos fueron encontrados en los grupos de heterocigotos. Cuando se compararon los heterocigotos con los homocigotos C/C el OR fue de 3.23 [p-value = 0.0167, 95 % CI = (1.2,8.7)]. Al tomar en cuenta los homocigotos T/T como grupo de referencia, el OR fue de 2.19 [valor de p = 0.0274, 95 % CI = (1.08,4.4)]. Los resultados para el resto de los SNPs analizados fueron estadísticamente no significativos.

Cuadro 5.5: Análisis estadístico del SNP IL-1 β -511

Grupo	Grupo de Referencia	OR	CI	χ^2	p-value
CT	CC	3.23	(1.2,8.7)	5.72	0.016
TT	CC	1.47	(0.5,4.1)	0.53	0.465
CT+TT	CC	2.32	(0.9,6.0)	3.15	0.075
CT	TT	2.19	(1.0,4.4)	4.86	0.027
CC	TT	0.68	(0.2,1.9)	0.53	0.465
CT+TT	TT	1.65	(0.8,3.2)	2.17	0.140

Tomando en cuenta que la muestra de pacientes con LCD estaba compuesta sólo de 6 pacientes, sería cuestionable dar alguna conclusión sobre estos. Como un paso exploratorio, se repitió el mismo análisis incluyendo las muestras de pacientes LCL y LCD (58 LCL y 6 LCD) para el SNP en IL-1 β -511 (C/T). Los resultados fueron estadísticamente significativos, ya que se observó un OR = 3.7 cuando se compararon los heterocigotos C/T y



como grupo de referencia los homocigotos C/C [$p=0.006$, 95 % CI = (1.38,9.85)] y un OR = 2.4 cuando los heterocigotos C/T se compararon con los homocigotos T/T [$p=0.012$, 95 % CI = (1.19,4.6)]. De los 6 pacientes con LCD, 5 tienen un genotipo heterocigoto. No se realizó un análisis utilizando sólo el grupo de pacientes con LCD como casos, debido al tamaño pequeño de la muestra. Con base en la discusión de Sasieni (1997) [114], se decidió no utilizar el OR alélico. Con la finalidad de validar los resultados observados y arriba descritos, se analizó la expresión de IL-1 β en muestras de pacientes con LCL, con LCD y controles.

5.2. Análisis de IL-1 β

5.2.1. IL-1 β en suero

El análisis de la expresión de IL-1 β en suero se analizó por western-blot en un grupo de sujetos sanos, pacientes con LCL y LCD. Una expresión diferencial de la citocina entre ambos grupos de fue encontrada. Los pacientes con LCL tuvieron menos expresión de IL-1 β en su forma activa (Figura 5.1 A, muestras 5-13) mientras que los pacientes LCD mostraron un aumento significativo en la expresión de la proteína (Figura 5.1 A, muestras 14-20). En contraste con los pacientes con leishmaniasis, los controles mostraron mínimas cantidades de IL-1 β (Figura 5A, muestras 1-4). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa (Figura 1B) cuando se comparó la expresión en suero de IL-1 β en pacientes con LCL vs controles ($p=0.01$), entre pacientes LCD vs controles ($p=0.0052$) y cuando se comparó el grupo de pacientes LCD vs LCL se obtuvo una $p=0.019$.

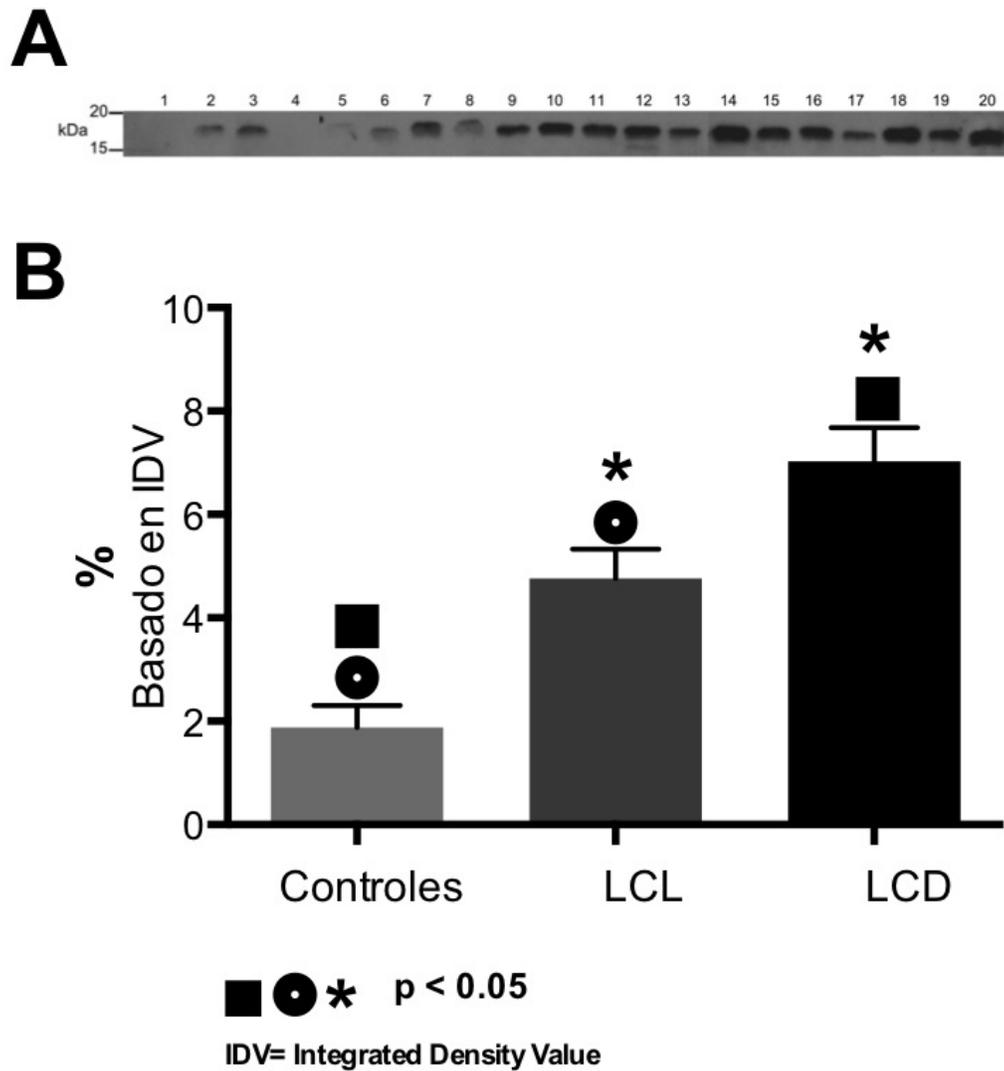


Figura 5.1: **Expresión de IL-1 β en suero de pacientes con leishmaniasis.** (A) Western-blot contra la forma activa de IL-1 β (17 kDa) en 4 controles (1-4), 9 pacientes con LCL (5-13) y 7 pacientes con LCD (14-20). B) Gráfica del porcentaje de intensidad de las bandas de IL-1 β con diferencias estadísticamente significativas entre casos LCL vs controles, entre casos LCD vs controles y LCL vs LCD. (Símbolos idénticos entre barras mostraron diferencias significativas: p \leq 0.05)



Los mismos datos se observaron en una gráfica de dispersión (Figura 5.2) y se apreció que los controles tenían la menor expresión de IL-1 β . En el grupo de los pacientes con LCL se observó que 3 pacientes tenían una baja expresión de la proteína pero en el resto se encontraron valores elevados de la misma. En contraste, los resultados para el grupo de los pacientes con LCD mostraron que 6 de los 7 tuvieron una alta expresión de la forma activa de la proteína.

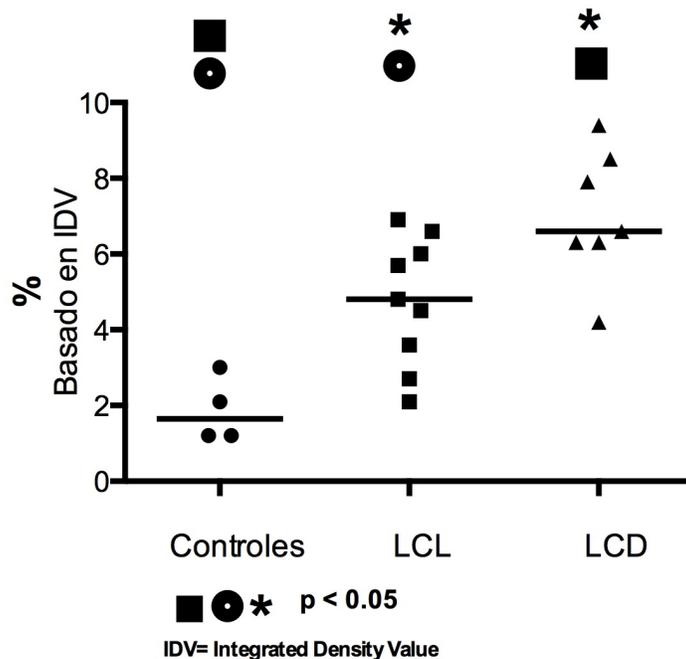


Figura 5.2: Gráfica de dispersión para la expresión de IL-1 β en suero en muestras de pacientes con LCL, LCD y sujetos sanos.



5.2.2. Producción de IL-1 β por monocitos

Se analizó la producción de IL-1 β en sobrenadantes de monocitos sin estímulo incluyendo muestras de controles y de pacientes con leishmaniasis cutánea (LCL y LCD) todos con un genotipo C/T para el SNP IL-1 β -511. Los resultados mostraron que hubo un aumento estadísticamente significativo de esta citocina cuando se comparó la secreción de la citocina entre ambos grupos ($p= 0.015$) (Figura 5.3). El análisis individual de la producción de IL-1 β por monocitos en pacientes mostró que la concentración de esta citocina podría estar relacionada con la gravedad de la enfermedad, ya que fue más alta en pacientes con LCD [$n=2$] (478 pg/mL en el paciente con LCD que presenta la forma más grave de la enfermedad y 423 pg/mL en el paciente LCD con la forma menos grave), en comparación con los pacientes LCL [$n=3$], en los cuales la producción de IL-1 β se encontró entre 50 a 336 pg/mL.

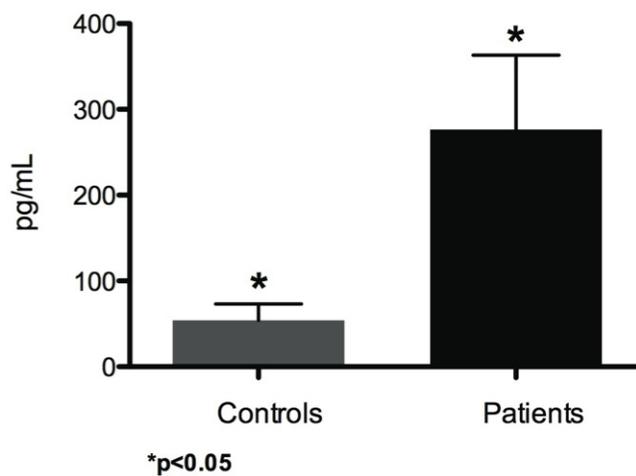


Figura 5.3: **Análisis de la producción de IL-1 β** . Monocitos sin estímulo purificados con perlas magnéticas anti-CD14 a partir de células mononucleares de pacientes con leishmaniasis y sujetos sanos después de 18 hr de cultivo *in vitro*. Las medias fueron obtenidas de 7 sujetos control y 5 pacientes con leishmaniasis cutánea (3 con LCL y 2 con LCD). (Símbolos idénticos sobre las barras mostraron que los datos son estadísticamente significativos: $p \leq 0.05$).



5.3. Expresión de IL-1 β y número de parásitos en lesiones de pacientes

5.3.1. Inmunocitoquímica para IL-1 β

La tinción de IL-1 β en células en estado basal (Figura 5.4 A) fue negativa, mientras que las células estimuladas con LPS (Figura 5.4 B) expresaron la proteína. Los controles de anticuerpo secundario y de tinción fueron negativos (Figura 5.4 C y D). Se incluyó una tinción utilizando amastigotes de *L. mexicana* como control para descartar un pegado inespecífico del anticuerpo, la cuál fue negativa (Figura 5.4 E).

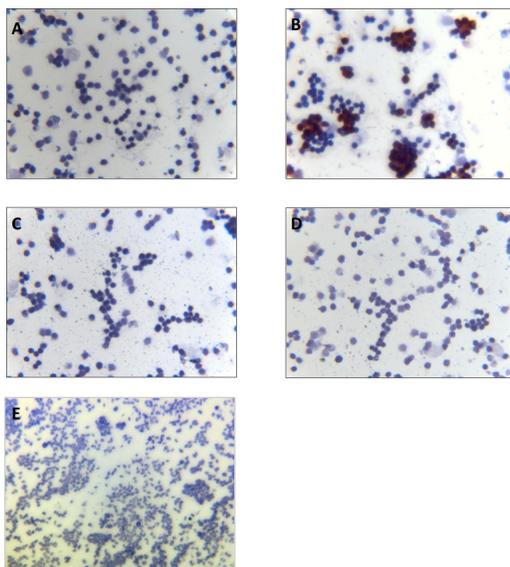


Figura 5.4: **Expresión de IL-1 β en células mononucleares estimuladas con LPS.** (A) Células mononucleares sin estímulo, (B) células estimuladas con LPS, (C) control anticuerpo secundario, (D) control de tinción, (E) amastigotes de *Leishmania mexicana*. La inmunotinción de las células se visualizó con un aumento de 360x.



5.3.2. Inmunohistoquímica para IL-1 β y *Leishmania mexicana* en lesiones de pacientes

El análisis de IL-1 β en lesiones cutáneas de pacientes con LCL (n=11) y con LCD (n=6) mostró que la distribución de esta citocina variaba entre los dos grupos de pacientes: en las lesiones de los LCL, se observaron dos posibles patrones de expresión de IL-1 β que se asociaron con el número de parásitos presentes en la lesión. En un grupo (Figura 5.5 A) la citocina se encontró concentrada dentro de la superficie celular, mostrando una intensa marca. Este tipo de marca se encontró en lesiones de pacientes con LCL que presentaron pocos parásitos (n=8) (Figura 5.5 B). El segundo grupo de pacientes con LCL mostró un patrón de distribución difusa de la IL-1 β (Figura 5.5 C), que se asoció con una tinción difusa de restos de abundantes parásitos en las lesiones (n=3) (Figura 5.5 D). Es importante mencionar que el primer grupo de pacientes con LCL sólo tenía una úlcera pequeña de menos de 1 cm de diámetro, mientras que el segundo grupo de pacientes con LCL presentaba de 3 a 6 lesiones que variaron entre 1 y 2 cm de diámetro. Todos los pacientes con LCD presentaron una distribución difusa de la IL-1 β (n=6) (Figura 5.5 E) asociada con abundantes parásitos intactos (Figura 5.5 F).

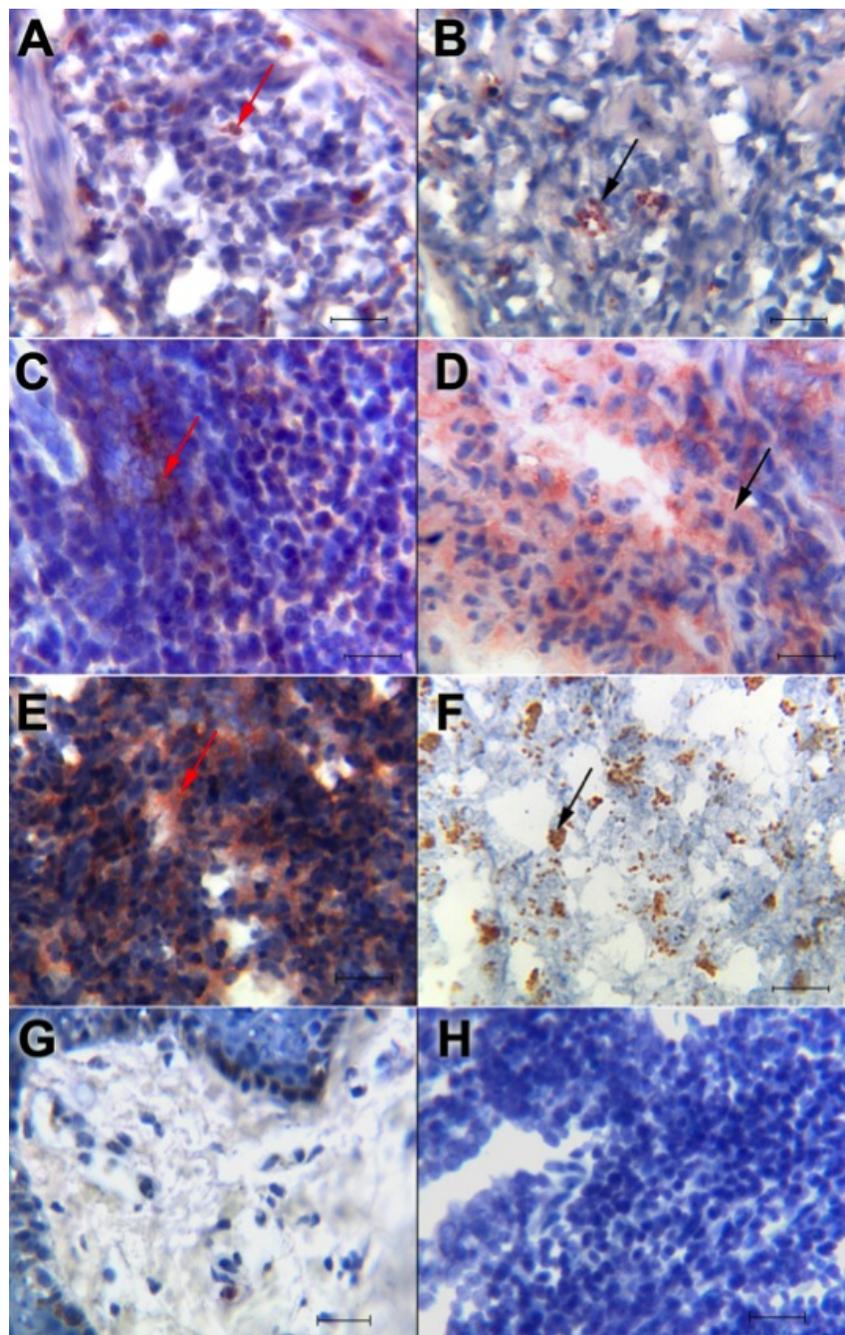


Figura 5.5: Tinción por inmunohistoquímica para IL-1 β y *Leishmania mexicana* en lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea. (pie de figura en la siguiente página)



(A) Tinción de IL-1 β en células de paciente con LCL con una pequeña lesión única; (B) Pequeños grupos de parásitos de *Leishmania* en una úlcera pequeña de un paciente con LCL; (C) Distribución difusa de la IL-1 β en un paciente LCL con abundantes úlceras; (D) Parásitos de *Leishmania* degradados en una lesión de paciente con LCL con varias úlceras; (E) distribución difusa de IL-1 β en una lesión de paciente con LCD; (F) Agrupaciones con abundantes parásitos de *Leishmania* intactos en una lesión de un paciente con LCD. Las flechas rojas mostraron la tinción positiva para IL-1 β y las flechas negras mostraron tinción positiva para *L. mexicana*. (G) Se utilizó piel sana como control negativo para la inmunodetección de IL-1 β . (H) Control de la tinción solo con anticuerpo secundario. Todas las secciones se tiñeron con hematoxilina. (A-H) barra de escala equivalente a 50 micras. Las tinciones se visualizarán con un aumento de 400x. Se muestra un resultado representativo de los diferentes tipos de lesiones dentro de cada grupo: pacientes LCL con una úlcera pequeña: (n=8 para IL-1 β y n=17 para *L. mexicana*) (A y B); Pacientes LCL con diversas úlceras (n = 3) (C y D); Pacientes LCD (n = 6) (E y F).



Los resultados mostraron que las características de la distribución de la IL- β en el tejido variaron de acuerdo con el número de parásitos en la lesión, ya que pacientes LCL con pocos parásitos en sus lesiones mostraron una tinción para IL-1 β localizada en la superficie celular, mientras que, todos los pacientes LCD con abundantes parásitos intactos en sus lesiones, así como algunos pacientes con LCL con parásitos destruidos, mostraron un patrón de tinción de IL-1 β difuso.

El número de células IL-1 β positivas en los tejidos fue diferente para cada paciente (entre 18 y 410 células) y no se encontró ninguna correlación con el tiempo de evolución de la enfermedad, ni con el número de parásitos. Sin embargo, la diferencia del número de parásitos en las lesiones fue estadísticamente significativo entre los pacientes con LCL vs LCD ($p=0,0003$) (Figura 5.6).

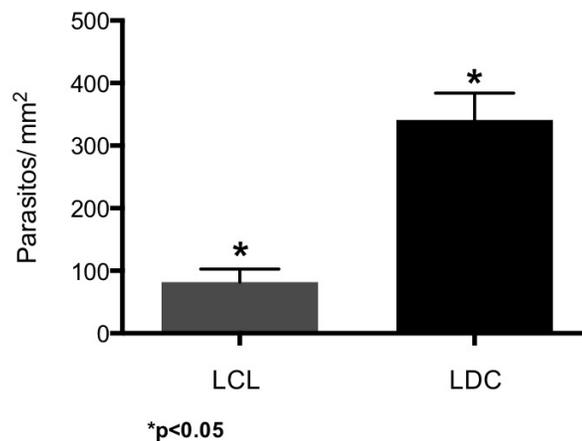


Figura 5.6: **Análisis estadístico del número de parásitos/mm² entre lesiones de pacientes con LCL y LCD.** Los valores promedio fueron obtenidos de 17 pacientes con LCL y 6 pacientes con LCD infectados con *Leishmania mexicana*. (Símbolos idénticos sobre las barras mostraron valores estadísticamente significativos: $p \leq 0.05$).



Con la finalidad de observar la distribución individual del número de parásitos/mm² en las lesiones de los pacientes con LCL y con LCD, se hizo una gráfica de dispersión (Figura 5.7) donde se observó que la mayoría de los pacientes con LCL mantienen una media menor a 100 parásitos/mm² y solo 4 de ellos presentaron un número mayor a 200 parásitos/mm². Por otro lado, en el grupo de los pacientes con LCD la media del número de parásitos fue mayor a 350/mm² y únicamente dos de ellos mostraron un valor menor del número de parásitos, sin embargo, solo se acerca ligeramente a los valores más altos de número de parásitos en pacientes con LCL.

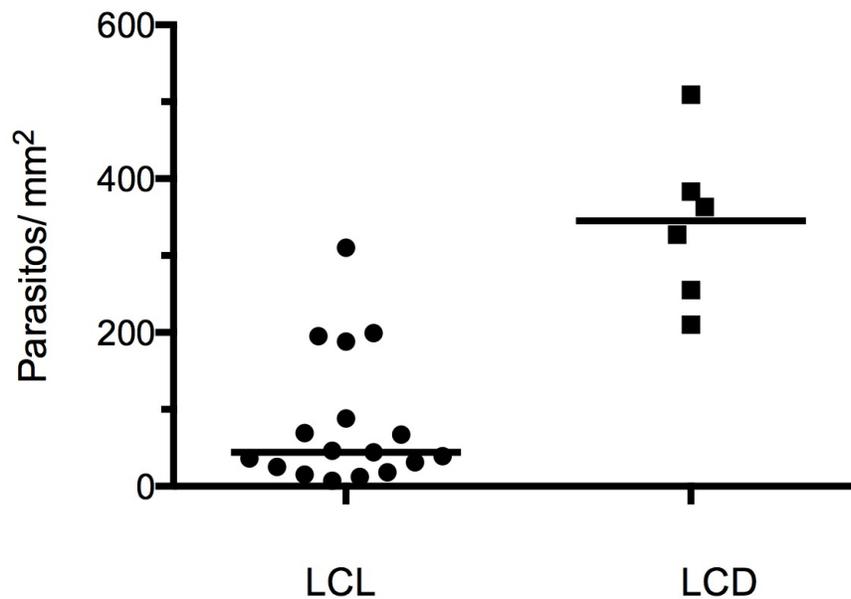


Figura 5.7: Gráfica de dispersión del número de parásitos por mm² de *Leishmania mexicana* en lesiones de pacientes con LCL y LCD.



5.4. Genómica: Microarreglos de expresión

5.4.1. Integridad de las muestras de RNA

Para los experimentos de microarreglos se utilizaron células NK sin estímulo y estimuladas con LPG (20 $\mu\text{g/mL}$) de *Leishmania mexicana* por 6 horas de sujetos sanos (controles) (n= 4), pacientes con LCL (n= 2) y pacientes con LCD (n= 3). La integridad de las muestras de RNA fue analizada confirmando que cada una fuera óptima para los ensayos de microarreglos obteniendo el RIN de cada una, el cual se mantuvo en un rango de entre 7.1 a 9.5 (el valor máximo de RIN es de 10). De cada muestra se obtuvieron los histogramas y las imágenes de los electroferogramas (Figura 5.8) mostrando la integridad de las dos unidades ribosomales (28s y 18s).

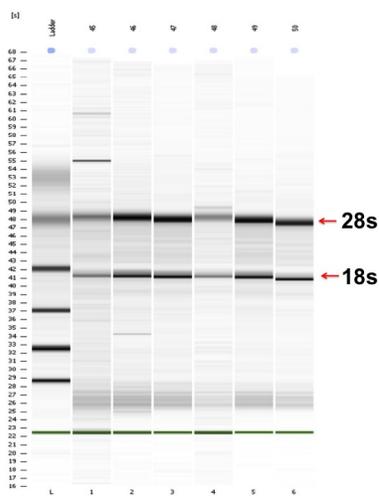


Figura 5.8: **Electroferograma representativo que muestra la integridad de las muestras de RNA utilizadas para los microarreglos de expresión.** Las flechas rojas muestran la integridad de las subunidades ribosomales 28s y 18s.



5.4.2. Análisis de microarreglos

En términos muy generales, un análisis de microarreglos involucra 4 bloques de análisis:

- Análisis de control de calidad,
- Normalización y corrección de fondo,
- Clasificación e
- Interpretación biológica

*** Control de Calidad**

En esta parte analizamos los datos crudos con el fin de detectar variaciones sistemáticas debidas a la tecnología o patrones que nos indiquen una inconsistencia, por ejemplo, en el proceso de extracción de RNA. Este análisis es principalmente a base de gráficos. El primer gráfico que se generó muestra las curvas de distribución de los niveles de expresión por sonda. Cada curva delinea el contorno del histograma para cada microarreglo. En la figura 5.9 observamos principalmente dos cosas: a) que las curvas se alinearon bien, indicando que el proceso de normalización removerá la pequeña variación sistemática sin alterar la información biológica; y b) que el rango dinámico de los niveles de expresión estaba entre 5 y 16 aproximadamente.

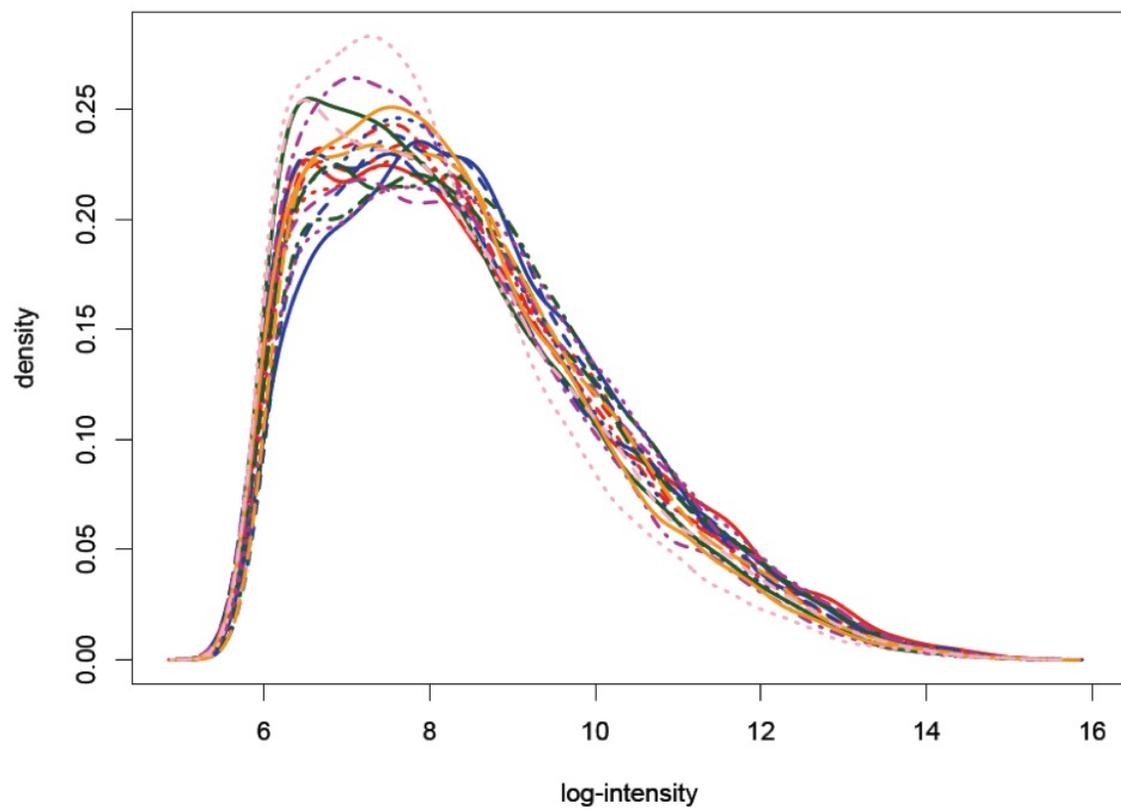


Figura 5.9: Histograma de la distribución de datos crudos de cada microarreglo.



Otro gráfico informativo fue el *boxplot*, Figura 5.10. Se observó que aún cuando las medianas no estaban completamente alineadas, si se mantenían bastante homogéneas, considerando que en este punto los datos son tal cual se leyeron de los archivos generados por Affymetrix.

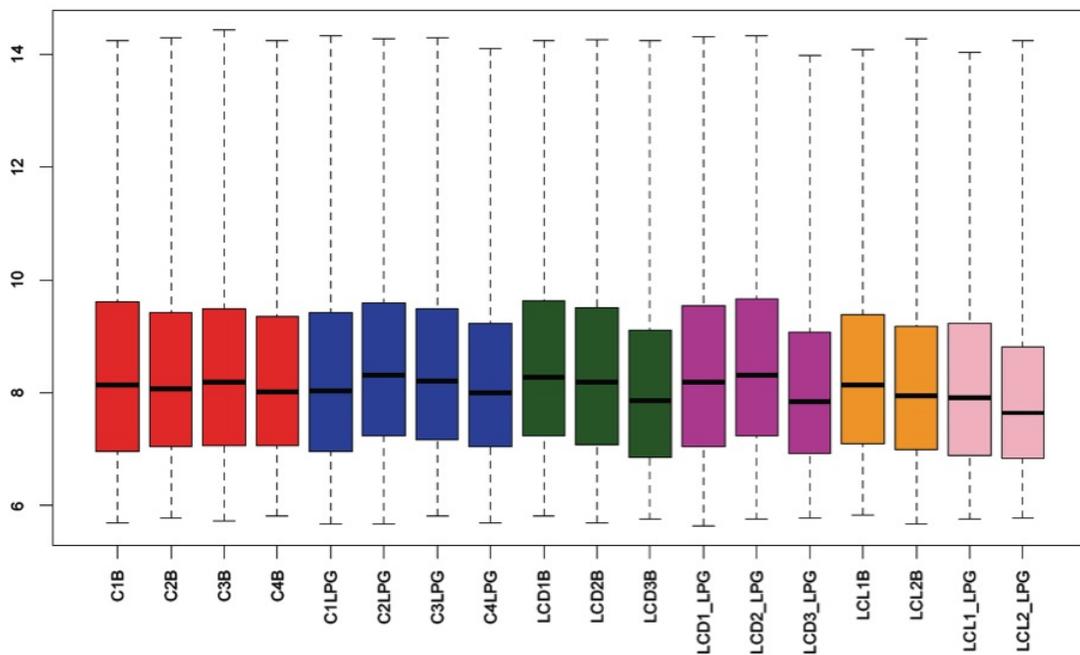


Figura 5.10: Boxplot de la distribución de datos crudos de cada microarreglo.



Basados en esta información, se tomaron decisiones del tipo de normalización que se debería llevar a cabo. Esto lo explico con mas detalle en la siguiente sección.

*** Normalización y Corrección de Fondo**

En un microarreglo, la señal de intensidad es detectada cuando la sonda, muestra y/u oligo de DNA motivo de estudio se adhiere a su correspondiente contraparte (sonda blanco) presente desde el diseño del microarreglo. Este proceso llamado hibridación no es perfecto, y puede darse el caso de una hibridación no específica, es decir, se emite una señal pero las dos sondas no se complementaron correctamente. También es posible que el lavado del material genético (parte del proceso de la tecnología) no haya retirado todas aquellas sondas que no hibridaron y se emita una señal cuando no debería existir. Ambos casos son fuentes de ruido para la estimación de la señal de intensidad y su posterior análisis. El objetivo de realizar la corrección de ruido de fondo es detectar la señal falsa y removerla.

La normalización es necesaria para remover la variación sistemática durante el proceso completo de obtener la muestra a procesarla con el microarreglo. Los niveles de expresión observados incluyen cierto ruido introducido durante el proceso del experimento. Esta variación surge debido a diferencias en la preparación de la muestra, extracción del RNA, integridad del mismo, cambio de manos, cambios de temperatura o en la producción y procesamiento de los microarreglos.

En base al análisis de control de calidad, se decidió utilizar el *algoritmo RMA* para hacer la corrección de fondo y el método de *Quantiles* para normalizar los datos. El efecto de ambos lo observamos en las Figuras 5.11 y 5.12



En la Figura 5.11 observamos que la corrección del ruido de fondo nos generó una distribución muy cercana a una curva Normal (Gaussiana) y esto permitió que se cumplieran los principios matemáticos en los que se basan los estadísticos que usamos para detectar significancia de expresión diferencial.

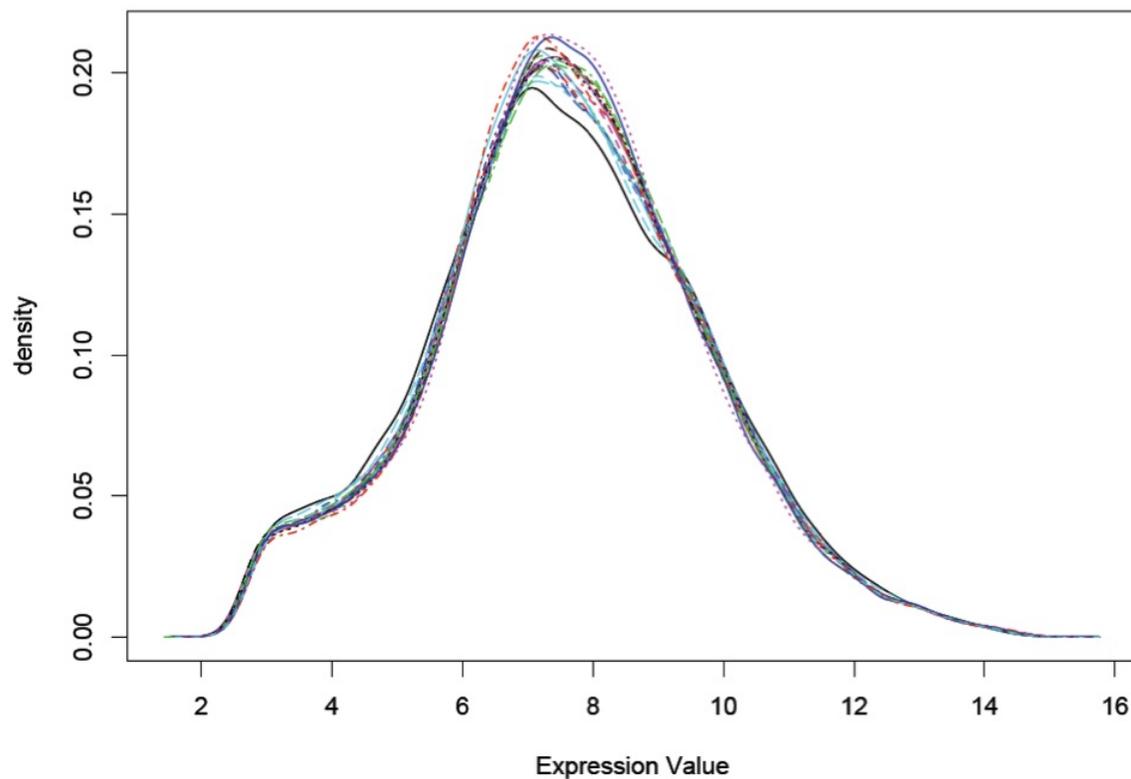


Figura 5.11: **Histograma de la distribución de datos normalizados de cada microarreglo.**



La Figura 5.12 muestra que las medianas estaban alienadas y por lo tanto, se redujo el nivel de falsos positivos en el diferencial de expresión.

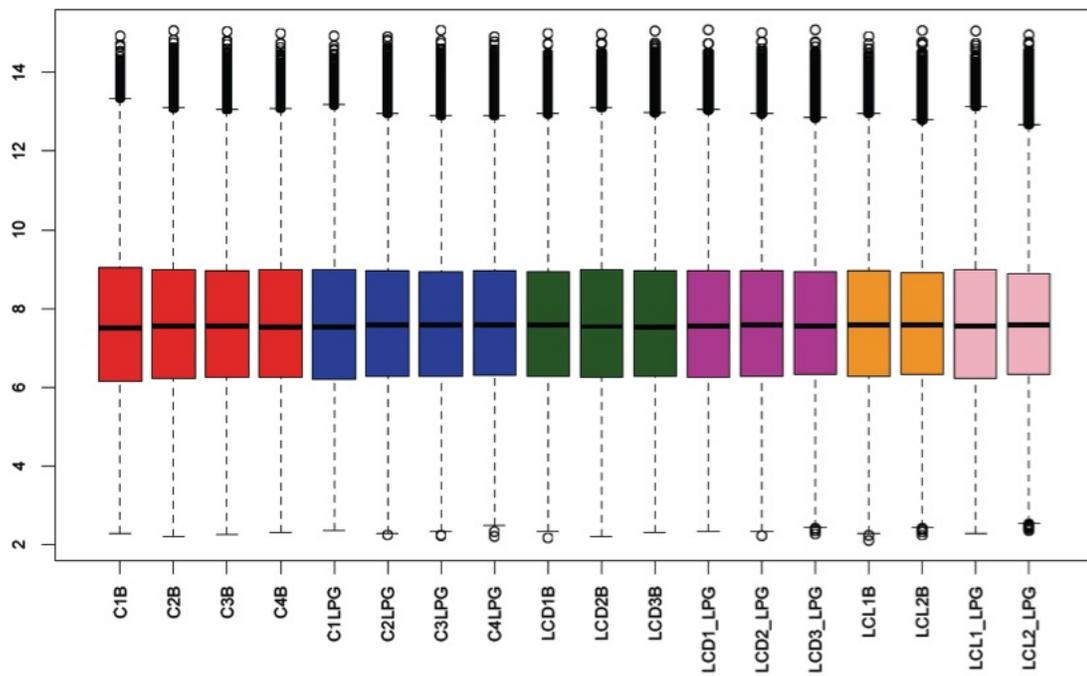


Figura 5.12: **Boxplot de la distribución de datos normalizados de cada microarreglo.**



*** Clasificación**

Este bloque de análisis tuvo como propósito identificar los genes diferencialmente expresados y presentarlos respaldados por estadísticos que nos indicaran robustez en la selección y relevancia de la diferencia entre los niveles de expresión (diferencial).

Para este análisis de selección, necesitábamos definir los contrastes de interés. Es decir, aquellas comparaciones entre los distintos grupos que nos sugirieran hipótesis a perseguir en mayor detalle. En este proyecto con 18 microarreglos tuvimos 6 grupos de estudio:

1. Células NK en estado basal de controles.
2. Células NK estimuladas con LPG de controles.
3. Células NK en estado basal de pacientes con LCL.
4. Células NK estimuladas con LPG de pacientes con LCL.
5. Células NK en estado basal de pacientes con LCD.
6. Células NK estimuladas con LPG de pacientes con LCD.



Que nos permitieron elegir a 9 contrastes de interés:

- 1) NK de LCL no estimuladas (**LCL_B**) vs NK de controles no estimuladas (**C_B**)
- 2) NK de LCD no estimuladas (**LCD_B**) vs NK de controles no estimuladas (**C_B**)
- 3) NK de LCD no estimuladas (**LCD_B**) vs NK de LCL no estimuladas (**LCL_B**)
- 4) NK de LCL estimuladas con LPG (**LCL_LPG**) vs NK de controles estimuladas con LPG (**C_LPG**)
- 5) NK de LCD estimuladas con LPG (**LCD_LPG**) vs NK de controles estimuladas con LPG (**C_LPG**)
- 6) NK de LCD estimuladas con LPG (**LCD_LPG**) vs NK de LCL estimuladas con LPG (**LCL_LPG**)
- 7) NK de controles estimuladas con LPG (**C_LPG**) vs NK de controles no estimuladas (**C_B**)
- 8) NK de LCL estimuladas con LPG (**LCL_LPG**) vs NK de LCL no estimuladas (**LCL_B**)
- 9) NK de LCD estimuladas con LPG (**LCD_LPG**) vs NK de LCD no estimuladas (**LCD_B**)

B= células no estimulas; LPG= células estimuladas con LPG.

Para observar en forma general el número de genes que se encontraban inhibidos o sobreexpresados en cada uno de los 9 contrastes, se generaron gráficos de volcano plot para cada uno. En el eje de las ordenadas se graficó el \log_2 Fold Change o diferencia de medias (expresión relativa) de cada gen y en el de las abscisas los valores del estadístico B. En color rojo se mostraron los genes sobreexpresados con un estadístico B mayor a cero, en verde los genes inhibidos con un estadístico B mayor a cero, en magenta aquellos genes inhibidos o sobreexpresados con un estadístico B menor a cero y en azul todos los genes que no tuvieron un cambio entre las dos condiciones que se compararon.



Como se observa en la Figura 5.13, en los contrastes C_LPG vs C_B, LCL_LPG vs LCL_B, LCD_LPG vs LCD_B el número de genes diferencialmente expresado fue muy reducido.

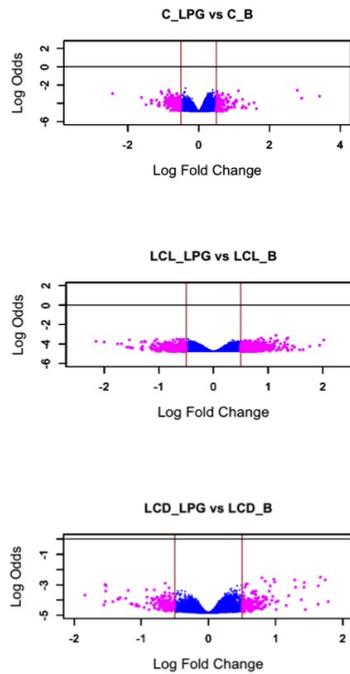


Figura 5.13: Volcano plots de los contrastes C_LPG vs C_B, LCL_LPG vs LCL_B y LCD_LPG vs LCD_B. En el eje de las abscisas se muestra el Log Fold Change de los datos comparados (valores negativos muestran genes inhibidos y valores positivos genes sobreexpresados) y en el de las ordenadas el valor estadístico B. En color azul los genes con ningún cambio, en color magenta genes con un Log Fold Change mayor a 0.5 o menor -0.5 y un estadístico B menor a 0, en color rojo los genes con un Log Fold Change mayor a 0.5 y un estadístico B mayor a 1 y en color verde los genes con un Log Fold Change menor a -0.5 y un estadístico B mayor a 1.



Mientras que en los contrastes: LCL_B vs C_B, LCD_B vs C_B, LCD_B vs LCL_B, LCL_LPG vs C_LPG, LCD_LPG vs C_LPG y LCD_LPG vs LCL_LPG aumentó el número de genes diferencialmente expresados (Figura 5.14).

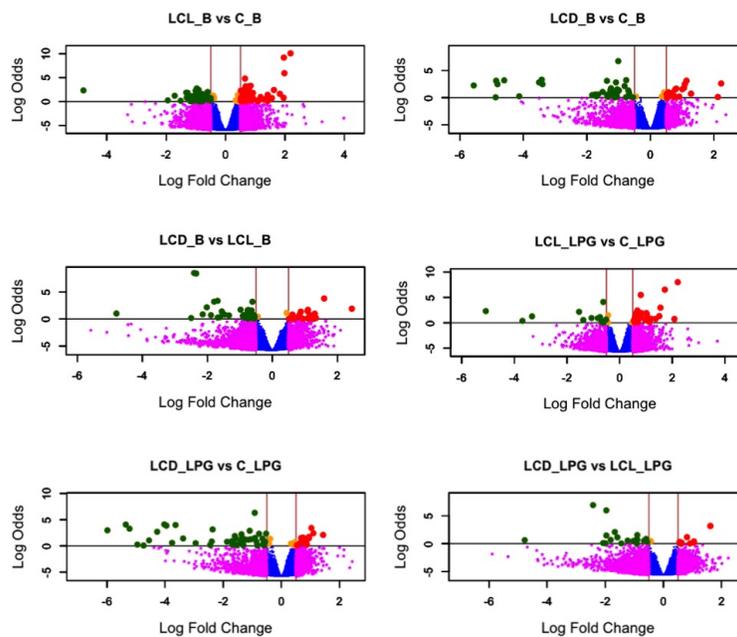


Figura 5.14: Volcano plots de los contrastes LCL_B vs C_B, LCD_B vs C_B, LCD_B vs LCL_B, LCL_LPG vs C_LPG, LCD_LPG vs C_LPG y LCD_LPG vs LCL_LPG. En el eje de las abscisas se muestra el Log Fold Change de los datos comparados (valores negativos muestran genes inhibidos y valores positivos genes sobreexpresados) y en el de las ordenadas el valor estadístico B. En color azul los genes con ningún cambio, en color magenta genes con un Log Fold Change mayor a 0.5 o menor -0.5 y un estadístico B menor a 0, en color rojo los genes con un Log Fold Change mayor a 0.5 y un estadístico B mayor a 1 y en color verde los genes con un Log Fold Change menor a -0.5 y un estadístico B mayor a 1.



*** Interpretación Biológica**

- Número de genes diferencialmente expresados

El número exacto de genes inhibidos y sobreexpresados se obtuvo en tablas de excell. Debido a que el número de muestras de pacientes y controles para cada grupo de estudio fue muy reducido, al obtener los datos se tomaron en cuenta aquellos genes con un \log_2 Fold Change mayor a 1 de los genes diferencialmente expresados, sin tener restricciones con respecto al valor del estadístico B.

El número de genes diferencialmente expresados (inhibidos y sobreexpresados) para cada uno de los 9 contrastes analizados se muestra en la cuadro 5.6. Como se puede observar, el mayor número de genes diferencialmente expresados se presenta en los contrastes 1 al 6 con 256, 390, 359, 254, 433 y 404 genes respectivamente, mientras que los contrastes 7, 8 y 9 solo presentan 13, 30 y 12 genes diferencialmente expresados, respectivamente.

Pudimos observar que en los contrastes 2, 3, 5 y 6 (contrastos del grupo LCD vs controles o LCL) la mayoría de los genes se encontraban inhibidos. Mientras que en los contrastes 1 y 4 (contrastos del grupo LCL vs controles o LCD) existía la misma proporción de genes inhibidos y sobreexpresados.



	Num.	Contraste	Inhibidos	Sobre- expresados	TOTAL
B A S A L	1	LCL_B vs C_B	128	128	256
	2	LCD_B vs C_B	352	38	390
	3	LCD_B vs LCL_B	323	36	359
E S T I M	4	LCL_LPG vs C_LPG	135	119	254
	5	LCD_LPG vs C_LPG	303	40	433
	6	LCD_LPG vs LCL_LPG	365	39	404
ESTIM vs BASAL	7	C_LPG vs C_B	0	13	13
	8	LCL_LPG vs LCL_B	14	16	30
	9	LCD_LPG vs LCD_B	5	7	12

Cuadro 5.6: **Genes diferencialmente expresados para los 9 contrastes analizados.** Basal se refiere a las células NK sin estímulo. Estim se refiere a las células NK estimuladas por 6 hr con LPG (20µg/mL) de *Leishmania mexicana*. C= controles; LCL= pacientes con LCL; LCD= pacientes con LCD; B= Basal (células sin estímulo); LPG= Estimulado (células estimuladas con LPG).



Cuando se observaron los resultados de los genes inhibidos y sobreexpresados, se decidió que los datos a analizar serían los primeros 6 contrastes, ya que representaban el mayor número de genes diferencialmente expresados. Estos resultados se representaron de manera más sencilla en una gráfica de barras (Figura 5.15) mostrando en color verde el número de genes inhibidos para cada contraste y en rojo los sobreexpresados.

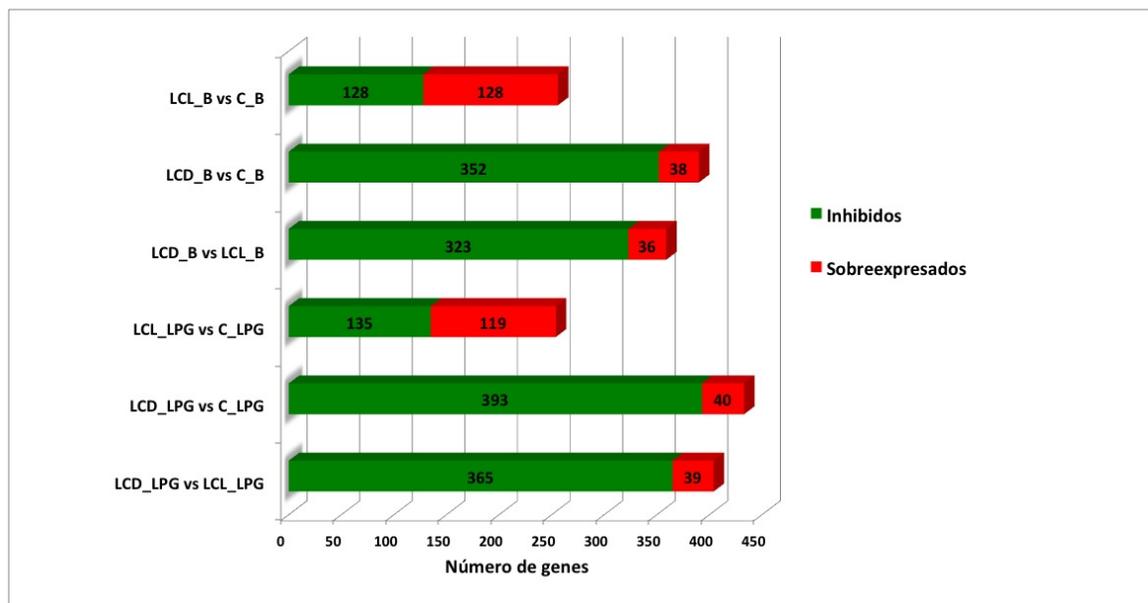


Figura 5.15: **Número de genes diferencialmente expresado para cada contraste analizado.** (En verde el número de genes inhibidos y en rojo los sobreexpresados.)



- Número de genes por estados

Las listas de datos de los 6 contrastes que se analizaron (1-6) se organizaron en tablas de estados (ausencia y/o presencia del gen), generando una lista para los 3 contrastes donde se compararon los genes de células sin estímulo (basal) y otra lista para los contrastes de las condiciones estimuladas. El valor 0 representaba que el gen no se encontraba en ese estado, el 1 representaba que esos genes estaban sobreexpresados y el -1 que esos genes estaban inhibidos. De acuerdo a esta organización, los estados que contenían genes para los contrastes en condiciones basales se pueden ver en el cuadro 5.7 y para los estimulados se pueden ver en el cuadro 5.8. En la columna de descripción se puede leer lo que significa cada uno de los estados.



Contraste LCL_basal vs Ctrl_basal	Contraste LCD_basal vs Ctrl_basal	Contraste LCD_basal vs LCL_basal	Núm. de genes	Descripción 0=ausente, 1=sobre-expresado, -1=inhibido
0	0	1	17	Genes sobre-expresados en pacientes LCD y no en LCL
0	0	-1	88	Genes inhibidos en pacientes LCD y no en LCL
0	1	0	20	Genes sobre-expresados en pacientes LCD y no en controles
0	-1	0	103	Genes inhibidos en pacientes LCD y no en controles
1	0	0	26	Genes sobre-expresados en pacientes LCL y no en controles
-1	0	0	14	Genes inhibidos en pacientes LCL y no en controles
0	1	1	13	Genes sobre-expresados en pacientes LCD y no en controles ni en pacientes LCL
0	-1	-1	123	Genes inhibidos en pacientes LCD y no en controles y no en pacientes LCL
-1	0	1	3	Genes inhibidos en pacientes LCL y no en controles y sobre-expresados en LCD y no en pacientes LCL.
1	0	-1	82	Genes sobre-expresados en pacientes LCL y no en controles e inhibidos en pacientes LCD y no en pacientes LCL.
1	1	0	3	Genes genuinamente sobre-expresados en pacientes LCL y LCD y no en controles
-1	-1	0	98	Genes genuinamente inhibidos en pacientes LCL y LCD y no en controles
-1	-1	-1	10	Genes inhibidos en pacientes LCL y LCD y no en controles y aun más inhibidos en pacientes LCD que en pacientes LCL
1	-1	-1	17	Genes sobre-expresados en pacientes LCL y no en controles, pero inhibidos en pacientes LCD ya sea comparándolos con controles o con pacientes LCL

Cuadro 5.7: Lista de estados con el número de genes diferencialmente expresados en células sin estímulo (basal) para los contrastes analizados.



Contraste LCL_LPG vs Ctrl_LPG	Contraste LCD_LPG vs Ctrl_LPG	Contraste LCD_LPG vs LCL_LPG	Núm. de genes	Descripción 0=ausente, 1=sobre-expresado, -1=inhibido. (LPG=Lipofosfoglicano)
0	0	1	19	Genes que estimulando con LPG se sobre-expresan en pacientes LCD y no el LCL
0	0	-1	101	Genes que estimulando con LPG se inhiben en pacientes LCD y no en LCL
0	1	0	23	Genes que estimulando con LPG se sobre-expresan en pacientes LCD y no en controles
0	-1	0	111	Genes que estimulando con LPG se inhiben en pacientes LCD y no en controles
1	0	0	24	Genes que estimulando con LPG se sobre-expresan en pacientes LCL y no en controles
-1	0	0	13	Genes que estimulando con LPG se inhiben en pacientes LCL y no en controles
0	1	1	12	Genes que estimulando con LPG se sobre-expresan en pacientes LCD y no en controles y no en pacientes LCL
0	-1	-1	152	Genes que estimulando con LPG se inhiben en pacientes LCD y no en controles y no en pacientes LCL
-1	0	1	5	Genes que estimulando con LPG se inhiben en pacientes LCL y no en controles y se sobre-expresan en LCD y no en pacientes LCL.
1	0	-1	69	Genes que estimulando con LPG se sobre-expresan en pacientes LCL y no en controles y se inhiben en pacientes LCD
-1	0	-1	1	Genes que estimulando con LPG se inhiben en pacientes LCL y no en controles y se inhiben aun más en pacientes LCD que en LCL
1	1	0	4	Genes que estimulando con LPG se sobre-expresan en pacientes LCL y LCD y no en controles.
-1	-1	0	96	Genes que estimulando con LPG se inhiben en pacientes LCL y LCD y no en controles.
-1	-1	-1	16	Genes que estimulando con LPG se inhiben en pacientes LCL y LCD y no en controles y se inhiben aun más en pacientes LCD que en pacientes LCL.
1	-1	-1	21	Genes que estimulando con LPG se sobre-expresan en pacientes LCL y no en controles, pero se inhiben en pacientes LCD ya sea comparándolos con controles o con pacientes LCL.

Cuadro 5.8: Lista de estados con el número de genes diferencialmente expresados en células estimuladas con LPG de *Leishmania mexicana* para los contrastes analizados.



Basado en los datos obtenidos de las listas de estados (Cuadros 5.7 y 5.6) se decidió que el análisis continuaría solo para aquellos estados de mayor interés biológico y/o con el mayor número de genes (Cuadro 5.9), tanto para genes en estado basal como para los estimulados con LPG, es decir, genes inhibidos en pacientes con LCD pero no en pacientes con LCL (**0 0 -1**), genes inhibidos en pacientes con LCD pero no en controles (**0 -1 0**), genes inhibidos en pacientes con LCD pero no en pacientes con LCL ni en controles (**0 -1 -1**), genes inhibidos en ambos grupos de pacientes (**-1 -1 0**), genes sobreexpresados en pacientes con LCL y no en controles y a su vez inhibidos en pacientes con LCD (**1 0 -1**) y genes sobreexpresados en pacientes con LCL pero inhibidos en pacientes con LCD (**1 -1 -1**).

Contraste LCL vs Ctrl	Contraste LCD vs Ctrl	Contraste LCD vs LCL	Condición Basal_estado No. genes	Condición Estim_estado No. genes	Descripción NOTA: Los números pueden ser 0=ausente, 1=sobre- expresado o -1=inhibido
0	0	-1	88	101	Genes inhibidos en pacientes LCD y no en LCL.
0	-1	0	103	111	Genes inhibidos en pacientes LCD y no en controles.
0	-1	-1	123	152	Genes inhibidos en pacientes LCD y no en controles y no en pacientes LCL
-1	-1	0	98	96	Genes inhibidos en ambos grupos de pacientes.
1	0	-1	82	69	Genes sobre expresados en LCL e inhibidos en LCD.
1	-1	-1	17	21	Genes sobre expresados en LCL e inhibidos en LCD.

Cuadro 5.9: Tablas con los estados seleccionados para analizar los genes diferencialmente expresados en células basal y estimuladas.



- Análisis de enriquecimiento

Las 12 listas de los estados seleccionados se generaron en tablas de excell y contenían la información del transcription cluster id, el símbolo de la proteína y el \log_2 Fold Change que presentaba el gen. Adicionalmente, utilizando el transcription cluster ID se hizo un análisis de enriquecimiento en DAVID para cada lista utilizando como fondo el microarreglo Affymetrix exon gene ID y obteniendo los datos que se describen en la metodología. Adicionalmente se obtuvo el score de enriquecimiento que une los resultados obtenidos de varias bases de datos y a cada grupo que se asocia se le da una puntuación (la mas alta y la mejor), el nombre de la categoría para cada grupo, el estadístico de Benjamini (corrección para múltiples comparaciones, cuanto más bajos mejor), y Bonferroni, el p-value y el estadístico kappa (mide la similitud en grados de relación de una base de datos de una lista con respecto a otra, su valor va de 0 a 1). La figura 5.16 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos.

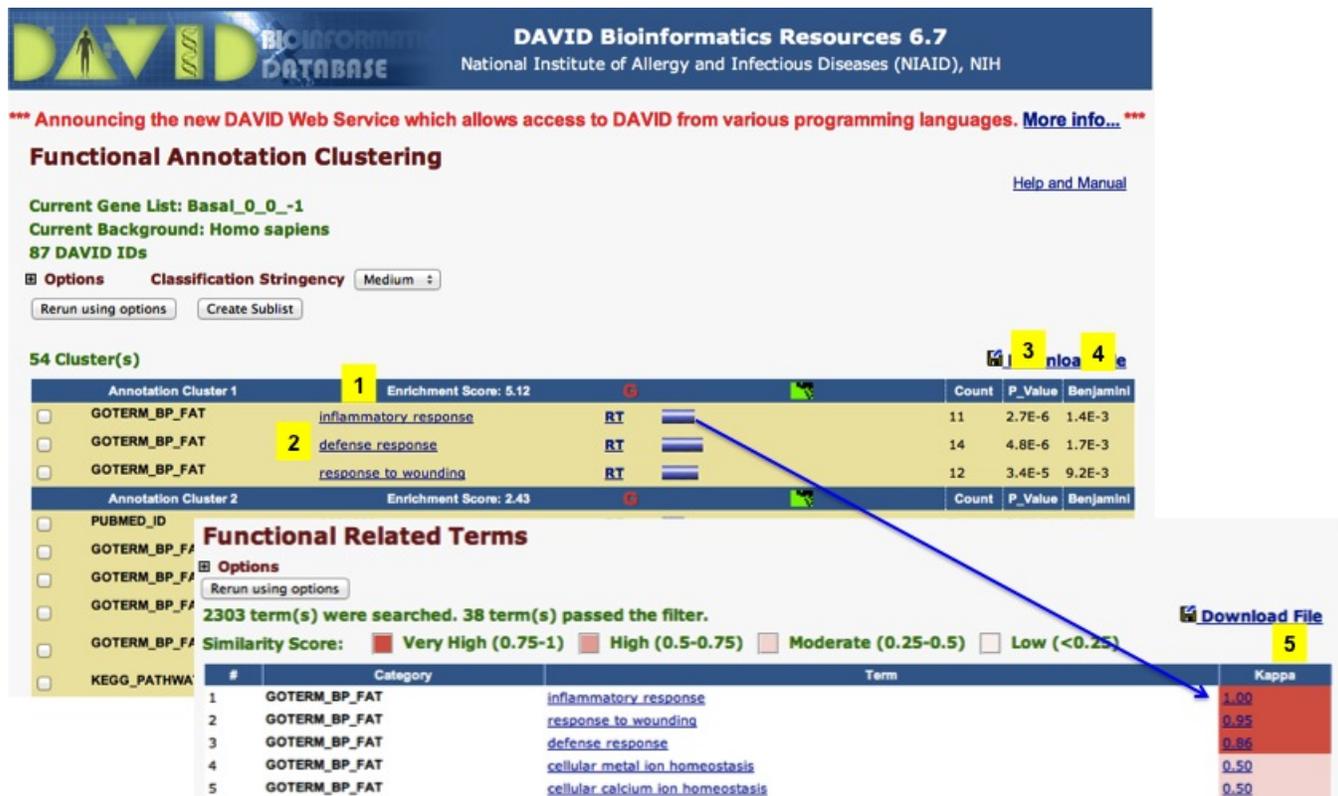


Figura 5.16: Ejemplo de los resultados obtenidos en el análisis de enriquecimiento utilizando DAVID. 1. Puntuación de enriquecimiento, en listado del mayor al menor. 2. Nombres de las categorías de los genes que se asocian. 3. p-value. 4. Estadísticos de Benjamini. 5. Estadístico kappa.



Los resultados para el estado **0 0 -1** (Cuadro 5.10) para ambas condiciones (basal y estimulado con LPG) mostraron que las principales vías inhibidas son las que incluyen genes que están relacionados con la inflamación, respuesta inmune y al daño. Adicionalmente, en el caso de la condición donde se estimula con LPG, la regulación de la producción de citoquinas esta inhibida. Es importante tomar en cuenta que los genes incluidos en este estado son aquellos que están inhibidos en pacientes LCD y no en LCL, lo que podría indicar que hay genes de la respuesta inmune en pacientes con LCD inhibidos desde el estado basal y continúan así ante el estímulo con LPG.

Estado	Vías enriquecidas	No. de genes	p-value	ESTADISTICOS	
				Bonferroni	Benjamini
0 0 -1					
BASAL	inflammatory response	11	2.67E-06	0.0029	0.0014
Enrichment Score: 5.12	defense response	14	4.82E-06	0.0052	0.0017
	response to wounding	12	3.40E-05	0.0361	0.0092
ESTIMULADO	inflammatory response	13	3.65E-07	0.0005	0.0005
Enrichment Score: 5.2	defense response	17	4.09E-07	0.0006	0.0003
	response to wounding	14	1.09E-05	0.0158	0.0053
	regulation of cytokine production	7	6.54E-04	0.6159	0.0833

Cuadro 5.10: Resultados del análisis de enriquecimiento para el estado 0 0 -1 en células NK en estado basal y estimuladas con LPG.

Con respecto a los genes analizados para el estado 0 -1 0, donde aquellos genes inhibidos se encontraban en pacientes con LCD comparados con los controles, las vías enriquecidas para las células en estado basal fueron las de genes que no estaban involucrados en una



respuesta inmune sino en proyecciones celulares (Cuadro 5.11). Por otro lado, cuando se observaron los resultados de los genes para la condición estimulada con LPG se observó el mismo fenómeno que en el estado 0 0 -1, ya que, genes relacionados con la inflamación se encuentran inhibidos en este estado.

				ESTADISTICOS	
	Vías enriquecidas	No. de genes	p-value	Bonferroni	Benjamini
Estado					
0_1_0					
BASAL	cell leading edge	6	0.00121	0.1518	0.1518
Enrichment Score: 2.13	ruffle	4	0.006844	0.6070	0.3731
	cell projection	10	0.018795	0.9243	0.2757
	cell projection	5	0.019095	0.9780	0.3173
ESTIMULADO	response to wounding	12	6.27E-04	0.5508	0.1080
Enrichment Score: 2.73	defense response	12	0.002083	0.9301	0.1449
	inflammatory response	8	0.005214	0.9987	0.2120

Cuadro 5.11: Resultados del análisis de enriquecimiento para el estado 0 -1 0 en células NK en estado basal y estimuladas con LPG.

Para el estado donde existían genes inhibidos en los pacientes con LCD comparados con controles o con pacientes con LCL (0 -1 -1), el análisis de enriquecimiento para el estado basal mostró que las vías que contienen genes inhibidos involucraban más bien genes constitutivos de la célula. El análisis de las células estimuladas con LPG mostró que los genes involucrados son aquellos que participan en vías de señalización durante la inflamación, respuesta a daño y respuesta inmune. Algo que destacaba en este análisis era el score de enriquecimiento tan alto (11.4) y el número de genes involucrados iba de entre 10 a 32



(Cuadro 5.12).

Estado	Vías enriquecidas	No. de genes	p-value	ESTADISTICOS	
				Bonferroni	Benjamini
0 -1 -1					
BASAL	signal	46	8.82E-08	1.89E-05	9.44E-06
Enrichment Score: 5.11	signal peptide	46	1.07E-07	4.57E-05	4.57E-05
	plasma membrane	53	3.77E-07	5.47E-05	5.47E-05
	glycosylation site:N-linked	52	3.88E-07	1.66E-04	8.31E-05
	disulfide bond	41	9.07E-07	1.94E-04	6.47E-05
	disulfide bond	40	1.17E-06	5.00E-04	1.67E-04
	glycoprotein	52	1.33E-06	2.84E-04	7.09E-05
	membrane	65	3.96E-06	8.48E-04	1.41E-04
	topological domain:Cytoplasmic	42	1.55E-05	6.59E-03	1.65E-03
	topological domain:Extracellular	35	6.27E-05	2.65E-02	5.35E-03
	transmembrane region	51	1.54E-04	6.40E-02	1.10E-02
	transmembrane	51	1.82E-04	3.82E-02	4.85E-03
	integral to membrane	58	2.85E-04	4.05E-02	5.89E-03
	intrinsic to membrane	59	3.97E-04	5.59E-02	7.17E-03
	receptor	22	9.36E-04	1.82E-01	1.80E-02
ESTIMULADO	defense response	32	1.22E-15	1.77E-12	8.84E-13
Enrichment Score: 11.4	inflammatory response	22	8.43E-13	1.22E-09	4.07E-10
	response to wounding	25	3.32E-11	4.80E-08	1.20E-08
	inflammatory response	10	7.65E-09	1.90E-06	1.90E-06

Cuadro 5.12: **Resultados del análisis de enriquecimiento para el estado 0 -1 -1 en células NK en estado basal y estimuladas con LPG.**

En el caso del estado -1 -1 0, es decir, genes inhibidos en ambos grupos de pacientes con respecto a los controles, las vías involucradas en el análisis de enriquecimiento se asociaban con la señalización de péptidos, glicoproteínas, glicosilación, etc. (Cuadro 5.13). A diferencia de comparaciones anteriores, no existían genes involucrados directamente con



la respuesta inmune. Sería interesante revisar si algún o algunos de los genes involucrados llevan a la producción de proteínas importantes para la activación de la célula NK.

				ESTADISTICOS	
	Vías enriquecidas	No. de genes	p-value	Bonferroni	Benjamini
Estado					
-1 -1 0					
BASAL	signal	40	2.17E-08	4.660E-06	4.660E-06
Enrichment Score: 6.16	signal peptide	40	2.59E-08	1.360E-05	1.360E-05
	disulfide bond	34	1.90E-06	4.080E-04	2.040E-04
	glycoprotein	43	1.96E-06	4.220E-04	1.410E-04
	glycosylation site:N-linked	41	5.44E-06	2.856E-03	1.429E-03
	disulfide bond	32	8.83E-06	4.633E-03	1.547E-03
ESTIMULADO	signal	41	2.86E-09	5.800E-07	5.800E-07
Enrichment Score: 5.43	signal peptide	41	3.45E-09	1.490E-06	1.490E-06
	disulfide bond	37	2.80E-08	5.690E-06	2.840E-06
	disulfide bond	36	4.62E-08	1.990E-05	9.970E-06
	glycoprotein	43	9.85E-07	2.000E-04	6.660E-05
	glycosylation site:N-linked	40	7.96E-06	3.434E-03	1.146E-03
	extracellular region part	16	6.95E-04	1.002E-01	5.144E-02
	Secreted	19	0.001092	1.989E-01	1.996E-02
	extracellular region	24	0.001862	2.466E-01	6.836E-02
	extracellular space	12	0.003132	3.793E-01	7.640E-02

Cuadro 5.13: Resultados del análisis de enriquecimiento para el estado -1 -1 0 en células NK en estado basal y estimuladas con LPG.

El análisis del estado 1 0 -1 en condiciones basales mostró que 15 genes de la respuesta inmune tenía un score de los más altos para los análisis que se hicieron (6.47). Mientras que para la condición estimulada con LPG, el score fue mucho más bajo (2.45) y el cluster incluía una gran cantidad de genes, entre los que estaban genes relacionados con la la



respuesta inmune, puentes disulfuro, receptores, proteína G, etc. (Cuadro 5.14 y 5.15)

	Vías enriquecidas	No. de genes	p-value	ESTADISTICOS	
				Bonferroni	Benjamini
Estado					
1_0_-1					
BASAL	disulfide bond	34	8.45E-13	2.036E-10	2.036E-10
Enrichment Score: 6.47	disulfide bond	34	2.00E-12	3.194E-10	3.194E-10
	defense response	15	3.78E-08	2.882E-05	7.205E-06
	immune response	15	1.58E-07	1.202E-04	2.404E-05
	signal	28	5.18E-07	8.290E-05	2.763E-05
	signal peptide	28	5.90E-07	1.422E-04	7.113E-05
	Secreted	20	6.23E-07	9.973E-05	2.493E-05
	glycoprotein	29	4.24E-05	6.757E-03	9.682E-04
	extracellular region	20	1.10E-04	8.792E-03	8.792E-03
	glycosylation site:N-linked	27	1.81E-04	4.264E-02	7.237E-03
	extracellular region part	11	3.54E-03	2.468E-01	5.510E-02

Cuadro 5.14: Resultados del análisis de enriquecimiento para el estado 1 0 -1 en células NK en estado basal.



Análisis de genes y proteínas de células NK y monocitos de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y difusa

	Vías enriquecidas	No. de genes	ESTADÍSTICOS		
			p-value	Bonferroni	Benjamini
ESTIMULADO	disulfide bond	24	1.30E-07	2.463E-05	2.463E-05
Enrichment Score: 2.45	disulfide bond	24	2.29E-07	2.927E-05	2.927E-05
	behavior	11	4.50E-07	1.940E-04	1.940E-04
	chemotaxis	7	5.03E-06	2.166E-03	1.083E-03
	taxis	7	5.03E-06	2.166E-03	1.083E-03
	locomotory behavior	8	9.55E-06	4.107E-03	1.371E-03
	Secreted	16	1.56E-05	1.998E-03	9.993E-04
	extracellular region	17	2.68E-05	1.257E-03	1.257E-03
	chemotaxis	5	3.65E-05	4.659E-03	1.555E-03
	defense response	9	2.54E-04	1.037E-01	2.165E-02
	signal	20	2.94E-04	3.697E-02	9.373E-03
	signal peptide	20	3.20E-04	5.870E-02	2.979E-02
	purinoceptor	3	0.001664	1.879E-01	6.702E-02
	cell motion	7	0.001928	5.647E-01	1.120E-01
	inflammatory response	6	0.002032	5.838E-01	1.038E-01
	nucleotide receptor activity, G-protein coupled	3	0.002292	0.2032	0.2032
	purinergic nucleotide receptor activity	3	0.002292	0.2032	0.2032
	cell membrane	14	0.003258	0.3415	0.0579
	response to wounding	7	0.003335	0.7631	0.1341
	purinergic nucleotide receptor activity	3	0.003519	0.2946	0.1601
	nucleotide receptor activity	3	0.003519	0.2946	0.1601
	GPCR, rhodopsin-like	8	0.003552	0.3590	0.0851
	glycoprotein	21	0.003963	0.3985	0.0616
	glycosylation site:N-linked	20	0.006087	0.6846	0.2506
	Belongs to the G-protein coupled receptor 1 family.	7	0.012332	0.9323	0.5924
	integral to plasma membrane	9	0.013176	0.4639	0.2678
	GPCR, rhodopsin-like superfamily	7	0.01424	0.8335	0.2259
	intrinsic to plasma membrane	9	0.014962	0.5076	0.2104
	g-protein coupled receptor	7	0.018576	0.9093	0.1813
	receptor	10	0.019539	0.9200	0.1766
	Neuroactive ligand-receptor interaction	4	0.024774	0.3945	0.2219
	transducer	7	0.025072	0.9612	0.2072
	plasma membrane	17	0.03115	0.7740	0.3105
	peptide receptor activity	3	0.031939	0.9598	0.5522
	peptide receptor activity, G-protein coupled	3	0.031939	0.9598	0.5522
	G protein-coupled receptor	3	0.036601	0.9915	0.2448
	topological domain:Extracellular	13	0.044497	0.9998	0.6588
	cell surface receptor linked signal transduction	10	0.067528	1.0000	0.8479
	peptide binding	3	0.088906	0.9999	0.5361
	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	7	0.090993	1.0000	0.9110
	topological domain:Cytoplasmic	13	0.159677	1.0000	0.9741
	GO:0044459~plasma membrane part	9	0.246552	1.0000	0.8505
	GO:0016021~integral to membrane	16	0.496659	1.0000	0.9823
	intrinsic to membrane	16	0.567188	1.0000	0.9874
	membrane	17	0.584386	1.0000	0.9888
	transmembrane region	13	0.660692	1.0000	1.0000
	transmembrane	13	0.670029	1.0000	0.9957

Cuadro 5.15: Resultados del análisis de enriquecimiento para el estado 1 0 -1 en células NK estimuladas con LPG.



De todos los análisis de enriquecimiento que se hicieron, el estado 1 -1 -1 es el que contenía el menor número de genes. Sin embargo, se consideró importante analizarlo para conocer como estaban agrupados los genes sobreexpresados en pacientes LCL pero inhibidos en pacientes con LCD (Cuadro 5.16). El resultado mostró que independientemente de la condición (basal o estimulado), el análisis de enriquecimiento estaba representado por genes relacionados con diferentes aspectos de la respuesta inmune tales como la inflamación, actividad de citocinas y de receptores de citocinas.



Estado	Vías enriquecidas	No. de genes	p-value	ESTADISTICOS	
				Bonferroni	Benjamini
1_-1_-1					
BASAL	response to wounding	8	6.67E-07	2.71E-04	2.71E-04
Enrichment Score: 3	inflammatory response	7	7.65E-07	3.11E-04	1.55E-04
	inflammation	4	1.07E-06	8.27E-05	8.27E-05
	defense response	7	3.03E-05	0.0122	0.0041
	inflammatory response	4	3.33E-05	0.0026	0.0013
	cytokine	4	4.19E-04	0.0318	0.0107
	cytokine activity	4	0.001075	0.0844	0.0844
	chemotaxis	3	0.001603	0.1162	0.0304
	immune response	5	0.005833	0.9070	0.3781
	extracellular region part	5	0.006801	0.2793	0.2793
	regulation of cell proliferation	5	0.009263	0.9771	0.4673
	Secreted	6	0.009953	0.5371	0.1428
	extracellular space	4	0.018299	0.5879	0.3581
	Cytokine-cytokine receptor interaction	3	0.034567	0.4875	0.4875
	extracellular region	5	0.080157	0.9819	0.7373
	signal	6	0.118575	0.9999	0.7505
	signal peptide	6	0.121095	0.9998	0.9859
ESTIMULADO	inflammatory response	6	3.79E-05	0.0129	0.0129
Enrichment Score: 2.41	response to wounding	6	3.79E-04	0.1215	0.0627
	defense response	6	7.49E-04	0.2261	0.0819
	inflammatory response	3	0.002322	0.1697	0.1697
	signal	5	0.36228	1.0000	0.9817
	signal peptide	5	0.367055	1.0000	0.9964

Cuadro 5.16: Resultados del análisis de enriquecimiento para el estado 1 -1 -1 en células NK en estado basal y estimuladas con LPG.



- Correlación de los datos de microarreglos con la literatura

Con todos los datos obtenidos en el análisis de enriquecimiento, se observó que muchos de los genes de la respuesta inmune en pacientes con LCD se encontraban inhibidos. Con estos resultados y basados en los antecedentes que se tenían para realizar este trabajo, se buscó si genes de las vías de señalización de TLRs, JAK/STAT y citocinas se encontraban inhibidos o sobreexpresados en las células NK de ambos grupos de pacientes (Figura 5.17).

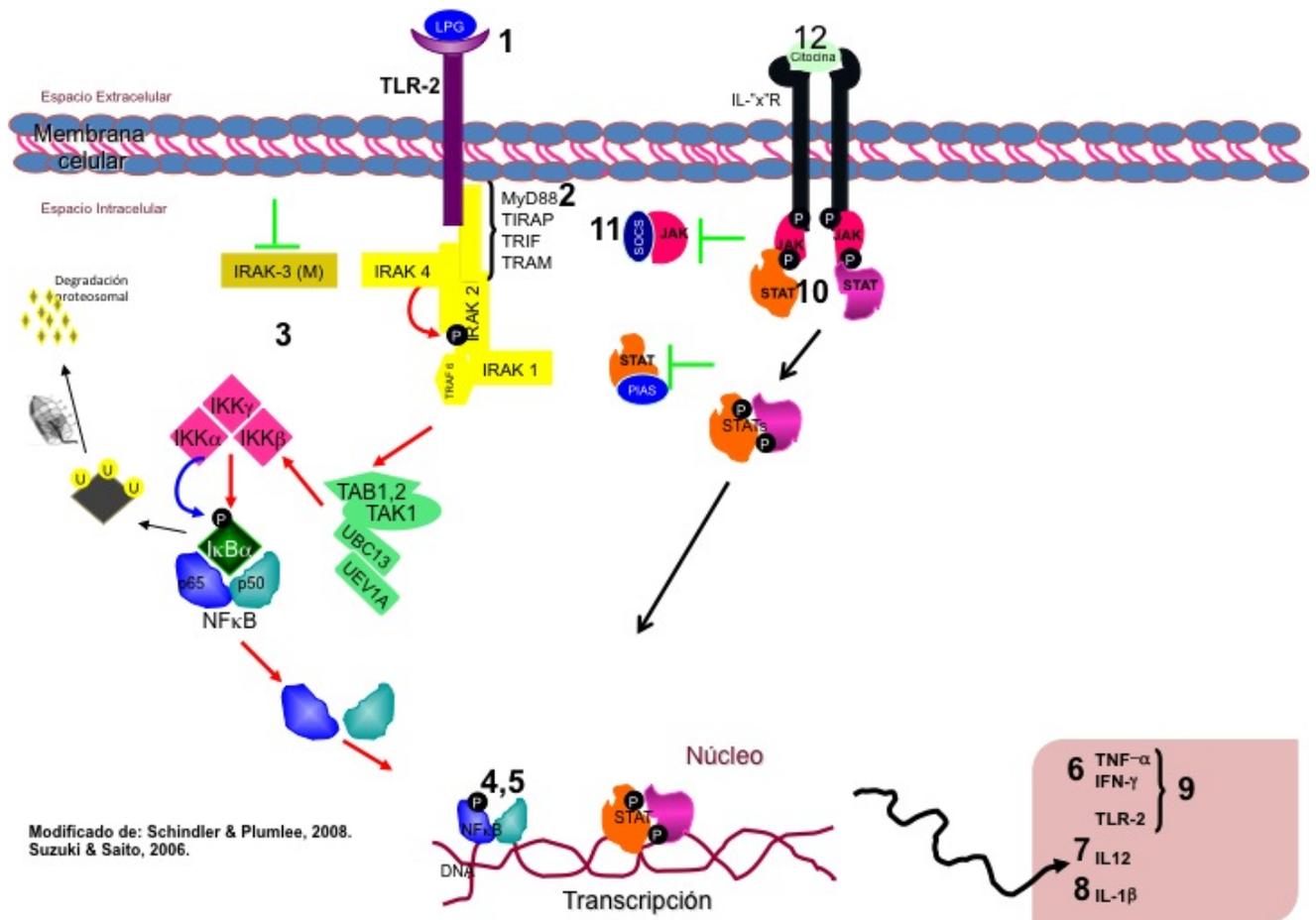


Figura 5.17: Antecedentes de la participación de la vías de señalización de TLRs y JAK/STAT en la leishmaniasis. (Pie de figura en la siguiente página)



1) TLR-2 de células NK reconoce el LPG de *L. major*. (Becker, *et al.*, 2003). 2) MyD88 es esencial para el reconocimiento del LPG de *L. major* (de Veer, *et al.*, 2003). 3) Hay un aumento en la expresión de proteínas de la vía de TLRs en células NK estimuladas con LPG de *L. major* (Datos no publicados). 4) Aumento en la translocación de NF- κ B en células NK estimuladas con LPG de *L. major* (Becker, *et al.*, 2003). 5) Aumento en la translocación de NF- κ B en células dendríticas estimuladas con LPG de *L. mexicana* (Argueta, *et al.*, 2008). 6) Secreción de TNF- α e IFN- γ en células NK de sujetos sanos estimuladas con LPG de *L. major* (Becker, *et al.*, 2003). 7) Secreción de IL-12 por células dendríticas de sujetos sanos estimuladas con LPG de *L. mexicana* (Argueta, *et al.*, 2008). 8) Aumento de IL-1 β en monocitos, sueros y lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y difusa. (Fernández, *et al.*, 2012). 9) Aumento de TLR-2 en células NK de pacientes con LCL (33%) y LCD (6%) estimuladas con LPG de *L. major* y aumento en la secreción de TNF- α (100%) e IFN- γ (212%) en pacientes con LCL y una inhibición del 21% y 52% respectivamente en células de pacientes con LCD (Datos no publicados). 10) Ratones C57BL/6 STAT-1^{-/-} infectados con *Leishmania major* generan lesiones más grandes con mayor número de parásitos (Rosas, *et al.*, 2003). 11) Aumento en la expresión del gen SOCS-3 y disminución de la fosforilación de STAT-1 en macrófagos humanos infectados con *L. donovani* (Bertholet *et al.*, 2003). 12) *L. donovani* atenúa la fosforilación que se induce por IFN- γ en monocitos humanos y U-973 (Shadab y Nahib, 2011).



De acuerdo a los antecedentes anteriores, se buscaron en las listas de genes diferencialmente expresados, aquellos que estaban involucrados en las vías antes mencionadas para observar si se encontraban inhibidos o sobreexpresados, y analizar si esto se correlacionaba con el cuadro clínico o bien, con la respuesta inmune que presenta cada grupo de pacientes. Esta comparación se hizo para la lista de genes en condiciones basales (Cuadro 5.17 y Figura 5.18) o estimuladas con LPG de *Leishmania mexicana* 20 μ g/mL durante 6 horas (Cuadro 5.17 y Figura 5.19).

El análisis de los genes específicos que codifican para proteínas de la vía de los TLRs en células NK en condiciones basales reveló que el receptor TLR-2 en pacientes con LCD estaba inhibido en comparación con los pacientes con LCL. Por otro lado, el receptor TLR-2 estaba sobreexpresado en pacientes con LCD al compararlo con los controles. Al analizar los genes que codifican para proteínas intracelulares involucradas en la activación de la vía de TLRs, encontramos que el gen para la proteína IRAK-3 se encontraba inhibido en pacientes con LCD al compararlo con los pacientes con LCL (-14.42) y en menor grado al compararlo con los controles (-5.06). En contraste IRAK-3 se encontraba sobreexpresado en pacientes con LCL (2.82). Otros genes que se encontraron inhibidos en pacientes con LCD, con respecto a pacientes con LCL, fueron $I\kappa B\alpha$ (necesario para la activación de la vía de señalización a través de TLRs y de la translocación nuclear de NF- κ B) y NF- κ B2 (NF- κ B-p52).



Vía	Símbolo	Contrastes			Contrastes		
		BASAL			ESTIMULADO		
		LCL_B vs C_B LFCh (real)	LCD_B vs C_B LFCh (real)	LCD_B vs LCL_B LFCh (real)	LCL_LPG vs C_LPG LFCh (real)	LCD_LPG vs C_LPG LFCh (real)	LCD_LPG vs LCL_LPG LFCh (real)
TLRs	Localización						
	Membranal	TLR-2	1.04 (2.05)	-1.86 (-3.63)			-1.47 (-2.77)
	Intracelular	IRAK-2				-1 (-2)	-1.72 (-3.3)
		IRAK-3	1.5 (2.82)	-2.34 (-5.06)	-3.85 (-14.42)	1.68 (3.2)	-2.29 (-4.9)
		IκB-α	1 (2)		-2.22 (-4.65)		-1.79 (-3.45)
		IκB-β			-1.12 (-2.17)		-1.22 (-2.32)
	Nuclear	NF-κB1					-1.25 (-2.37)
		NF-κB2		-1.26 (-2.4)		-1.57 (-2.96)	-1.77 (-3.41)
JAK/STAT							
	Membranal	IFN-γR2		-1.33 (-2.51)	-1.62 (-3.07)		-1.53 (-2.88)
		IL-12Rβ-2		-1.1 (-2.14)	-1.24 (-2.36)		-1.16 (-2.23)
	Intracelular/ nuclear	STAT-1			-1.27 (-2.41)		-1.47 (-2.77)
		STAT-5A			-1 (-2)		-1.11 (-2.15)
Producción de citocinas							
	Secretadas						
		TNF-α	1.13 (2.18)		-1.19 (-2.28)		1.71 (3.27)
		TNFAIP6	3.25 (9.51)	-2.32 (-4.99)	-5.76 (-54.2)	1.9 (3.73)	-3.98 (-15.78)
		IFN-γ	1.44 (2.71)	1.12 (2.17)			-1.97 (-3.91)

Cuadro 5.17: Genes diferencialmente expresados en células NK en estado basal y estimuladas con LPG de *Leishmania mexicana* para las vías de TLRs, JAK/STAT y producción de citocinas. LFCh= Log₂ Fold Change, el número entre paréntesis a lado del valor de LFCh es el valor real de inhibición o sobreexpresión del gen. Los números escritos en color rojo son valores de los genes que se sobreexpresaron y en color verde los que se inhibieron. C= sujetos sanos (control), LCL= pacientes con LCL, LCD= pacientes con LCD. B= células NK sin estímulo, LPG= células NK estimuladas con LPG.

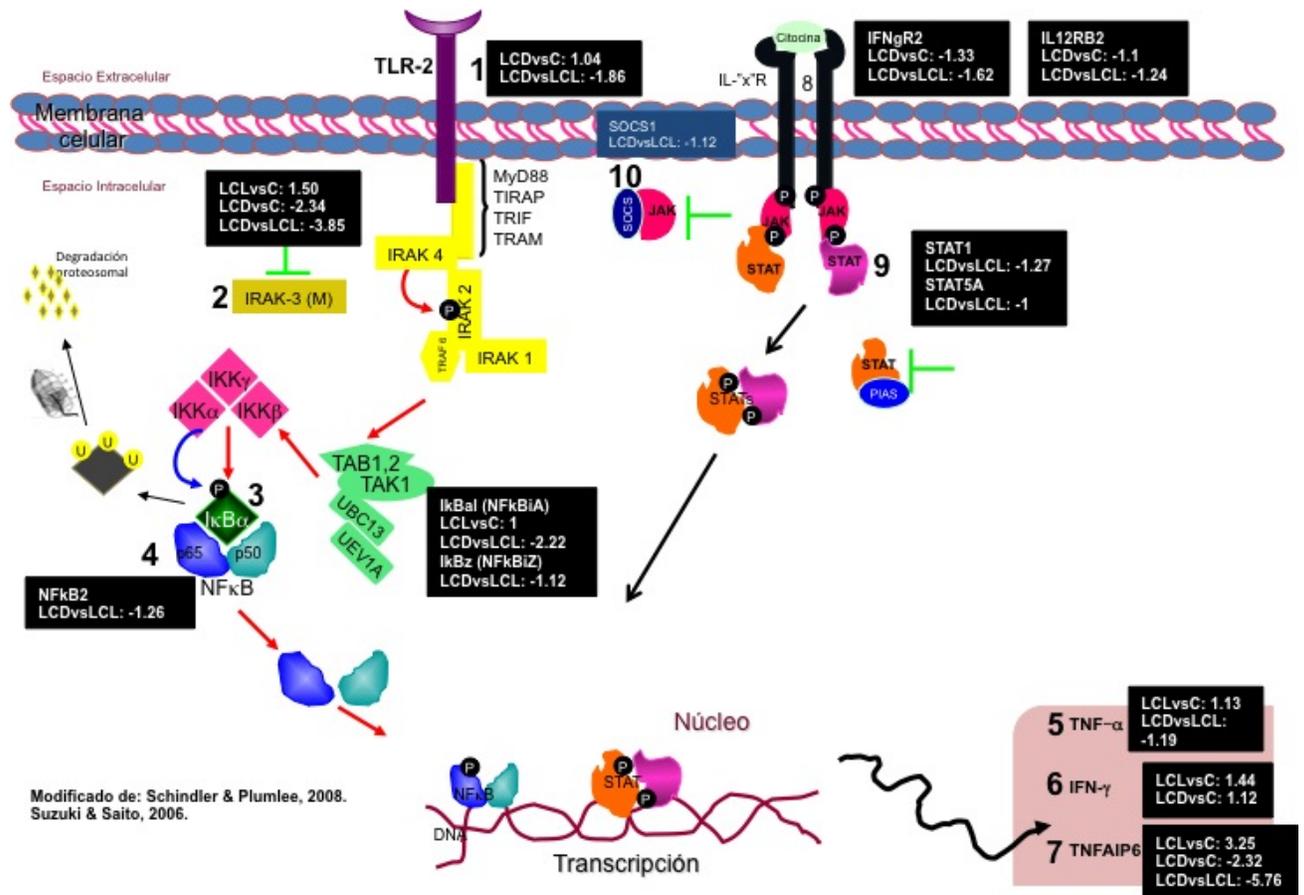


Figura 5.18: Genes diferencialmente expresados en células NK no estimuladas de controles, pacientes con LCL y LCD. Los valores que se presentan de Log Fold Change están en log base 2.



Algunos de los genes que codifican para proteínas de la vía JAK/STAT en células NK en condiciones basales estaban inhibidos en pacientes con LCD, particularmente los genes para los receptores de IFN- γ R2 e IL-12R β 2 que presentaron una inhibición de -3.07 y -2.36, respectivamente, al compararlos con los pacientes con LCL. Al compararlos con los controles sanos encontramos una inhibición de -2.52 y -2.14, respectivamente. El gen que codifica para la proteína STAT-1 (involucrada en una respuesta tipo Th1) también estaba inhibido en pacientes con LCD al compararlo con pacientes con LCL. Así mismo el gen para STAT5A se encontraba inhibido en estos pacientes.

Por otro lado, se observó que el gen que codifica para TNF- α se encontraba inhibido en los pacientes con LCD y sobreexpresado en los pacientes con LCL. El gen para IFN- γ se encontró sobreexpresado en ambos grupos de pacientes, aunque esta sobreexpresión fue mayor en los pacientes con LCL. El gen TNFAIP6 fue el que mostró el Log₂ Fold Change más alto en este análisis, mostrando que estaba inhibido en los pacientes con LCD -54.2 veces al compararlo con los pacientes con LCL y -4.99 veces al compararlo con la expresión en controles. En contraste con los pacientes con LCD este gen estaba sobreexpresado en pacientes con LCL 9.5 veces cuando se comparó con controles.

El análisis también se realizó en células estimuladas con LPG de *Leishmania mexicana* (20 μ g/mL) durante 6 hr. El estímulo con LPG redujo la magnitud de la inhibición del gen que codifica para TLR-2 en células NK de pacientes con LCD de -3.63 a -2.77 al compararlo con pacientes con LCL. En contraste, el estímulo con LPG aumentó aún más el grado de inhibición de IRAK-3 en los pacientes con LCD (de -14.41 a -15.78) cuando se comparó con el grupo de LCL y no se modificó el grado de inhibición del gen al hacer la comparación con los controles. En pacientes con LCL el estímulo aumentó la sobreexpresión de IRAK-3 al compararlo con controles. El estímulo con LPG mostró una inhibición



en la expresión del gen que codifica para IRAK-2 en los pacientes con LCD al compararla con los pacientes con LCL y con los controles (-3.3 y -2, respectivamente). Otro gen cuyo grado de inhibición permaneció igual a pesar del estímulo con LPG fue el gen codifica para $I\kappa B\alpha$ en pacientes con LCD con respecto a pacientes con LCL. Este mismo gen se encontró inhibido en pacientes con LCD al compararlo con controles. Adicionalmente, en pacientes con LCD la inhibición del gen para NF- $\kappa B2$ (NF- κB -p52) aumentó cuando se comparó con el grupo de LCL (de -2.4 a -3.41) y así mismo, se encontró inhibido cuando se comparó con controles (-2.96). Un gen que se inhibió con el estímulo de LPG en pacientes con LCD fue NF- $\kappa B1$ (NF- κB -p50) al compararlo con los pacientes con LCL.

Adicionalmente, se observó que los genes que codifican para los receptores IFN- $\gamma R2$ e IL-12R β -2 continuaron inhibidos en pacientes LCD al compararlos con pacientes con LCL y con controles. El grado de inhibición del gen IFN- $\gamma R2$ aumentó ligeramente con el estímulo. El grado de inhibición del gen STAT-1 no se modificó con el estímulo en pacientes con LCD al compararlo con los pacientes con LCL. El estímulo también mostró inhibición de este gen en pacientes con LCD al comparar con los controles.

El análisis del gen que codifica para TNF- α mostró que el estímulo incrementó la inhibición 1.6 veces en los pacientes con LCD al compararlo con pacientes LCL y se sobreexpresó 3.27 veces cuando se comparó con los controles. Por otro lado, el gen TNFAIP6 aumentó su inhibición con el estímulo en los pacientes LCD cuando se comparó con los pacientes con LCL y al compararlo con los controles la inhibición del gen aumentó 10 veces. Este mismo gen continuó sobreexpresado en los pacientes con LCL, aunque esta sobreexpresión disminuyó de 9.51 a 3.27.

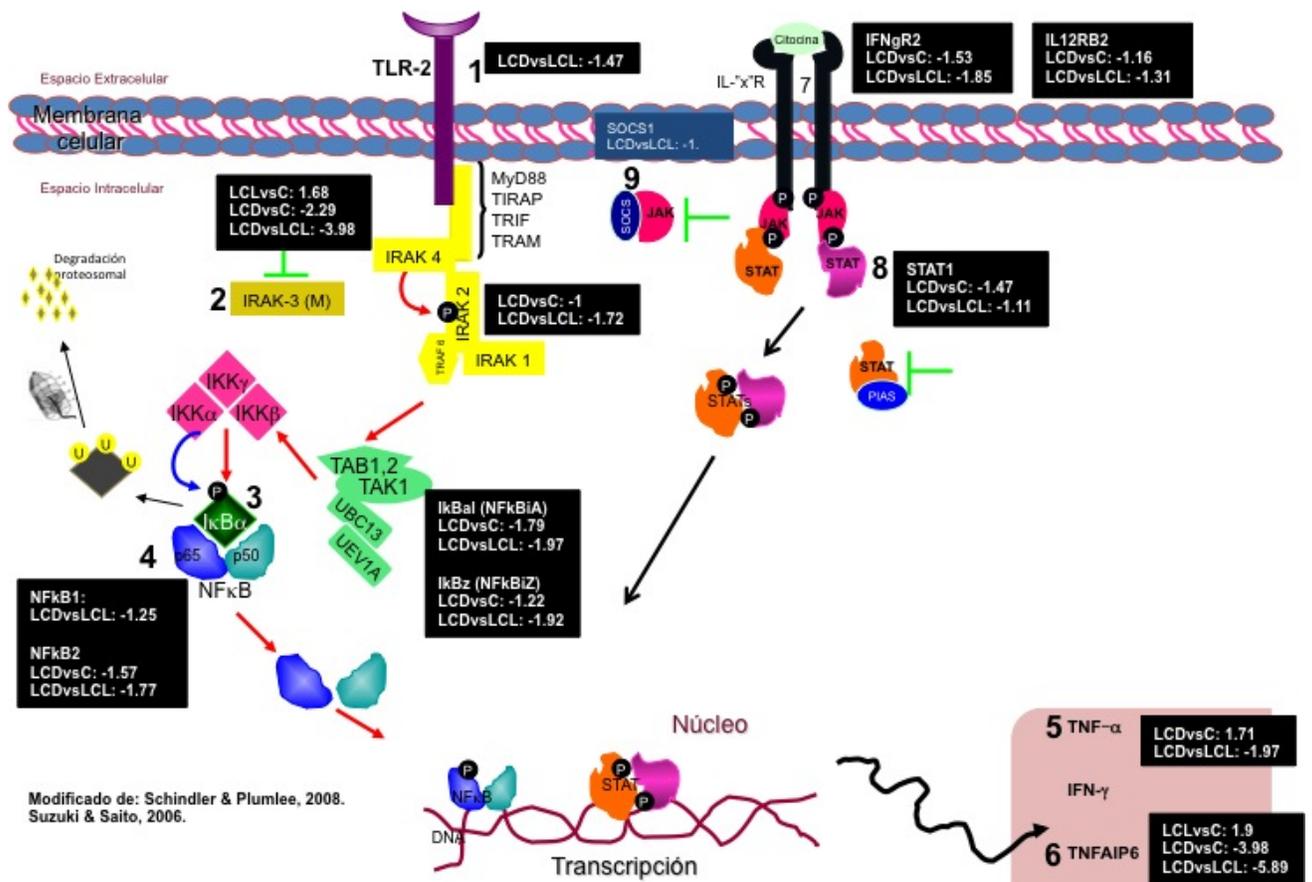


Figura 5.19: Genes diferencialmente expresados en células NK estimuladas con LPG de *Leishmania mexicana* 20 μ g/mL durante 6 hr de pacientes con LCL y LCD. Los valores que se presentan de log Fold Change están en log base 2.



En resumen:

1. Los genes que codifican para TLR-2, IRAK-3, I κ B- α y NF- κ B2 se encontraban inhibidos en los pacientes con LCD en las células NK en estado basal y estimuladas con LPG cuando se comparaban con los pacientes con LCL. Y con el estímulo, los genes: IRAK-2 y NF- κ B1 se inhibieron al hacer esta misma comparación. Estos mismos genes (excepto NF- κ B1) se encontraban inhibidos en células NK estimuladas con LPG de pacientes con LCD al compararlos con los controles.
2. Algunos genes (IFN- γ R2, IL-12R β -2 y STAT-1) que codifican para proteínas involucradas en la activación de la vía JAK/STAT se encontraban inhibidos en células NK de pacientes con LCD en estado basal y estimuladas con LPG, al compararlos con los pacientes con LCL y con los controles.
3. Los genes que codifican para TNF- α , TNFAIP6 e IFN- γ se encontraban sobreexpresados en células NK en estado basal de pacientes con LCL, al compararlos con los controles. En células de pacientes con LCD el gen que codifica para TNF- α se encontraba inhibido tanto en estado basal como estimuladas con LPG, al compararlas con los pacientes con LCL. El gen TNFAIP6 se mantuvo inhibido en ambas condiciones celulares (basal y estimuladas con LPG) en los pacientes con LCD al, comparar con los pacientes con LCL y los controles.



5.4.3. Validación por PCR en tiempo real

Con los resultados obtenidos con los ensayos de microarreglos se realizó una selección de los genes que ayudarían a validar los resultados. Los genes seleccionados fueron: TLR-2, IRAK-2 y 3, NF- κ B1 y 2, IFN- γ R2, IL-12R β 2, STAT-1, STAT-5A, IFN- γ , TNF- α y TNFAIP6.

Para cada una de las sondas se corrió una curva de validación para verificar la eficiencia en la amplificación y la sensibilidad para cada gen (Figura 5.20).

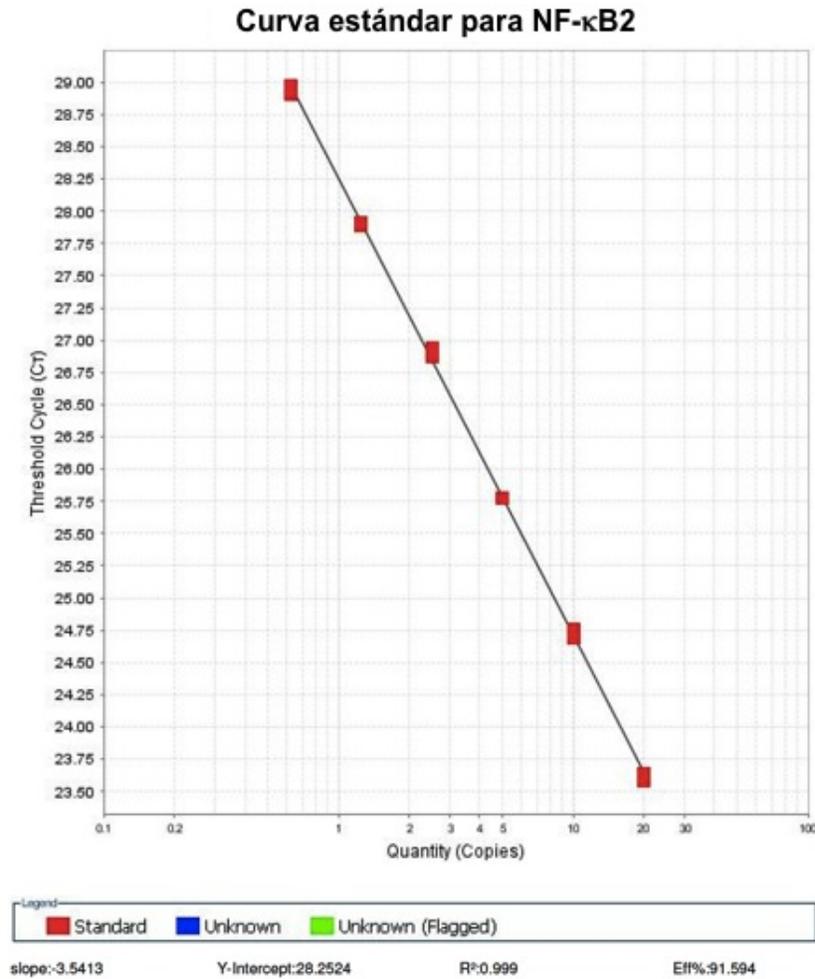


Figura 5.20: Ejemplo de una curva de validación. Se utilizó la misma muestra para todas las curvas, las cuales se hicieron a concentraciones seriales 1:2 desde 20 ng hasta 0.625 ng. El valor ideal de la pendiente debe ser de 3.32 +/- 10% para verificar la eficiencia del sistema (primers y sonda). El índice de correlación ideal es $R^2=0.99$ para verificar la precisión del sistema (reproducibilidad). Los Ct deben estar entre 20 a 30 ciclos. La eficiencia de la amplificación ideal debe ser mayor al 90%. En caso de obtener eficiencias menores al 90% existe la posibilidad de emplear la fórmula: $1+E^{-\Delta \Delta C_t}$, donde E es el valor de la eficiencia que se obtiene cuando se hace la validación.



No todas las sondas tuvieron una amplificación mayor al 90% (Cuadro 5.18), posteriormente se ajustarán con la fórmula: $1+E^{-\Delta\Delta^{Ct}}$.

Sonda	Eficiencia %	R ²	Pendiente	Ct
TLR-2	81	0.997	-3.7	23.5-29.4
IRAK-2	82	0.995	-3.8	24.4-30
IRAK-3	91.5	0.999	-3.5	24.7-30
NF-κB1	85	0.999	-3.7	24-29.5
NF-κB2	91.6	0.999	-3.5	23.6-28.9
IFN-γR2	80	0.997	-3.9	23.3-29.3
IL-12Rβ2	81.3	0.950	-3.8	28-33.7
STAT-1	84	0.999	-3.7	21.7-27.4
STAT-5A	82	0.998	-3.8	25-31
IFN-γ	80	0.998	-3.9	27-33
TNF-α	81.2	0.998	-3.8	25.6-31.5
TNFIP6	82	0.999	-3.8	22.2-28
GAPDH	92.5	0.998	-3.5	21-26

Cuadro 5.18: Datos de las curvas de amplificación para analizar eficiencia del sistema (sondas y primers) y reproducibilidad.

Se finalizó todo el trabajo de validación de las sondas. En un paso posterior se continuará con el análisis de PCR en tiempo real con muestras de pacientes y controles.



5.5. Proteómica

Para el análisis de proteínas en suero se juntaron los sueros de 5 individuos por cada grupo de estudio (excepto en las pacientes LCD), los grupos fueron:

1. Mezcla de 5 sueros de mujeres control
2. Mezcla de 5 sueros de hombres control
3. Mezcla de 5 sueros de mujeres con LCL
4. Mezcla de 2 sueros de mujeres con LCD
5. Mezcla de 5 sueros de hombres con LCL
6. Mezcla de 5 sueros de hombres con LCD

5.5.1. Geles 2D

Los geles bidimensionales se tiñeron con azul de coomassie, se escanearon y se obtuvieron las imágenes digitales de los 6 grupos de estudio, las cuales se analizaron para conocer aquellas proteínas diferencialmente expresadas entre cada grupo (Figura 5.21).



5.5.2. Identificación de proteínas

De las manchas de proteína se obtuvieron 21 spots (Figura 5.22) y se analizaron por espectrometría de masas.

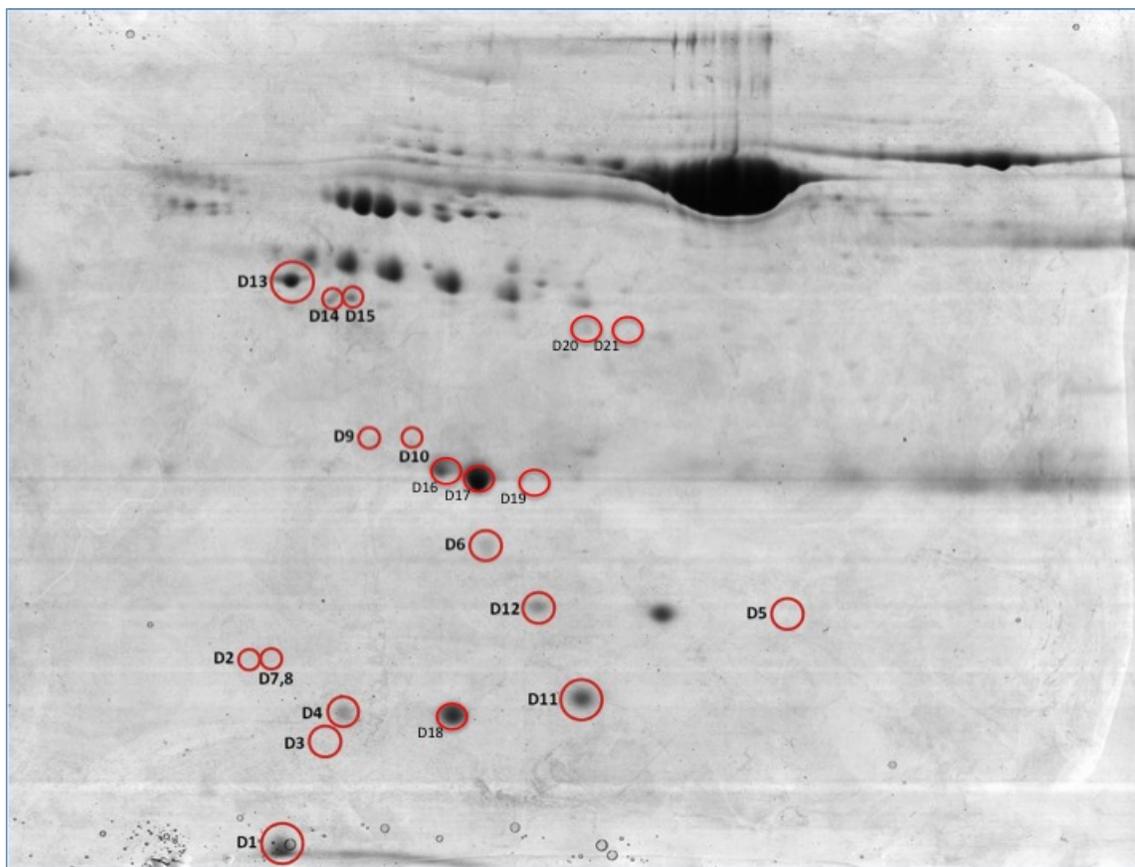


Figura 5.22: **Gel bidimensional de muestras de suero teñido con azul de coomassie.** Los círculos rojos corresponden a los spots que se cortaron y analizaron por espectrometría de masas.

De los 21 spots analizados se lograron identificar 15 proteínas (Cuadro 5.19) con un ProtScore de 2.0 (99%) que correspondieron a 7 proteínas distintas. Cada uno de los spots estaba



localizado en diferente peso molecular y punto isoeléctrico. Aquellas proteínas identificadas como la misma proteína pero localizada en diferente spot podría corresponder a distintas isoformas de la misma proteína. Para cada identificación se obtuvieron: el porcentaje de cobertura de la proteína, el número de péptidos identificados y el "unused" (refleja la confianza de la proteína identificada).

# de spot	Proteína identificada	% Cov	# péptidos	Unused	Mujeres control	Hombres control	Mujeres LCL	Mujeres LCD	Hombres LCL	Hombres LCD
2	Apolipoproteína AI	14.82	6	14.82	0	0	0	3	2	0
5	Haptoglobina	38.4	9	18.01	1	2	1	3	3	2
6	Proteína 4 de unión a retinol	68.7	6	13.9	1	2	2	2	2	1
10	Complemento C4-b	16.1	6	13.7	1	0	2	2	1	0
11	Transtiretina	73.15	14	30	2	3	3	2	2	1
12	Haptoglobina	46.6	12	36.31	1	2	3	3	2	3
13	C3 Complemento	42.2	10	42.2	2	3	3	3	3	1
14	C3 Complemento	30.3	21	43.42	1	2	2	0	0	0
15	C3 Complemento	28.4	8	28.15	1	3	2	1	1	0
16	Apolipoproteína AI	43.1	7	15.57	2	3	2	2	2	1
17	Apolipoproteína AI	56.9	12	25.61	1	3	2	2	2	1
18	Haptoglobina	21.2	7	14.02	0	2	2	2	2	1
19	Apolipoproteína AI	60.7	6	18.01	0	2	3	2	2	1
20	Alpha 1 antitripsina	48.3	5	17.23	0	0	0	2	1	0
21	Alpha 1 antitripsina	36.6	5	13.58	0	1	0	2	1	0

Cuadro 5.19: **Identificaciones por espectrometría de masas.** 0= Ausente; 1,2,3= intensidad del spot por proteína entre cada grupo. % Cov= Porcentaje de cobertura de la proteína identificada. # péptidos= Número de péptidos identificados con una contribución de 2 (99 % de confianza).



Las proteínas identificadas incluyeron:

1. La apolipoproteína AI que fue identificada en 4 de las 15 muestras (spots 2, 16, 17 y 19), que posiblemente reflejan isoformas diferentes de la misma proteína. En el caso del spot 2, la proteína solo se encontró presente en el grupo de mujeres con LCD y en menor grado en hombres con LCL. La proteína de los spots 16 y 17 se encontró en todos los grupos, aunque la expresión fue menos evidente en hombres con LCD y más intensa en hombres sanos. La proteína del spot 19 se encontró muy expresada en mujeres con LCL, no se encontró en mujeres control y con muy baja expresión en hombres con LCD.
2. La haptoglobina fue identificada en 3 spots diferentes (5, 12 y 18). La expresión fue más intensa en hombres con LCL y mujeres con LCD, al compararlo con los otros 4 grupos.
3. La proteína 4 de unión a retinol se identificó en el spot 6 y su expresión fue menor en mujeres control y hombres con LCD, al compararlo con los otros 4 grupos.
4. La C4b de complemento se identificó en el spot 10 y su mayor expresión se encontró en mujeres con LCL y LCD. Encontramos una expresión disminuida en mujeres control y en hombres con LCL. No se encontró expresión de esta proteína en hombres con LCD y hombres control.
5. La proteína transtiretina en el spot 11 fue la que presentó el mayor porcentaje de cobertura y el valor de "unused" más alto. La expresión más elevada de esta proteína se encontró en mujeres con LCL y hombres control y su expresión disminuyó en



mujeres con LCD, en hombres con LCL y mujeres control. La expresión más baja se encontró en hombres con LCD.

6. El C3 de complemento fue identificado en 3 spots (13, 14 y 15). Su ubicación en el gel reveló que estaban localizados en un peso molecular parecido con un punto isoelectrico diferente (Figura 5.21). La proteína del spot 13 estaba muy expresada en todos los grupos a excepción del grupo de mujeres control y la expresión más baja se encontró en hombres con LCD. La expresión de la proteína para el spot 14 solo se encontró en los dos grupos de controles y en las mujeres con LCL. La proteína del spot 15 se encontró en todos los grupos, excepto en los hombres con LCD. En resumen ninguno de los 3 spots fue encontrado en hombres con LCD.
7. La alpha 1 antitripsina fue identificada en los spots 20 y 21. Su mayor expresión se observó en mujeres con LCD y disminuyó en hombres con LCL. El spot 21 también se encontró identificado en el grupo de hombres control.

Capítulo 6

DISCUSIÓN



Uno de los objetivos del presente estudio fue determinar diversos polimorfismos de un solo nucleótido en pacientes con leishmaniasis cutánea infectados con *L. mexicana*. Se evaluaron dos grupos de personas (casos y controles) que vivían en la misma región endémica de la enfermedad. Este trabajo muestra por primera vez la presencia del SNP IL-1 β -511 en mestizos mexicanos del estado de Tabasco, un estado con alta prevalencia de pacientes con leishmaniasis cutánea. Nuestros resultados mostraron que el 90% de los individuos infectados con *L. mexicana* tenían, ya sea un genotipo heterocigoto (CT), o eran homocigotos para el alelo menor (TT). El 60% de los individuos tenían el genotipo heterocigótico (CT), en comparación con un 38% presente en los controles. Estos datos sugieren que la presencia de este SNP en un genotipo heterocigoto podría favorecer el desarrollo de la enfermedad en pacientes infectados con *L. mexicana*.

La susceptibilidad o la resistencia a diversas enfermedades se ha correlacionado con las variaciones genéticas [82, 115]. Específicamente, el SNP en el gen de la IL-1 β (-511) se ha asociado con el aumento en la inflamación [116]. Esta citocina activa el endotelio vascular, potencia la expresión de moléculas de adhesión, que, en combinación con la vasodilatación local, reduce el flujo de sangre que favorece la adhesión de los neutrófilos al endotelio del vaso. La liberación local de CXCL8 actúa como un activador y quimioatrayente para los neutrófilos [117]. Estas células pueden producir un daño significativo debido a la liberación de gránulos y enzimas pro-inflamatorias [118].

Se ha demostrado que la inflamación es una marca distintiva en la leishmaniasis cutánea y también que diversos polimorfismos están relacionados con la inflamación elevada o extendida en esta enfermedad [90, 119, 120]. Por otro lado, también se ha visto que los neutrófilos desempeñan un papel importante durante la leishmaniasis. Ellos son determinantes para el establecimiento temprano de la enfermedad después de la entrada de los parásitos durante



la picadura de la mosca [104] y contribuyen a la susceptibilidad de la enfermedad [106]. El papel de los neutrófilos como mediadores ha sido asociado con su capacidad para fagocitar a los parásitos y transportarlos rápidamente desde el sitio de la infección, evitando así, los efectos tóxicos del complemento y de las respuestas inmunes locales [102]. La respuesta inflamatoria ayuda a las células fagocíticas infectadas con *Leishmania* a entrar en los vasos linfáticos, favoreciendo la distribución de los parásitos hacia los tejidos periféricos [77].

Con los datos anteriores se podría especular que el aumento de la producción de IL-1 β posiblemente facilita la progresión de la enfermedad en pacientes con LCD mediante el aumento de la respuesta inflamatoria que ayuda a la diseminación del parásito. Por lo tanto, se sugiere que la presencia del genotipo (C/T) del SNP de IL-1 β (-511) aumenta el riesgo a desarrollar la enfermedad debido al hecho de que este SNP está localizado en la región promotora del gen de la IL-1 β , el cual se ha relacionado con el aumento en la producción de esta citocina y de una inflamación exacerbada. Adicionalmente, Pirmez *et al.* (1997) [121] encontraron un aumento en el RNAm de IL-1 β en lesiones de pacientes con LMC.

Con estos resultados se propone que los pacientes que presentan el genotipo heterocigoto probablemente presentan un aumento de la producción de la citocina pro-inflamatoria IL-1 β , cuando el paciente está infectado con *L. mexicana*. El aumento en la producción *in vitro* de IL-1 β por monocitos, y la expresión aumentada de esta citocina en el suero de pacientes gravemente infectados con *L. mexicana* refuerza el papel de la IL-1 β como un factor para desarrollar la forma clínica más grave de la enfermedad, aunque no se puede descartar que el aumento en la producción de IL-1 β es una consecuencia, más que una causa, de la forma más grave de la enfermedad. Nuestros datos correlacionan con lo reportado en la literatura [122] respecto a la presencia de IL-1 β en las lesiones tisulares graves. Además, en el modelo murino de la cepa BALB/c, la exacerbación de la enfermedad también se ha



relacionado con la presencia de IL-1 β [123]. Se ha reportado que ratones C57BL/6a IL-1 β $-/-$ infectados con *L. major* resultaron resistentes a la leishmaniasis cutánea experimental [124].

Al observar la mayor producción de IL-1 β por los monocitos y en el suero de pacientes con la forma más grave de la enfermedad, se analizó la citocina en las lesiones de los pacientes con LCL y LCD. Se encontró que la expresión de IL-1 β varió en los tejidos de acuerdo al número de parásitos presentes en las lesiones. En las lesiones muy infectados de algunos pacientes con LCL y en todos los pacientes con LCD, la secreción de IL-1 β se encontró distribuida de manera difusa dentro de las lesiones. En contraste, en pacientes con LCL con un menor número de parásitos, la IL-1 β se encontró distribuída dentro de las células. Hasta la fecha no se ha descrito esta distribución diferencial de IL-1 β asociada a lesiones cutáneas con distinto grado inflamatorio.

La producción de IL-1 β puede ser inducida por diferentes productos microbianos a través del reconocimiento de estos por los receptores TLRs. Nuestro grupo demostró que el LPG (lipofosfoglicano) de *L. major* es un ligando de TLR-2 que conduce a la activación de células NK [37]. Por lo anterior, es posible que la presencia del parásito en las lesiones lleve a un aumento de la producción de IL-1 β . La distribución diferencial entre ambos grupos de pacientes puede estar relacionada con la posible presencia de un mecanismo alternativo (no vía caspasa-1) de generación de la forma activa de IL-1 β en los tejidos. Esta vía alterna de activación incluye la serin proteasa-3 liberada durante la infiltración de neutrófilos, así como otras proteasas tales como: la elastasa, la metaloproteasa de matriz 9 y la granzima A liberadas por las células T citotóxicas. Las quimasas producidas por mastocitos pueden procesar el precursor de IL-1 β para generar su forma activa [125, 126]. Las proteasas de serina-3 son secretadas por los neutrófilos junto con las trampas extracelulares,



que se ha demostrado son liberadas cuando las células son estimuladas con *Leishmania* o LPG [127, 128]. La consecuencia de la distribución diferencial de IL-1 β en las lesiones de pacientes infectados con *L. mexicana* no está clara, ya que la distribución difusa de IL-1 β en pacientes con LCD no se asoció con la destrucción de los parásitos, mientras que en los pacientes con LCL la distribución difusa sí se asoció con la destrucción de los parásitos. Por tanto, es sugestivo especular que la IL-1 β no está directamente implicada en la muerte de los parásitos, sino más bien en contribuir a la movilidad de *Leishmania* dentro de células fagocíticas y ser transportada fuera de las lesiones. En los pacientes con LCD que presentan pocas capacidades leishmanicidas, la IL-1 β posiblemente ayuda a la distribución del parásito mediante el aumento de la respuesta inflamatoria. Por esto, el aumento de la producción de IL-1 β y su distribución parece ser más crítica en pacientes que tienen problemas subyacentes que limitan su capacidad leishmanicida, tal como se observa en pacientes con LCD. Estos resultados abren una nueva perspectiva sobre la dinámica de liberación de IL-1 β en tejidos altamente infectados con *L. mexicana*.

Los datos obtenidos en los microarreglos en células NK y el análisis del proteoma de sueros de pacientes con ambas formas clínicas de leishmaniasis cutánea, infectados con *L. mexicana*, igualmente son novedosos en la literatura.

Los resultados del análisis de los microarreglos de expresión mostraron que genes que codifican para proteínas que participan en la activación de las vías de señalización de TLRs y JAK/STAT se encontraban inhibidos en células NK de pacientes con LCD, tanto en las células sin estímulo como en las células estimuladas con LPG. Ambas vías de señalización participan en la activación de la respuesta inmune.

El reconocimiento de PAMPs de *Leishmania* por células de la respuesta inmune se lleva a cabo, entre otros, a través de receptores TLRs generando la producción de proteínas como



IFN- γ e IL-12 que son reconocidas por su receptor y activan la vía de JAK/STAT. Este IFN- γ e IL-12 son dos citocinas importantes para inducir una respuesta protectora tipo Th1 [61, 129, 130].

Los TLRs, al activarse por PAMPs, convergen con vías de señalización que participan en el reclutamiento de leucocitos, la activación de diversas células y la producción de citocinas. La activación de células NK por LPG se da a través de TLR-2, que al activarse, recluta proteínas adaptadoras como MyD88 que a su vez recluta las cinasas IRAK-1 a la 4, las cuales tienen un papel esencial en el reclutamiento de TRAF-6 y de otras proteínas que activan el complejo IKK, el cual degrada a las proteínas I κ B liberando a NF- κ B para poder translocarse al núcleo [37, 130].

El presente trabajo mostró que varios de los genes involucrados en la vía de señalización de los TLRs estaban inhibidos en células NKs de pacientes con LCD, al compararlos con pacientes con LCL, tanto en condiciones basales como estimuladas con LPG. Los resultados observados para los genes que codifican para TLR-2, IRAK-2 e IRAK-3 sugieren que las células NK de pacientes con LCD podrían no reconocer de manera eficiente el LPG de *Leishmania* por la falta de expresión del TLR-2 en la membrana de la célula debido a la inhibición que se presenta del gen y con esto, no activar la vía de TLR-2 por la falta de expresión de los genes para IRAK-2 y 3. Esto sí ocurre en células NK de pacientes con LCL, donde inclusive aumenta la expresión del gen IRAK-3 en respuesta al estímulo y con esto las células NK pueden activar la vía de TLR-2 e inducir la producción de citocinas como TNF- α e IFN- γ .

Se ha reportado que el LPG de *L. mexicana* interactúa con células dendríticas y macrófagos humanos induciendo la producción de TNF- α . También es capaz de inhibir la producción de IL-12p70, elevar la de IL-10, así como, disminuir la translocación de NF- κ Bp50 y p65 al



núcleo de los monocitos. El factor de transcripción NF- κ B es esencial para producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-12, citocinas importantes para la inducción de una respuesta tipo Th1 y en el caso de IL-12 para la activación de células NK [3, 70]. Nuestros resultados muestran que células NK de pacientes con LCD tenían inhibido (en células sin estímulo y estimuladas con LPG) el gen que codifica para los receptores de IL-12 (IL12R β 2) e IFN- γ (IFN- γ R2) cuando se comparó con pacientes LCL. Haciendo la misma comparación, se observó que los genes que codifican para NF- κ Bp50 y p52 se encontraban inhibidos en células NK de pacientes con LCD estimuladas con LPG (solo en el caso del gen para NF- κ Bp52 existía una inhibición en células sin estímulo). Estos resultados se pueden correlacionar con un estudio previo (datos no publicados de Cañeda Guzmán) que mostró una falta de producción de TNF- α e IFN- γ por células NK de pacientes con LCD estimuladas con LPG (al tener inhibidos dos isoformas de NF- κ B (p50 y p52), las células NK no son capaces de producir estas dos citocinas pro-inflamatorias).

Una característica importante de las infecciones por *Leishmania* es la participación de las proteínas STATs y sus JAKs asociadas en la regulación de la susceptibilidad y/o resistencia a la infección. El papel protector del IFN- γ en la LC se atribuye a su capacidad para favorecer una respuesta tipo Th1 con la presencia de linfocitos TCD4⁺, así como la inducción de la producción de NO por el incremento en la expresión del gen NOS2 y consecuente activación de los mecanismos leishmanicidas en los macrófagos. En particular, los efectos pleiotrópicos del IFN- α/β e IFN- γ son mediados por la señalización vía JAK/STAT-1 [128]. Rosas y cols en 2003 [61], demostraron la importancia del papel de STAT-1 en la LC provocada por *L. major* utilizando ratones infectados C57BL/6 STAT-1^{-/-} y STAT-1^{+/+}. Los autores encontraron que los ratones STAT-1^{-/-} desarrollaron lesiones más grandes, con un mayor número de parásitos, presentaron una disminución en la producción de IFN- γ , IL-12p40/p70, un aumento de IL-4 e IL-10 y una disminución estadísticamente signi-



ficativa de NO al día 30 de infección. Nuestros resultados de microarreglos de expresión mostraron que los pacientes con LCD tenían inhibidos los genes para STAT-1 e IFN- γ R2 en células NK sin estímulo y estimuladas con LPG, lo que podría sugerir que este "defecto" es clave para el desarrollo de este cuadro clínico más severo de la LC provocada por *L. mexicana*.

Por último, el único reporte de un análisis masivo de proteínas en suero utilizando muestras de pacientes con leishmaniasis se realizó en muestras de pacientes infectados con *Leishmania donovani*. En ese estudio demostraron que las proteínas AGP (α -1-acid glycoprotein) e inhibidora de C1 del sistema del complemento estaban sobre-reguladas, mientras que la trastiretina, la proteína de unión a retinol y la APO-I (apolipoproteína A1) se encontraban disminuídas en estos pacientes, al compararlas con sueros de sujetos sanos. En ese estudio solo se compararon proteínas de sujetos sanos vs las de pacientes con leishmaniasis visceral [1]. Nuestro estudio es el primero en comparar las proteínas en suero entre pacientes con distinta severidad clínica con asociación al género. Nuestros resultados aun son preliminares, debido a que no se realizó un análisis estadístico entre cada grupo, lo que nos impide obtener alguna conclusión sobre la baja o alta expresión de las proteínas identificadas.

El presente estudio ha revelado importantes defectos genéticos en varios componentes de la RII presentes en pacientes con LCD, lo cual arroja las primeras evidencias de las causas de la alta susceptibilidad a la infección por *L. mexicana* en estos pacientes.

Capítulo 7

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS



7.1. Conclusiones

Los pacientes con leishmaniasis cutánea con el genotipo C/T para el SNP IL-1 β -511 tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad y proponemos que esta inflamación exacerbada asociada a IL-1 β en pacientes con LCD favorece la diseminación del parásito. Por otro lado, los resultados del análisis de microarreglos de expresión mostraron evidencias de que pacientes con LCD tienen defectos genéticos claves que no permiten desarrollar una RII ante la infección por *L. mexicana*. Por último, los datos obtenidos del análisis de proteínas en suero son un primer paso en la búsqueda de proteínas diferencialmente expresadas en pacientes con LC, que podrían ayudar a la predicción del posible cuadro clínico que desarrollaría una persona recién diagnosticada con leishmaniasis producida por *L. mexicana*.



7.2. Perspectivas del trabajo

Los datos obtenidos sobre el papel de IL-1 β en muestras de pacientes con ambas formas clínicas de la leishmaniasis cutánea ayudan a arrojar una nueva luz sobre los genes implicados en la evolución de la enfermedad. Otros estudios dirigidos a analizar las distribuciones alélicas y genotípicas en la población mexicana ayudará a aclarar las diferencias que se observaron entre los casos y controles en los SNPs implicados en la susceptibilidad a la leishmaniasis en nuestra población. Sólo se han identificado pocos genes que determinen la susceptibilidad en la compleja relación parásito-respuesta inmune del huésped [128]. El análisis de la participación de diversas proteínas de la inflamación (IL-1 β , caspasa-1 y -5 o NALP3) en un número mayor de pacientes, permitiría comprobar los mecanismos mediante los cuales los SNPs y la producción exacerbada de IL-1 β contribuyen a diferentes formas clínicas de la leishmaniasis.

Los resultados de los microarreglos de expresión y de proteómica en suero de pacientes aun deben validarse por PCR en tiempo real y Western-blot, respectivamente.

Bibliografía

- [1] Rukmangadachar LA, Kataria J, Hariprasad G, Samantaray JC, Srinivasan A. Two-dimensional difference gel electrophoresis (DIGE) analysis of sera from visceral leishmaniasis patients. *Clin Proteomics*. 2011;8(1):4. PubMed PMID: 21906353. Epub 2011/09/13. eng.
- [2] Fernández-Figueroa EA, Rangel-Escareno C, Espinosa-Mateos V, Carrillo-Sanchez K, Salaiza-Suazo N, Carrada-Figueroa G, *et al.* Disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana* relates to IL-1beta. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1533. PubMed PMID: 22629474. Epub 2012/05/26. eng.
- [3] Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*. 2007 Mar-Apr;17(2):115-22. PubMed PMID: 17337393. Epub 2007/03/06. eng.
- [4] Ruíz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2007 Dec;29(12):671-8. PubMed PMID: 18042173. Epub 2007/11/29. eng.
- [5] Maurer M, Dondji B, von Stebut E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. *Med Microbiol*



- Immunol. 2009 Aug;198(3):137-46. PubMed PMID: 19396461. Epub 2009/04/28. eng.
- [6] Alvar EJ. Las leishmaniasis: de la biología al control. Laboratorios Intervet S.A. 2001. 2da Ed. Madrid, España. pp. 200.
- [7] Lupi O, Bartlett BL, Haugen RN, Dy LC, Sethi A, Klaus SN, *et al.* Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. *J Am Acad Dermatol.* 2009 Jun;60(6):897-925; quiz 6-8. PubMed PMID: 19467364. Epub 2009/05/27. eng.
- [8] Schwartz E, Hatz C, Blum J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. *Lancet Infect Dis.* 2006 Jun;6(6):342-9. PubMed PMID: 16728320. Epub 2006/05/27. eng.
- [9] Córdova UC, Albertos AN, Andrade NF, Canto LS. Leishmaniasis: Estudio epidemiológico preliminar en una localidad de la zona endémica del Estado de Tabasco. *Salud Pública de Mex.* 1993;35:345-350.
- [10] Vargas MF, Torres GE, Arenas R, Quitanilla CM. Leishmaniasis en México. *Med Cutan Iber Am.* 2011;39(4):163-83.
- [11] <http://www.ecosur.mx>
- [12] Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE.* 2012 May;7(5): e35671.doi:10.1371/journal.pone.0035671
- [13] Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother.* 2004 Dec;10(6):307-15. PubMed PMID: 15614453. Epub 2004/12/23. eng.



- [14] Spath GF, Epstein L, Leader B, Singer SM, Avila HA, Turco SJ, *et al.* Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 1;97(16):9258-63. PubMed PMID: 10908670. Epub 2000/07/26. eng.
- [15] Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Aug 5;100(16):9536-41. PubMed PMID: 12869694. Epub 2003/07/19. eng.
- [16] Schneider P, Rosat JP, Bouvier J, Louis J, Bordier C. *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol.* 1992 Sep;75(2):196-206. PubMed PMID: 1516667. Epub 1992/09/01. eng.
- [17] Ilg T, Etges R, Overath P, McConville MJ, Thomas-Oates J, Thomas J, *et al.* Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. *J Biol Chem.* 1992 Apr 5;267(10):6834-40. PubMed PMID: 1551890.
- [18] Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:453-83. PubMed PMID: 11544364. Epub 2001/09/07. eng.
- [19] Zambrano VS, Rosales BD, Carrero J, Ortiz OL. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 2002;18:272-78.
- [20] Ponte-Sucre A, Heise D, Moll H. *Leishmania major* lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. *Immunology.* 2001 Dec;104(4):462-7. PubMed PMID: 11899433. Epub 2002/03/20. eng.



- [21] Frankenburg S, Leibovici V, Mansbach N, Turco SJ, Rosen G. Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan. *J Immunol.* 1990 Dec 15;145(12):4284-9. PubMed PMID: 2147940. Epub 1990/12/15. eng.
- [22] Teixeira MM, Almeida IC, Gazzinelli RT. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect.* 2002 Jul;4(9):883-6. PubMed PMID: 12106780.
- [23] Abbas A, Litchman A, Pober J. *Inmunología celular y molecular.* Mc Graw-Hill Interamericana. 2004. 5ta ed. México. p.p.563.
- [24] Janeway Ch, Travers P, Walport M, Shlomchik. *Immunobiology.* Garland Science. 2011. 8va Ed. New York. p.p. 888.
- [25] Parham P. *El sistema inmune. Manual Moderno.* 2011. 3ra Ed. México. p.p.506.
- [26] Netea M, Quintin J, van der Mer J. Trained Immunity: A memory for innate host defense. *Cell and Host Microbe.* 2011. May;19:355-61.
- [27] Celada A, Gray PW, Rinderknecht E, Schreiber RD. Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J Exp Med.* 1984 Jul 1;160(1):55-74. PubMed PMID: 6330272. Epub 1984/07/01. eng.
- [28] Valledor AF, Borrás FE, Cullell-Young M, Celada A. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol.* 1998 Apr;63(4):405-17. PubMed PMID: 9544570. Epub 1998/04/17. eng.



- [29] Celada A, Maki RA. Transforming growth factor-beta enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages. *J Immunol.* 1992 Feb 15;148(4):1102-5. PubMed PMID: 1737928. Epub 1992/02/15. eng.
- [30] Adams DO, Hamilton TA. Molecular transductional mechanisms by which IFN gamma and other signals regulate macrophage development. *Immunol Rev.* 1987 Jun;97:5-27. PubMed PMID: 2957307. Epub 1987/06/01. eng.
- [31] Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol.* 2002 Jan;3(1):6-8. PubMed PMID: 11753399. Epub 2001/12/26. eng.
- [32] Orange JS, Fassett MS, Koopman LA, Boyson JE, Strominger JL. Viral evasion of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):1006-12. PubMed PMID: 12407408. Epub 2002/10/31. eng.
- [33] Ezekowitz R, Hoffmann J. *Innate Immunity.* Human Press. 2003. New Jersey. p.p. 321-39.
- [34] Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Pende D, Millo R, Moretta L, *et al.* Human natural killer cell activating receptors. *Mol Immunol.* 2000 Dec;37(17):1015-24. PubMed PMID: 11399319. Epub 2001/06/12. eng.
- [35] Korb DS, Finney OC, Riley EM. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int J Parasitol.* 2004 Dec;34(13-14):1517-28. PubMed PMID: 15582528. Epub 2004/12/08. eng.
- [36] Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol.* 2003 Jun;15(3):308-14. PubMed PMID: 12787756. Epub 2003/06/06. eng.



- [37] Sato S, Takeuchi O, Fujita T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *Int Immunol*. 2002 Jul;14(7):783-91. PubMed PMID: 12096038. Epub 2002/07/04. eng.
- [38] Nylen S, Maasho K, Soderstrom K, Ilg T, Akuffo H. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol*. 2003 Mar;131(3):457-67. PubMed PMID: 12605699. Epub 2003/02/28. eng.
- [39] Maasho K, Sanchez F, Schurr E, Hailu A, Akuffo H. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect Immun*. 1998 Jun;66(6):2698-704. PubMed PMID: 9596736. Epub 1998/05/29. eng.
- [40] Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011 Feb;30(1):16-34. PubMed PMID: 21235323. Epub 2011/01/18. eng.
- [41] Harju K, Glumoff V, Hallman M. Ontogeny of Toll-like receptors Tlr2 and Tlr4 in mice. *Pediatr Res*. 2001 Jan;49(1):81-3. PubMed PMID: 11134496. Epub 2001/01/03. eng.
- [42] Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol*. 2000 Feb;12(1):13-9. PubMed PMID: 10679407. Epub 2000/02/19. eng.
- [43] López BL. La regulación del factor de transcripción NF- κ B. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Revista de Investigación clínica*. 2004;56,83-92.



- [44] Lemaitre B. The road to Toll. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jul;4(7):521-7. PubMed PMID: 15229471. Epub 2004/07/02. eng.
- [45] Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, *et al.* Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 9;101(10):3516-21. PubMed PMID: 14993594. Epub 2004/03/03. eng.
- [46] Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 2003 Oct;24(10):528-33. PubMed PMID: 14552836. Epub 2003/10/14. eng.
- [47] Underhill DM, Gantner B. Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes Infect.* 2004 Dec;6(15):1368-73. PubMed PMID: 15596122. Epub 2004/12/15. eng.
- [48] Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol.* 2003 Oct;74(4):479-85. PubMed PMID: 12960260. Epub 2003/09/10. eng.
- [49] Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2003 Feb;15(1):5-11. PubMed PMID: 12495726. Epub 2002/12/24. eng.
- [50] Yamamoto M, Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol.* 2004 Feb;40(12):861-8. PubMed PMID: 14698224. Epub 2003/12/31. eng.



- [51] Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Nov 11;1592(3):265-80. PubMed PMID: 12421671. Epub 2002/11/08. eng.
- [52] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005 Jan;17(1):1-14. PubMed PMID: 15585605. Epub 2004/12/09. eng.
- [53] Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol*. 2001 Apr;1(4):625-35. PubMed PMID: 11357875. Epub 2001/05/19. eng.
- [54] Wang Q, Dziarski R, Kirschning CJ, Muzio M, Gupta D. Micrococci and peptidoglycan activate TLR2-MyD88-IRAK-TRAF-NIK-IKK-NF- κ B signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect Immun*. 2001 Apr;69(4):2270-6. PubMed PMID: 11254583. Epub 2001/03/20. eng.
- [55] Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, *et al*. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol*. 2000 Dec;1(6):533-40. PubMed PMID: 11101877. Epub 2001/03/23. eng.
- [56] Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J*. 2000 Jul 3;19(13):3325-36. PubMed PMID: 10880445. Epub 2000/07/06. eng.
- [57] Kumar Pachathundikandi S, Brandt S, Madassery J, Backert S. Induction of TLR-2 and TLR-5 expression by *Helicobacter pylori* switches cagPAI-dependent signalling leading to the secretion of IL-8 and TNF-alpha. *PLoS One*. 2011;6(5):e19614.



- [58] Shadab M, Ali N. Evasion of Host Defence by *Leishmania donovani*: Subversion of Signaling Pathways. *Mol Biol Int.* 2011;2011:343961. PubMed PMID: 22091401. Epub 2011/11/18. eng.
- [59] Decker T, Stockinger S, Karaghiosoff M, Muller M, Kovarik P. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest.* 2002 May;109(10):1271-7. PubMed PMID: 12021240. Pubmed Central PMCID: 150987.
- [60] Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood.* 2000 Jan 1;95(1):19-29. PubMed PMID: 10607680. Epub 1999/12/23. eng.
- [61] Rosas LE, Keiser T, Pyles R, Durbin J, Satoskar AR. Development of protective immunity against cutaneous leishmaniasis is dependent on STAT1-mediated IFN signaling pathway. *Eur J Immunol.* 2003 Jul;33(7):1799-805. PubMed PMID: 12811839. Epub 2003/06/18. eng.
- [62] Bertholet S, Dickensheets HL, Sheikh F, Gam AA, Donnelly RP, Kenney RT. *Leishmania donovani*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. *Infect Immun.* 2003 Apr;71(4):2095-101. PubMed PMID: 12654831. Epub 2003/03/26. eng.
- [63] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):428-35. PubMed PMID: 18650913. Epub 2008/07/25. eng.
- [64] Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):846-52. PubMed PMID: 12490957. Epub 2002/12/20. eng.



- [65] Church LD, Cook GP, McDermott MF. Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008 Jan;4(1):34-42. PubMed PMID: 18172447. Epub 2008/01/04. eng.
- [66] Weber A, Wasillew P, Kracht M (2010) Interleukin-1 β (IL-1 β) processing pathway. *Immunol*. 2010;3: 1-2.
- [67] Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol*. 2009. 27:229-65.
- [68] Abdul AA, Saiid A, Ojcius D, Yilmaz Ö, Kelly K. Inflammasomes bridge signaling between pathogen identification and the immune response. 2009. *Drugs Today*. Nov;45(Suppl B):105-112.
- [69] Carrada G, Caneda C, Salaiza N, Delgado J, Ruiz A, Sanchez B, *et al*. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol*. 2007 Mar;29(3):117-26. PubMed PMID: 17266739. Epub 2007/02/03. eng.
- [70] Argueta-Donohue J, Carrillo N, Valdes-Reyes L, Zentella A, Aguirre-Garcia M, Becker I, *et al*. *Leishmania mexicana*: participation of NF- κ B in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Exp Parasitol*. 2008 Sep;120(1):1-9. PubMed PMID: 18508052. Epub 2008/05/30. eng.
- [71] Faria DR, Souza PE, Duraes FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, *et al*. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2009 Aug;31(8):432-9. PubMed PMID: 19646207. Epub 2009/08/04. eng.



- [72] Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*. 2008;213(3-4):377-87. PubMed PMID: 18406382. Epub 2008/04/15. eng.
- [73] Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*. 2002 Dec;70(12):6734-40. PubMed PMID: 12438348. Epub 2002/11/20. eng.
- [74] Stenger S, Rollinghoff M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. *Ann Rheum Dis*. 2001 Nov;60 Suppl 3:iii43-6. PubMed PMID: 11890652. Epub 2002/03/14. eng.
- [75] Leon B, Ardavin C. Monocyte migration to inflamed skin and lymph nodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3126-30. PubMed PMID: 18184867. Epub 2008/01/11. eng.
- [76] Ji J, Sun J, Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun*. 2003 Aug;71(8):4278-88. PubMed PMID: 12874303. Epub 2003/07/23. eng.
- [77] Villaseñor MI, Saliza N, Delgado J, Gutiérrez L, Pérez A, *et al.* Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host. *Parasite Immunol*. 2008;30: 425–434.
- [78] Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008 Nov;102(11):1075-80. PubMed PMID: 18602127. Epub 2008/07/08. eng.



- [79] González, M. Historia del hombre en América: Aproximaciones desde la Antropología Física. Sociedad y Pensamiento. 2006. pp 199.
- [80] Garnacho MJ, Garnacho MM, Ortíz LC, Aldabó PT. Polimorfismos genéticos en la sepsis. Med. Intensiva. 2005;20(3):185-191.
- [81] Tusié LM. El mapa de la variabilidad genética del humano, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) y algunas de sus aplicaciones en medicina. La revista de Investigación Clínica. 2001. 53(4):308-10.
- [82] Hidalgo MA, Silva ZI, Barrientos E, March MS, Del Bosque PL, Pérez GO, Ortíz E, Contreras A, Dávila C, Orozco L, Jiménez SG. Proyecto mapa genómico de los mexicanos: El genoma y sus implicaciones en la salud. Ciencia y Desarrollo. 2006;32(191):34-53.
- [83] Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC. SNP and haplotype variation in the human genome. Mutat Res. 2003 May 15;526(1-2):53-61. PubMed PMID: 12714183. Epub 2003/04/26. eng.
- [84] Kelley JM. Genética Compleja: su influencia en la biología molecular y en la enfermedad. Rev. Med. Clin. 2007;18(4):306-12.
- [85] Nagel RL. Epistasis and the genetics of human diseases. C R Biol. 2005 Jul;328(7):606-15. PubMed PMID: 15992744. Epub 2005/07/05. eng.
- [86] Castillejos LM, Pérez PR, Quiñones FF, García-Sancho FM. Implicaciones de los polimorfismos de un solo nucleótido en Mycobacterium tuberculosis y humanos en el manejo clínico de la tuberculosis. Rev Instit Nac Enf Resp Mex. 2006;19(1):38-46.



- [87] Huang SH, Triche T, Jong AY. Infectomics: genomics and proteomics of microbial infections. *Funct Integr Genomics*. 2002 Apr;1(6):331-44. PubMed PMID: 11957108. Epub 2002/04/17. eng.
- [88] Frodsham AJ, Hill AV. Genetics of infectious diseases. *Hum Mol Genet*. 2004 Oct 1;13 Spec No 2:R187-94. PubMed PMID: 15358724. Epub 2004/09/11. eng.
- [89] Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, Almusawi T, Duarte MI, Amato Neto V. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun*. 2008 Mar;76(3):866-72. PubMed PMID: 18070909. Epub 2007/12/12. eng.
- [90] Matos GI, Covas CJ, Bittar R, Gomes Silva A, Marques F, *et al*. IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence *Leishmania* induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis*. 2007;7: 33.
- [91] Florez O, Zafra G, Morillo C, Martin J, Gonzalez CI. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. *Hum Immunol*. 2006 Sep;67(9):741-8. PubMed PMID: 17002905. Epub 2006/09/28. eng.
- [92] Garza González E, Bosques Padilla FJ, El Omar E, Hold G, Tijerina Menchaca R, *et al*. Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer*. 2005;114: 237-241.
- [93] Zabaleta J, Camargo MC, Piazuolo MB, Fontham E, Schneider BG, *et al*. Association of interleukin-1beta gene polymorphisms with precancerous gastric lesions in African Americans and Caucasians. *Am J Gastroenterol*. 2006;101: 163-171.



- [94] Duque AM, Salazar LM, Veléz MI, Martínez CA. Polimorfismo de IL-1 β como marcador genético en enfermedad periodontal. *Revista CES Odontología*. 2007;20: 51-58.
- [95] Nemetz A, Toth M, García González MA, Zagoni T, Feher J, *et al*. Allelic variation at the interleukin 1beta gene is associated with decreased bone mass in patients with inflammatory bowel diseases. *Gut*. 2001;49: 644-649.
- [96] Erbek SS, Yurtcu E, Erbek S, Atac FB, Sahin FI, *et al*. Proinflammatory cytokine single nucleotide polymorphisms in nasal polyposis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;133: 705-709.
- [97] Whyte M, Hubbard R, Meliconi R, Whidborne M, Eaton V, *et al*. Increased risk of Fibrosing Alveolitis associated with Interleukin-1 Receptor Antagonist and Tumor Necrosis Factor- α gene polymorphisms. *Am J Resp Care Med*. 2000;162: 755-768.
- [98] Kang JM, Kim N, Lee DH, Park JH, Lee MK, *et al*. The effects of genetic polymorphisms of IL-6, IL-8, and IL-10 on Helicobacter pylori-induced gastroduodenal diseases in Korea. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43: 420-428.
- [99] Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Derka S, Vassiliou S, *et al*. The interleukin-8 (-251 A/T) polymorphism is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33: 504-507.
- [100] Echeverry NP, Ortíz BL, Caminos JL. Análisis proteómico de cultivos primarios de tiroides. *Rev Colomb Quím*. 2010;39(3):343-58.



- [101] Olivo DA, Debaz H, Alaez C, Islas VJ, Pérez PH, *et al.* Role of HLA class II alleles in susceptibility to and protection from localized cutaneous leishmaniasis. 2003;65:255-61.
- [102] Faria DR, Gollob KJ, Barbosa JJr, Schriefer A, Machado PR, *et al.* Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun.* 2005;73:7853-7859.
- [103] Hernández-Ruíz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, *et al.* CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(11):e871.
- [104] Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 2008 Aug 15;321(5891):970-4. PubMed PMID: 18703742. Epub 2008/08/16. eng.
- [105] Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiol.* 2008;213: 183-191.
- [106] Lopez KS, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, *et al.* IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol.* 2009; Mar 1; 182: 3039-3046.



- [107] Miller LS, Pietras E M, Uricchio LH, Hirano K, Rao H, *et al.* Inflammasome-mediated production of IL-1 β is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* in vivo. *J Immunol.* 2007;179: 6993-6942.
- [108] Teixeira MJ, Teixeira, CR, Andrade BB, Barral Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2006;22: 32-40.
- [109] McConville M, Bacic A, Mitchell GF, Handman E. Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *PNAS.* 1987. USA 84, 8941–8945.
- [110] Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006;7:3. PubMed PMID: 16448564. Epub 2006/02/02. eng.
- [111] Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet.* 1995;19: 251-253.
- [112] Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003 Apr;4(2):249-64. PubMed PMID: 12925520. Epub 2003/08/20. eng.
- [113] Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 2003 Jan 22;19(2):185-93. PubMed PMID: 12538238. Epub 2003/01/23. eng.



- [114] Sasieni PD. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics*. 1997;53: 1253-1261.
- [115] Silva SI, Hidalgo MA, Estrada GJ, Fernández LJ, *et al.* Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *PNAS*. 2009 May;106(21):8611-8616.
- [116] Read RC, Cannings C, Naylor SC, Timms JM, Maheswaran R, *et al.* Variation within genes encoding interleukin-1 and the interleukin-1 receptor antagonist influence the severity of meningococcal disease. *Ann Intern Med*. 2003;38: 534–541.
- [117] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:678–689.
- [118] Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. *J Pathol*. 2008;214: 211–223.
- [119] Kamali SE, Rasouli M, Mortazavi H, Gharesi FB. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. *Cytokine*. 2006;35: 159-165.
- [120] Brajao K, Reiche EM, Kaminami MH, Pelegrinelli FM, Estevao D, *et al.* Analysis of the CC chemokine receptor 5 delta32 polymorphism in a Brazilian population with cutaneous leishmaniasis. *J Cutan Pathol*. 2007;34: 27-32.
- [121] Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao Silva F, *et al.* Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest*. 1993;91: 1390-1395.



- [122] Boaventura V, Santos C, Cardoso C, de Andrade J, Dos Santos W, *et al.* Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol.* 2010;40: 2830-2836.
- [123] Voronov E, Dotan S, Gayvoronsky L, White RM, Cohen I, *et al.* IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *Int Immunol.* 2010;22: 245-257.
- [124] Kautz K, Kostka S, Dinges S, Iwakura Y, Udey M, *et al.* IL-1 signalling is dispensable for protective immunity in Leishmania-resistant mice. *Exp Dermatol.* 2010;20: 76-78.
- [125] Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol.* 2011;41: 1203-1217.
- [126] Van den Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* 2011;32: 110-116.
- [127] Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, *et al.* Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106: 6728-6753.
- [128] Meyer-Hoffert U, Wiedow O. Neutrophil serine proteases: mediators of innate responses. *Curr Opin Hematol.* 2010;18: 19-24.
- [129] Becerra-Diaz M, Valderrama-Carvajal H, Terrazas LI. Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) family members in helminth infections. *International*



journal of biological sciences. 2011;7(9):1371-81. PubMed PMID: 22110388. PubMed Central PMCID: 3221944.

- [130] Srivastav S, Kar S, Chande AG, Mukhopadhyaya R, Das PK. Leishmania donovani exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response. J Immunol. 2012 Jul 15;189(2):924-34. PubMed PMID: 22685311.

Capítulo 8

Artículo publicado



OPEN ACCESS Freely available online



Disease Severity in Patients Infected with *Leishmania mexicana* Relates to IL-1 β

Edith A. Fernández-Figueroa¹, Claudia Rangel-Escareño², Valeria Espinosa-Mateos², Karol Carrillo-Sánchez², Norma Salaiza-Suazo¹, Georgina Carrada-Figueroa^{3,4}, Santiago March-Mifsut², Ingeborg Becker^{1*}

1 Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal, México, **2** Instituto Nacional de Medicina Genómica, México Distrito Federal, México, **3** Secretaría de Salud del Estado de Tabasco, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México, **4** Universidad Juárez Autónoma, de Tabasco, Tabasco, México

Abstract

Leishmania mexicana can cause both localized (LCL) and diffuse (DCL) cutaneous leishmaniasis, yet little is known about factors regulating disease severity in these patients. We analyzed if the disease was associated with single nucleotide polymorphisms (SNPs) in IL-1 β (-511), CXCL8 (-251) and/or the inhibitor IL-1RA (+2018) in 58 Mexican mestizo patients with LCL, 6 with DCL and 123 control cases. Additionally, we analyzed the *in vitro* production of IL-1 β by monocytes, the expression of this cytokine in sera of these patients, as well as the tissue distribution of IL-1 β and the number of parasites in lesions of LCL and DCL patients. Our results show a significant difference in the distribution of IL-1 β (-511 C/T) genotypes between patients and controls (heterozygous OR), with respect to the reference group CC, which was estimated with a value of 3.23, 95% CI = (1.2, 8.7) and p-value = 0.0167, indicating that IL-1 β (-511 C/T) represents a variable influencing the risk to develop the disease in patients infected with *Leishmania mexicana*. Additionally, an increased *in vitro* production of IL-1 β by monocytes and an increased serum expression of the cytokine correlated with the severity of the disease, since it was significantly higher in DCL patients heavily infected with *Leishmania mexicana*. The distribution of IL-1 β in lesions also varied according to the number of parasites harbored in the tissues: in heavily infected LCL patients and in all DCL patients, the cytokine was scattered diffusely throughout the lesion. In contrast, in LCL patients with lower numbers of parasites in the lesions, IL-1 β was confined to the cells. These data suggest that IL-1 β possibly is a key player determining the severity of the disease in DCL patients. The analysis of polymorphisms in CXCL8 and IL-1RA showed no differences between patients with different disease severities or between patients and controls.

Citation: Fernández-Figueroa EA, Rangel-Escareño C, Espinosa-Mateos V, Carrillo-Sánchez K, Salaiza-Suazo N, et al. (2012) Disease Severity in Patients Infected with *Leishmania mexicana* Relates to IL-1 β . PLoS Negl Trop Dis 6(5): e1533. doi:10.1371/journal.pntd.0001533

Editor: Rodrigo Correa-Oliveira, René Rachou Research Center, Brazil

Received: June 3, 2011; **Accepted:** January 3, 2012; **Published:** May 22, 2012

Copyright: © 2012 Fernández-Figueroa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grants 102155, 47256-M and by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) grant IN220109 to I.B. Edith A. Fernández-Figueroa was supported by a Ph.D. fellowship from CONACYT and is a doctoral student of Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: becker@unam.mx

Introduction

Leishmania mexicana can cause a wide spectrum of clinical diseases, ranging from a localized cutaneous ulcer at the infection site, which is characteristic for patients with localized cutaneous leishmaniasis (LCL), to a disseminating disease, where intensely parasitized macrophages form nodules that spread throughout the skin and ultimately invade the oropharyngeal and nasal mucosae, which is characteristic for patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). Whereas LCL patients have a cellular immune response associated with macrophage-activating cytokines such as IFN- γ , DCL patients lack an effective cellular immune response, permitting an uncontrolled replication of the parasites within macrophages and other phagocytic cells. Little is known regarding the factors involved in modulating the disease outcome; one of the possible factors are early inflammatory mediators [1–5]. An excessive inflammatory response can lead to increased neutrophil infiltration, which has been associated with disease progression [6,7]. The observation that

enhanced neutrophil recruitment contributes to disease susceptibility has been confirmed in experimental mouse models, which showed that an improvement in disease outcome was associated with a decrease in neutrophil immigration into the lesions [8]. One of factors responsible for neutrophil infiltration is IL-1 β [9]. This cytokine also induces other innate mediators such as acute phase proteins and chemokines such as IL-6 and CXCL8 (IL-8), respectively [10].

Production of active IL-1 β by monocytes is promoted by inflammasomes in response to diverse stimuli such as infections [11,12]. NALP3, which belongs to the large family of intracellular Nod-like receptors (NLRs), associates by oligomerization with other intracellular proteins to form a complex known as the inflammasome, which converts inactive procaspase 1 to active caspase 1. This enzyme then cleaves the inactive IL-1 β precursor to a secreted active IL-1 β [13].

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of IL-1 β have been associated with susceptibility towards various inflammatory diseases, such as gastric cancer [14,15], periodontal disease [16],



Author Summary

Leishmania mexicana is an intracellular parasite that causes two polarly opposed diseases: One is a self-limited disease, characterized by ulcerative lesions associated with a low infectious load, as found in patients with localized cutaneous leishmaniasis (LCL). And the other pole is characterized by a progressive disease where abundant parasites spread uncontrollably throughout the skin inside heavily infected phagocytic cells, as occurs in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). The cause of this severe form of the disease is unknown, although the early encounter between the parasite and the inflammatory response of the host possibly plays a decisive role in the disease outcome. We here show that polymorphism in the gene encoding IL-1 β (-511 C/T) represents a variable influencing the risk to develop the disease for patients infected with *Leishmania mexicana*. *In vitro* experiments showed that monocytes of DCL patients secreted significantly higher levels of the proinflammatory cytokine IL-1 β as compared to LCL patients. DCL patients also had augmented levels of IL-1 β in serum, and the cytokine was diffusely distributed throughout lesions, which was correlated with the numbers of parasites in the lesions. We propose that IL-1 β possibly plays a key role in establishing the disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana*.

inflammatory bowel diseases [17] and nasal polyposis [18], among others. IL-8 (-251) has been associated with an increased risk to develop *H. pylori*-associated gastroduodenal disease [19]. Vairaktaris et al. (2005) [20] suggested that IL-8 (-251) may be a major contributor to genetic risk factor in oral cancer. IL-1RA (+2018) has been shown to be associated with a significant increase in the risk of developing fibrosing avcolitis [21].

Even though elevated levels of mRNA IL-1 β have been reported in biopsies of patients with American cutaneous leishmaniasis [22], neither IL-1 β (-511), CXCL8 (-251) nor IL-1RA (+2018), have been associated with disease in leishmaniasis. In this work we analyzed these SNPs in mononuclear cells of patients with different clinical forms of cutaneous leishmaniasis. Additionally, we analyzed the *in vitro* production of IL-1 β by patient monocytes, the expression of IL-1 β in the sera and the cytokine distribution in the cutaneous lesions of both groups of patients. We found that polymorphism in IL-1 β (-511 C/T) is associated with a higher risk to contract the disease when the patients are infected with *Leishmania mexicana*. We were also able to demonstrate that patients with the more severe form of the disease that harbor a larger number of *Leishmania mexicana* parasites, show an enhanced *in vitro* production of IL-1 β by monocytes, an increased serum expression of IL-1 β and a diffuse distribution of IL-1 β in the lesions.

The analysis of polymorphisms in CXCL8 and IL-1RA showed no differences between patients and controls (data not shown).

Materials and Methods

Ethical statement

This study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Medical Faculty of the National Autonomous University of Mexico (FMED/CI/RGG/013/01/2008) and guidelines established by the Mexican Health Authorities were strictly followed. All patients provided written informed consent for the collection of samples and subsequent analysis.

Patients and controls

For the analysis of IL-1 β polymorphism a total of 58 LCL patients, 6 DCL patients and 123 control cases were included. Patients were unrelated individuals and were clinically diagnosed as LCL or DCL by Giemsa-stained smears of the lesions and Montenegro skin hypersensitivity test taken at the sanitary jurisdiction office of the Cunduacán Municipality in Tabasco State, located in southeastern Mexico. The diagnosis was confirmed by an ELISA test for *Leishmania* in our laboratory. The controls had no history of the disease and were negative in the ELISA test for *Leishmania*. Both, patients and controls lived in *La Chontalpa* - a region in the state of Tabasco, Mexico, with a population of Maya ancestry mainly characterized as Mexican-mestizo. This area is endemic for leishmaniasis and patients were chosen based on the requirement that they had been locals for at least three generations so the admixture analysis could be done assuming the usual parental populations.

Genomic DNA extraction and typing assays

Blood samples were taken from patients and controls and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by density-gradient centrifugation with Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Mononuclear cells were suspended in 1 mL of TRIZOL Reagent (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), mixed and incubated for 5 min at RT. Then, 0.2 mL chloroform were added (Sigma). The resulting solution was mixed and centrifuged at 19357 \times g for 15 min at 4°C. The transparent phase was discarded and 0.5 mL of absolute ethanol were added (Sigma). The resulting solution was mixed and centrifuged at 19357 \times g for 10 min at 4°C. The supernatant was discarded and 1 mL sodium citrate 100 mM (Sigma) was added to wash the pellet, it was mixed 30 min at RT and centrifuged twice at 2151 \times g for 5 min at 4°C. The pellet was washed with 1 mL ethanol 75%, mixed during 20 s and centrifuged at 2151 \times g for 5 min at 4°C. The ethanol was dried at RT and the pellet was suspended in RNase free water.

The presence of SNPs was analyzed for IL-1 β -511 (rs16944; TaqMan C_1839943_10), IL-1RA +2018 (rs419598; TaqMan C_8737990_10) and CXCL8 -251 (rs4073; TaqMan C_11748116_10) using 20 ng genomic DNA for the PCR analysis. Allelic discrimination was done using VIC and FAM fluorogenic TaqMan probes and the 5' nuclease assay. The PCR conditions included a step at 50°C for 2 min, a polymerase activation step at 95°C for 10 min followed by 40 cycles at 95°C during 15 s and 60°C for 1 min. These assays were done in a 7900 HT Fast Real Time PCR System. The call rates we established for the analysis were 90% individually (for every sample) and for every SNP. Experimentally the call rate we found was 99% for IL-1 β , 99.5% for IL-1RA and 92% for CXCL8 (IL-8).

Statistical Analysis

For genotyping, the statistical analysis was done with Universal R software.

For every SNP in the analysis, the genotype and allele frequencies were calculated and contingency tables were produced. The Hardy Weinberg equilibrium was calculated only in the control group using the Pearson Chi-squared test. The genotype frequencies were compared among cases and controls. The homozygote, heterozygote and serological ORs were calculated with both homozygote groups of reference. The statistical significance of these was evaluated using a Chi-squared test for association with a p-value of $p \leq 0.05$ as the threshold. Since each of these SNPs was selected for biological reasons before the data was collected, multiple comparison issues were not considered appropriate. Woolf [23] confidence intervals were also calculated.



Based on this, we found statistical evidence that for the IL-1 β polymorphism, the heterozygote group has a higher risk for disease development than the two homozygote ones.

The statistical analysis of the data for parasite numbers, Western-blot and ELISA tests, where different numbers of patients and controls were included, was done using the Mann Whitney test and $p \leq 0.05$ was considered significant. These statistical analyses were done using the Prism 5 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Analysis of serum IL-1 β by Western-blot

The serum expression of IL-1 β was analyzed by Western-blot in 9 LCL patients, 7 DCL patients and 4 controls. Venous blood was drawn and allowed to clot at 37°C for 2 h. Serum was separated by centrifugation at 576 \times g for 10 min at 4°C. Sera were diluted 1:2 with glycerol and stored at -20°C. For the Western-blot analysis, protein concentration was determined using DC Protein Assay Reagents Package (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and 120 μ g of serum protein were analyzed by SDS-PAGE in 15% acrylamide gels. Proteins were transferred onto Immobilon-P membranes using a semidry electroblotting apparatus. The membranes were blocked with 5% milk in Tris-buffer saline-Tween 20 (TBST: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, and 0.05% Tween 20) for 1 h at RT. Blots were incubated with cleaved IL-1 β (Asp116) polyclonal antibody (17 kDa, mature form of human IL-1 β) (2021S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) diluted in TBST with 5% BSA at 4°C overnight with shaking. Anti-rabbit IgG, HRP-linked (Cell Signaling Technology) diluted 1:3000 in 5% non-fat dry milk was used as secondary antibody with shaking at RT for 1 h. Blots were developed using Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and exposed to X-ray films. The densitometric analysis was performed by recording the intensity of the bands with a MultiImage Analyzer (Alpha Innotech Corporation) based on the percentage of integrity density value (IDV).

Monocyte purification

For the analysis of the *in-vitro* production of IL-1 β by monocytes isolated from human PBMC, blood samples were taken from 5 patients with cutaneous leishmaniasis with varying degrees of disease severity which included 3 LCL patients, one DCL patient with a lesser degree of dissemination and one DCL patient who was severely infected, having numerous nodules covering the entire body surface. As for controls, blood samples from 7 healthy individuals were used, of which 3 were born and lived within the same geographical area as the LCL and DCL patients, but had never developed the disease. The other 4 blood samples were obtained from healthy blood donors of the General Hospital of the Ministry of Health in Mexico City. Cells were separated by gradient centrifugation using Ficoll-Hypaque and mononuclear cells were isolated from the interface and washed. For the purification of monocytes, magnetically-labelled CD14 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) were used. CD14+ monocytes were washed and plated in 24-well culture plates.

Cytokine measurement

The IL-1 β production by non-stimulated monocytes was analyzed as follows: 1×10^6 cells were incubated for 18 h at 37°C and 5% CO $_2$ in 1 mL RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY) medium, supplemented with 10% heat-inactivated FBS, endotoxin free (Gibco). The cell-free supernatants from cultures were harvested and the concentrations of the cytokine were determined by ELISA. 96-well microtiter plates (Costar, Corning,

NY) were coated and sealed overnight at 4°C with assay diluent and unconjugated anti-cytokine capture antibody (88-7010 eBioscience). The wells were washed 5 times with wash buffer, blocked at RT for 1 h with assay diluent and washed again. The standard curve was performed with 2-fold serial dilutions (from 3.9 to 500 pg/mL) and samples were incubated overnight at 4°C and washed. Avidin-HRP diluted in assay diluent was added and incubated at RT for 30 min and washed 7 times with wash buffer. Each well was incubated for 15 min at RT with substrate solution and the stop solution was added. The plate was read in a μ Quant spectrophotometer (BIO-TEK, Vermont, USA) at 450 nm using the KC4 v3.4 program for the analysis of samples.

Immunohistochemistry (IHC) of tissue lesions

Skin punch biopsies (4-6 mm) were taken from the lesions of 6 DCL patients and 11 LCL patients; 8 of these LCL patients had 1 lesion ranging between 1 and 1.5 cm and 3 of the LCL patients had multiple lesions [3 to 6] ranging between 1 and 2 cm. The tissues were embedded in OCT compound and snap-frozen. They were cut into 4- μ m thick slices, fixed in acetone (PA [J. T. Baker] for 10 min at RT and hydrated in Tris-HCl 0.01M, NaCl 0.15M pH=7.4. Samples were blocked for endogenous peroxidase (Peroxo-Block, Invitrogen) and for nonspecific staining (protein block solution, Abcam, Cambridge, UK). Thereafter, samples were stained with anti-IL-1 β (1:100, ab8320, Abcam) or mouse anti-*Leishmania mexicana* immune sera for 1 h at RT and secondary antibodies were used as specified by the manufacturer (mouse and rabbit specific HRP/AEC detection IHC kit, ab94705, Abcam). The slides were counterstained with Mayer's haematoxylin (Biogenex, CA, USA). Normal skin without lesions was used as a negative-control. Digital images of tissue sections were captured using a light microscope and a color AxioCam MRc5 camera (Zeiss, Germany). In order to obtain the number of parasites in lesions of LCL and DCL patients, 7 pictures of each tissue were taken with a final area corresponding to 1 mm 2 . Additionally, 6 LCL patient lesions were stained with anti-*L. mexicana* antibodies for the parasite count. These 6 biopsies had previously been taken for routine diagnostic purposes. Taken together, parasites were counted in a total number of 17 LCL patients with lesions ranging between 1 and 1.5 cm.

Results

Polymorphism analysis

Within the control group, all SNPs were found to be in Hardy Weinberg equilibrium (HWE) with a p-value of $p = 0.0226$ and for cases (including LCL and DCL patients) they were in HWE with a p-value of $p = 0.024$. We also calculated the HWE with cases and controls as one population with the Haplowiew 4.1 software where the HWE test failed yielding a p-value of $p = 0.4998$. The comparison of the genotype frequencies between LCL patients and controls for the IL-1 β polymorphism showed that the homozygote frequencies were higher in the controls for both of the alleles, whereas the heterozygote frequency was higher in LCL patients compared to controls (60.3% y 38.2%, respectively) see TABLE 1. This suggests that we may have a risk associated to the development of the disease for the heterozygous genotype as opposed to a single allele risk association. As mentioned above, the odd ratios resulting of comparing the heterozygote C/T to the homozygote groups were found to be significant. The OR that compared it to the homozygote C/C was 3.23 [p-value = 0.0167, 95% CI = (1.2,8.7)]; the OR that had the homozygote T/T as reference group was 2.19 [p-value = 0.0274, 95% CI = (1.06,4.4)]. All other ORs calculated are shown in TABLE 2. In contrast, the



Table 1. Distribution of genotypic and allelic frequencies for IL-1 β -511 (C/T) polymorphism in cases and controls.

Subjects	IL-1 β (-511 C/T) genotypes number (%)			Allele frequencies in %		Gender % (M/F ¹)	Age (years)
	CC	CT	TT	C	T		
Cases	6 (10.3)	35 (60.3)	17 (29.4)	40.5	59.5	M = 29, F = 26	11–64
Controls	26 (21.1)	47 (38.2)	50 (40.7)	40.2	59.8	M = 35, F = 66	7–88

¹M = Male, F = Female, (3 cases and 22 controls, gender unknown). All patients were diagnosed by Giemsa-stained smears of the lesions, Montenegro skin hypersensitivity test and/or ELISA against *Leishmania*. doi:10.1371/journal.pntd.0001533.t001

results for CXCL8 -251 and IL-1RA +2018 were not statistically significant (data not shown).

Since the sample size of DCL patients is only 6, it is questionable to draw any conclusions from this sample. As an exploratory step for further research, we repeated the procedure above using all leishmaniasis patients (58 LCL and 6 DCL) as the case group. Results for IL-1 β were again statistically significant: OR = 3.7 when the heterozygote C/T is compared to the homozygote C/C [p = 0.006, 95% CI = (1.38, 9.85)] and OR = 2.4 when the heterozygote C/T is compared to the homozygote T/T [p = 0.012, 95% CI = (1.19, 4.6)]. There seems to be no change in the conclusions drawn for the LCL patients. However, this might be due entirely to the sample size of the DCL group. No analysis was performed using only DCL patients as cases, due to the small sample size. Based on the discussion of Sasieni (1997) [24], we decided not to use the allelic OR. The second-order analysis (gene-gene association) of the samples used in this study showed no significant results (data not shown).

Serum IL-1 β analysis by Western-blot

The analysis of IL-1 β expression in sera of LCL and DCL patients showed a different expression between both groups of patients. LCL patients showed a lower expression of this cytokine (Figure 1A, lanes 5–13) and DCL patients showed enhanced expression of IL-1 β (Figure 1A, lanes 14–20). In contrast to patients with leishmaniasis, controls showed only minimal amounts of IL-1 β (Figure 1A, lanes 1–4). A statistically significant difference was found (Figure 1B) when comparing IL-1 β expression in sera from LCL patients vs controls (p = 0.01), DCL patients vs controls (p = 0.0052) and when comparing DCL patients vs LCL patients (p = 0.019).

Cytokine production by monocytes

The analysis of IL-1 β production revealed that non-stimulated monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis had a significant increase of their production of IL-1 β when compared

with healthy controls (p = 0.015) (Figure 2). The individual analysis of the IL-1 β production by monocytes from patients showed that the degree of IL-1 β production could be related to the severity of the disease, since it was highest in patients with DCL (478 pg/mL in the DCL patient with the more severe form and 423 pg/mL in the patient with the less severe form), as compared to LCL patients in whom the production of IL-1 β was between 50 to 336 pg/mL.

Immunohistochemistry

The analysis of IL-1 β in lesions of LCL and DCL patients showed that the cytokine distribution varied between both groups of patients: in LCL lesions, we observed two possible patterns of IL-1 β expression, according to parasite numbers in the lesions. In one group (Figure 3A) the cytokine was localized on the cell surface, showing an intense stain. This type of stain was found in lesions of LCL patients that harbored few parasites (Figure 3B). The second group of LCL patients showed a diffuse distribution pattern of IL-1 β staining (Figure 3C), which correlated with the diffuse staining of abundant remnants of parasites (Figure 3D). It is noteworthy that the first group of LCL patients only had one small ulcer, less than 1 cm in diameter, whereas the second group of LCL patients had 3 to 6 active lesions which varied between 1 and 2 cm in diameter. In contrast, all DCL patients showed a diffuse distribution of IL-1 β throughout the lesions (Figure 3E) all of which were also heavily infected with intact *Leishmania mexicana* parasites (Figure 3F).

These results show that the characteristics of the distribution of IL-1 β in the tissue varies according to parasite numbers: LCL patients with few parasites in their lesions only show cell membrane staining, whereas all DCL patients, with abundant intact parasites in their lesions as well as some LCL patients with abundant destroyed *Leishmania* parasites, show a diffuse pattern of IL-1 β staining.

The number of IL-1 β positive cells in the tissues was different for each patient (18 to 410 cells) and did not have any correlation with the time of evolution of the disease nor with the numbers parasites (data not shown). The number of parasites was significantly different in the lesions of LCL and DCL patients (p = 0.0003) (Figure 4).

Discussion

The aim of the present study was to determine single nucleotide polymorphisms of IL-1 β (-511), CXCL8 (-251) and IL-1RA (+2018) in patients with cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana*. We evaluated two groups of persons (cases and controls) that lived in the same endemic region. This study for the first time demonstrated polymorphism in the gene IL-1 β -511 in Mexican-mestizo patients from Tabasco, a state with high prevalence of patients with cutaneous leishmaniasis. Our results show that 90% of the individuals infected with *Leishmania mexicana*

Table 2. Statistical analysis of IL-1 β -511 SNP.

Group	Reference group	OR	CI	χ^2	p-value
CT	CC	3.23	(1.2, 8.7)	5.72	0.016
TT	CC	1.47	(0.5, 4.1)	0.53	0.465
CT+TT	CC	2.32	(0.9, 6.0)	3.15	0.075
CT	TT	2.19	(1.08, 4.4)	4.86	0.027
CC	TT	0.68	(0.2, 1.9)	0.53	0.465
CT+TT	TT	1.65	(0.8, 3.2)	2.17	0.140

doi:10.1371/journal.pntd.0001533.t002

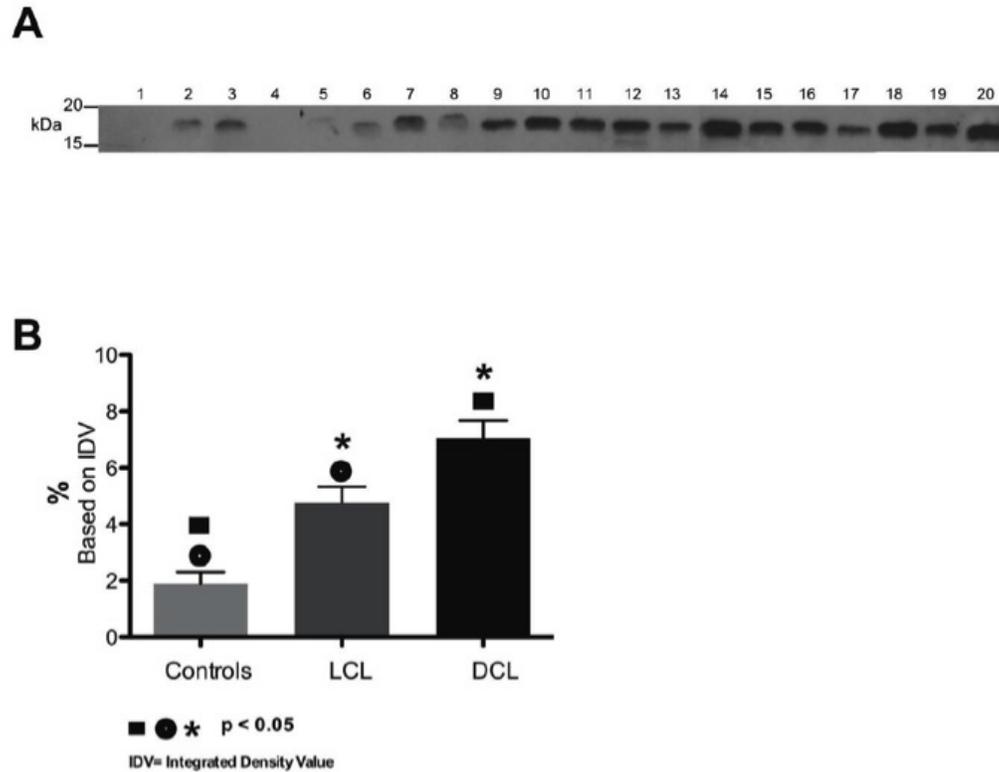


Figure 1. IL-1 β expression in serum of patients with cutaneous leishmaniasis. (A) Western blot of mature IL-1 β (17 kDa) in 4 controls (1–4), 9 LCL patients (5–13) and 7 DCL patients (14–20). (B) Graph of percentage intensity of IL-1 β bands with statistically significant differences between controls vs LCL patients, controls vs DCL patients and LCL vs DCL patients. (Identical symbols above different bars are statistically significant: $p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pntd.0001533.g001

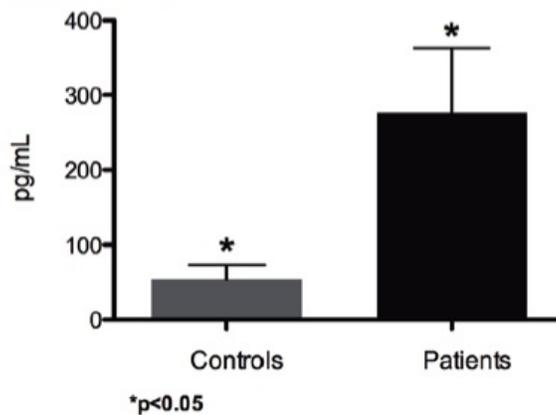


Figure 2. Analysis of IL-1 β cytokine production by non-stimulated monocytes purified with anti-CD14 magnetic beads from PBMC of control subjects and patients with cutaneous leishmaniasis after 18 hours *in vitro* culture. Mean values obtained from 7 healthy control subjects and 5 patients with leishmaniasis. (Identical symbols above two different bars are statistically significant: $p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pntd.0001533.g002

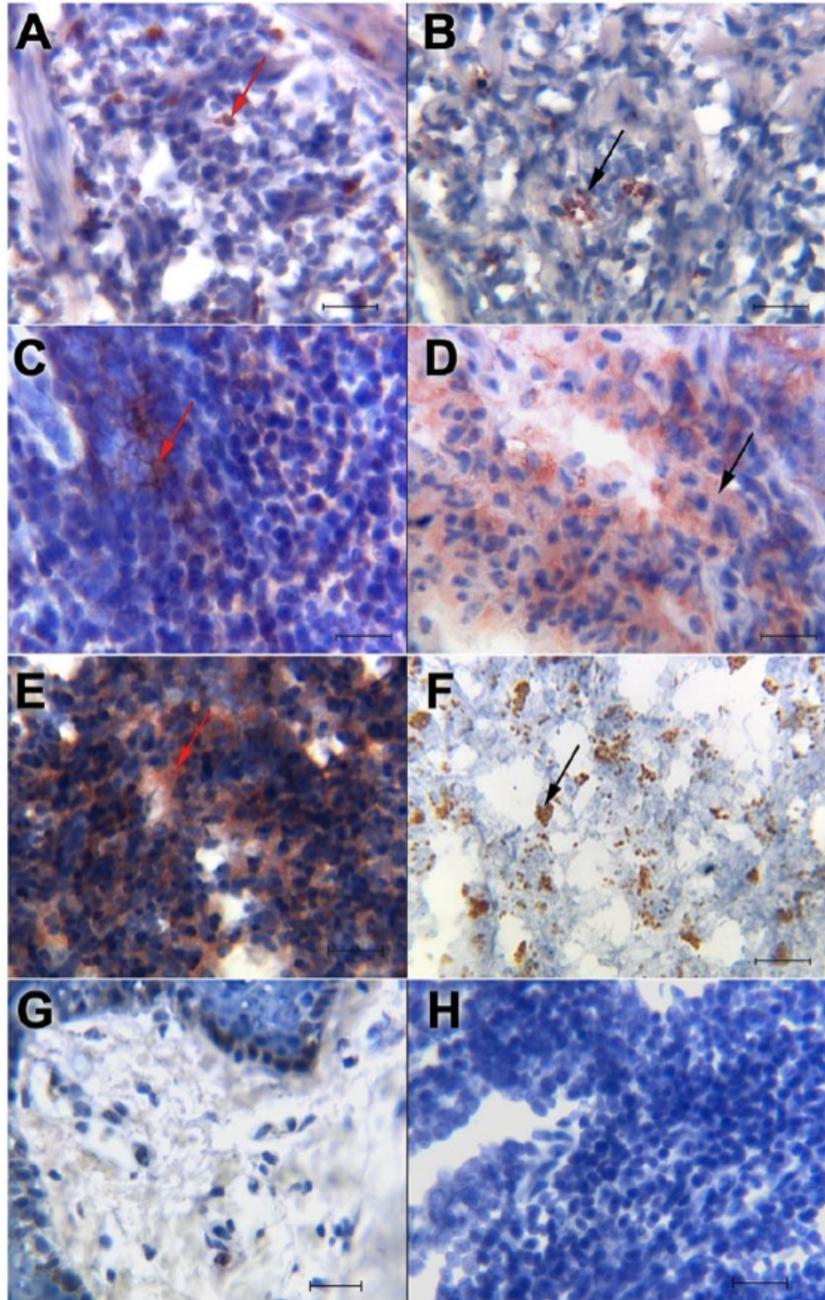


Figure 3. Immunohistochemistry for IL-1 β and *Leishmania mexicana* staining in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis. (A) IL-1 β staining on cells of LCL patient with single small lesion; (B) small clusters of *Leishmania* parasites in LCL patient with small ulcer; (C) diffuse distribution of IL-1 β in LCL patient with abundant ulcers; (D) disintegrated *Leishmania* in LCL patient with abundant ulcers; (E) diffuse distribution of



IL-1 β in DCL patient; (F) clusters with abundant intact *Leishmania* parasites in DCL patient. Red arrows show IL-1 β ⁺ staining and black arrows show *L. mexicana* staining. (G) Normal skin was used as negative control for IL-1 β immunostaining. (H) Control staining with secondary antibody. All sections were counterstained with haematoxylin. (A–H) scale bar=50 μ m. Immunostaining in tissue sections was visualized at a magnification of 400 \times . We show a representative result of different types of lesions within each group: LCL patients with one small ulcer: (n=8 for IL-1 β staining and n=17 for *L. mexicana* staining) (A and B); LCL patients with various ulcers (n=3) (C and D); DCL patients (n=6) (E and F). doi:10.1371/journal.pntd.0001533.g003

had, either a heterozygote genotype (CT), or were homozygous for the minor allele (TT). Of these, 60% had the heterozygous genotype (CT), as compared to only 38% for the healthy controls. These data suggest that the presence of this polymorphism in a heterozygous genotype may favor disease development in patients infected with *Leishmania mexicana*.

Disease susceptibility or resistance has been correlated to genetic variations [25]. Specifically, polymorphism in the gene for IL-1 β (-511) has been associated with increased inflammation [26]. This cytokine activates the vascular endothelium, enhancing adhesion molecule expression, which, in combination with local vasodilatation, slows blood flow, permitting the tethering of neutrophils to the vessel wall. Locally released CXCL8 acts as an activator and chemoattractant for neutrophils [27], which can produce significant damage due to the release of pro-inflammatory granules and enzymes [28]. Inflammation has been shown to be a hallmark in cutaneous leishmaniasis and various polymorphisms, related to increased or extended inflammation, have been associated with the disease [29–31]. Neutrophils have been shown to play an important role in leishmaniasis. They are decisive for the early establishment of the disease following delivery of parasites by the bite of the sand fly [6] and their enhanced recruitment has been shown to contribute to disease susceptibility [8]. The facilitating role of neutrophils has been associated with their capacity to phagocytose the parasites and rapidly transport them from the infection site, thus avoiding the toxic effects of complement and the local immune responses [7]. The inflammatory response aids *Leishmania*-infected phagocytic cells to enter lymphatic vessels, favoring parasite distribution towards peripheral tissues [32]. It is therefore tempting to speculate that augmented IL-1 β production possibly facilitates disease progression in patients with DCL by enhancing the inflammatory response and thereby

aiding parasite dissemination. Thus we suggest that IL-1 β (-511 C/T) genotype heightens the risk of developing the disease due to the fact that this polymorphism is located in the promoter region of the IL-1 β gene, which has been related to enhanced cytokine production and enhanced inflammatory disease. We propose that patients with this genotype are likely to be associated with an enhanced production of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β , when the patient is infected with *Leishmania mexicana*. The enhanced *in vitro* production of IL-1 β by monocytes, and the augmented expression of this cytokine in sera of patients heavily infected with *Leishmania mexicana*, possibly strengthen the importance of IL-1 β as a factor to develop the more severe form of the disease, although we cannot rule out that the enhanced IL-1 β production is a consequence, rather than a cause, of the more severe form of the disease. Our data are in accordance with the literature [33] regarding the presence of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β in severe tissue lesions. Additionally, disease exacerbation has also been related to IL-1 β in the BALB/c mouse model [34]. Furthermore it has been reported that IL-1 β ^{-/-} C57BL/6 mice, infected with *Leishmania major*, were resistant to experimental cutaneous leishmaniasis [35].

The enhanced production of IL-1 β by monocytes and serum of patients with the more severe form of the disease led us to analyze the cytokine in tissue lesions of patients with varying disease severity. We found that the distribution of IL-1 β varied in tissue lesions in accordance with the numbers of parasites present in those lesions. Thus, in heavily infected lesions of some of the patients with LCL and in all of the DCL patients, the secreted IL-1 β was found diffusely distributed within the lesions, whereas in LCL patients with a lower number of parasites, IL-1 β was found to be within the cells. To the best of our knowledge, this differential distribution of IL-1 β , according to varying degrees of inflamma-

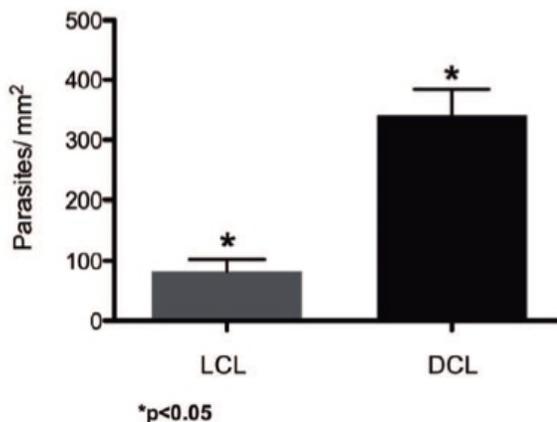


Figure 4. Statistical analysis of the number of parasites/mm² in lesions between LCL and DCL patients. Mean values were obtained from 17 LCL patients and 6 DCL patients with leishmaniasis. (Identical symbols above two different bars are statistically significant: p<0.05). doi:10.1371/journal.pntd.0001533.g004



tory lesions, has not been described in the literature. IL-1 β production can be induced by microbial products via TLR ligands. Our group has previously shown that *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan (LPG) is a TLR2 ligand, leading to cell activation [36]. It is thus feasible, that the enhanced presence of the parasite relates to an increased IL-1 β production. The differential distribution could be related to the possible presence of an alternative (noncaspase-1) mechanism of generating active forms of IL-1 β extracellularly in tissues. This alternative activating pathway has been reported for a number of molecules including serine protease-3 released by infiltrating neutrophils, as well as for other proteases such as elastase, matrix metalloprotease 9 and granzyme A released from cytotoxic T cells and mast cell chymase, which can process the IL-1 β precursor into an active cytokine [37,38]. It is noteworthy that neutrophils secrete serine protease-3 together with extracellular traps, which have been shown to be released when the cells are stimulated with *Leishmania* or LPG [39,40]. The overall consequence of the diffusely distributed IL-1 β in tissue lesions that are heavily infected with *Leishmania mexicana* is not clear, since in LCL patients IL-1 β was associated with parasite destruction, whereas in DCL patients the parasite was not destroyed, despite the equal distribution of IL-1 β . It is therefore tempting to speculate that IL-1 β is not directly involved in parasite killing, but rather in aiding the mobility of phagocytosed *Leishmania* to be transported outside of the lesions. In DCL patients with impaired leishmanicidal capacities, IL-1 β possibly aids parasite distribution by enhancing the inflammatory response. Thus, enhanced IL-1 β production and distribution seems more critical in patients that have underlying problems limiting their leishmanicidal capacity, such as in patients with DCL. These results open a new perspective regarding the dynamics of IL-1 β release in tissues heavily infected with *Leishmania mexicana*.

In conclusion, our data show that leishmaniasis patients with IL-1 β polymorphism have a heightened risk to develop the disease. Additionally we show that patients with a more severe form of the disease show an enhanced IL-1 β production. Yet it remains to be established if the polymorphism relates directly with disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana*. We propose that this might be the case, based on reports that the

polymorphism is located in the promoter region of the IL-1 β gene which has been shown to lead to enhanced IL-1 β production [26].

Our data help shed new light on the genes involved in the disease outcome. Further studies aimed at analyzing allelic and genotypic distributions in the Mexican population will help clarify the differences we observed between cases and controls in polymorphisms implicated in susceptibility to leishmaniasis in our population. Only a few genes that determine susceptibility in the complex relationship between the parasite and the host immune response have been identified [41]. The analysis of IL-1 β and other proteins that participate in inflammation like caspase-1 and -5 or NALP3, in a larger group of patients, could possibly help define to what extent polymorphisms and enhanced production of IL-1 β contribute to various clinical forms of leishmaniasis.

Accession links for numbers/ID numbers for genes and proteins mentioned in the text:

IL-1 β :

Protein: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01584>

Gene: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000567.1

(CXCL8) IL-8:

Protein: <http://www.uniprot.org/uniprot/P10145>

Gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAH13615.1>

IL-1RA:

Protein: <http://www.uniprot.org/uniprot/P18510>

Gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA36262.1>

Acknowledgments

The authors thank M. Sc. Juan Carlos Fernández López for many helpful suggestions in the genomic analysis. We are grateful to M. Sc. Adriana Ruiz Remigio for her technical support and to Ph.D. Gabriela Mercado Celis for the TaqMan probes.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EAFF GRE IB SMM. Performed the experiments: EAFF NSS. Analyzed the data: EAFF GRE VEM NSS IB. Contributed reagents/materials/analysis tools: NSS GRE VEM KCS GCF. Wrote the paper: EAFF IB CRE.

References

1. Ji J, Sun J, Soong L (2003) Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 71: 4278–4288.
2. Olivo-Diaz A, Debaz H, Alaez C, Islas VJ, Pérez Pérez H, et al. (2004) Role of HLA class II alleles in susceptibility to and protection from localized cutaneous leishmaniasis. *Hum Immunol* 65: 255–261.
3. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Jr., Schriefer A, Machado PR, et al. (2005) Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 73: 7853–7859.
4. Hernández-Ruiz J, Salazar-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, et al. (2010) CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis* 4(11): e871.
5. Carrada G, Cañeda C, Salazar N, Delgado J, Ruiz A, et al. (2007) Monocyte cytokine and stimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol* 29: 117–126.
6. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, et al. (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* Aug 15; 321: 917–918.
7. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W (2008) Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiol* 213: 183–191.
8. Lopez KS, Dinges S, Grievank K, Iwakura Y, Udey MC, et al. (2009) IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* Mar 1; 182: 3039–3046.
9. Miller IS, Pietras E M, Uricchio LH, Hirano K, Rao H, et al. (2007) Inflammation-mediated production of IL-1 β is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* in vivo. *J Immunol* 179: 6993–6942.
10. Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral Netto M, Barral A (2006) Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 22: 32–40.
11. Benko S, Philpott D, Girardin S (2008) The microbial and danger signals that activate Nod like receptors. *Cytokine* 43: 368–373.
12. Petrilli V, Dostert C, Muruve D, Tschopp J (2007) The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 19: 615–622.
13. Weber A, Wasiliew P, Kracht M (2010) Interleukin-1 β (IL-1 β) processing pathway. *Immunol* 3: 1–2.
14. Garza González E, Bosques Padilla EJ, El Omar E, Hold G, Tijerina Menchaca R, et al. (2005) Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer* 114: 237–241.
15. Zabaleta J, Camargo MC, Flazuelo MB, Fontham E, Schneider BG, et al. (2006) Association of interleukin-1beta gene polymorphisms with precancerous gastric lesions in African Americans and Caucasians. *Am J Gastroenterol* 101: 163–171.
16. Daque AM, Salazar LM, Veléz MI, Martínez CA (2007) Polimorfismo de il-1 β como marcador genético en enfermedad periodontal. *Revista CES Odontología* 20: 51–58.
17. Nemetz A, Toth M, García González MA, Zagoni T, Feher J, et al. (2001) Allelic variation at the interleukin 1beta gene is associated with decreased bone mass in patients with inflammatory bowel diseases. *Gut* 49: 644–649.
18. Erbek SS, Yurtcu E, Erbek S, Atac FB, Sahin FI, et al. (2007) Proinflammatory cytokine single nucleotide polymorphisms in nasal polyposis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 133: 705–709.
19. Kang JM, Kim N, Lee DH, Park JH, Lee MK, et al. (2009) The effects of genetic polymorphisms of IL-6, IL-8, and IL-10 on *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases in Korea. *J Clin Gastroenterol* 43: 420–428.
20. Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglu Z, Derka S, Vassiliou S, et al. (2007) The interleukin-8 (-251 A/T) polymorphism is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 33: 504–507.



21. Whyte M, Hubbard R, Meiconi R, Whidborne M, Eaton V, et al. (2000) Increased risk of Fibrosing Alveolitis associated with Interleukin-1 Receptor Antagonist and Tumor Necrosis Factor- α gene polymorphisms. *Am J Resp Care Med* 162: 755–768.
22. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao Silva F, et al. (1993) Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91: 1390–1395.
23. Woolf B (1955) On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 19: 251–253.
24. Sasienski PD (1997) From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 53: 1253–1261.
25. Hidalgo MA, Silva ZI, Barrientos E, March MS, Del Bosque PL, et al. (2006) Proyecto Mapa genómico de los mexicanos: El genoma y sus implicaciones en la salud. *Ciencia y Desarrollo*. pp 34–53.
26. Read RC, Cannings C, Naylor SC, Timms JM, Maheswaran R, et al. (2003) Variation within genes encoding interleukin-1 and the interleukin-1 receptor antagonist influence the severity of meningococcal disease. *Ann Intern Med* 38: 534–541.
27. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678–689.
28. Srisakandian S, Altmann DM (2008) The immunology of sepsis. *J Pathol* 214: 211–223.
29. Kamali SE, Rasouli M, Mortazavi H, Ghareh FB (2006) Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. *Cytokine* 35: 159–165.
30. Matos GI, Covas CJ, Bitar R, Gomes Silva A, Marques F, et al. (2007) IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence *Leishmania* induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis* 7: 33.
31. Brajao K, Reiche EM, Kaminami MH, Pelegrinelli FM, Estevo D, et al. (2007) Analysis of the CC chemokine receptor 5 delta32 polymorphism in a Brazilian population with cutaneous leishmaniasis. *J Cutan Pathol* 34: 27–32.
32. Villaseñor MI, Saliza N, Delgado J, Gutiérrez I, Pérez A, et al. (2008) Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host. *Parasite Immunol* 30: 425–434.
33. Boaventura V, Santos C, Cardoso C, de Andrade J, Dos Santos W, et al. (2010) Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol* 40: 2830–2836.
34. Voronov E, Dotan S, Gayvoronsky I, White RM, Cohen I, et al. (2010) IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *Int Immunol* 22: 245–257.
35. Kautz K, Kostka S, Dinges S, Iwakura Y, Udey M, et al. (2010) IL-1 signalling is dispensable for protective immunity in *Leishmania*-resistant mice. *Exp Dermatol* 20: 76–78.
36. Becker I, Salazar N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, et al. (2003) *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 130: 65–74.
37. Dinarello CA (2011) A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol* 41: 1203–1217.
38. van den Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA (2011) Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol* 32: 110–116.
39. Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, et al. (2009) *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6728–6753.
40. Meyer-Hoffert U, Wiedow O (2010) Neutrophil serine proteases: mediators of innate responses. *Curr Opin Hematol* 18: 19–24.
41. Frodsham AJ, Hill AV (2004) Genetics of infectious diseases. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 2: R187–194.

Capítulo 9

Preparación de soluciones



9.1. PBS 1X (Amortiguador salino de fosfatos)

Para preparar 1 L: disolver en 500 mL de agua desionizada 0.414 g de NaH_2PO_4 y cuando se disuelva por completo agregar 1.704 g de Na_2HPO_4 . Agregar el NaCl, mezclar hasta que se disuelva, aforar a 1 L y filtrar. El pH final será de 7.3. Almacenar a 4° C.

9.2. Solución Lítica

Para preparar 500 mL de solución: disolver en 400 mL de agua desionizada 4.14 g de NH_4Cl , 0.4 g de KHCO_3 y 18.6 mg de EDTA (de peso molecular 292.25), ajustar a pH= 7.4 con HCl, aforar a 500 mL y filtrar. Almacenar a 4° C.

9.3. Citrato de Sodio 0.1 M en etanol al 10 %

Para preparar 200 mL: mezclar 170 mL de agua desionizada y 20 mL de etanol absoluto grado biología molecular y en esta solución disolver 5.88 g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y aforar a 200 mL. Almacenar a TA.

9.4. Ácido tricloroacético 77 %-acetona

Pesar 77 g de ácido tricloroacético y aforar a 100 mL con acetona pura. Almacenar a -20° C.



9.5. Amoriguador de lisis celular RIPA

Preparar por separado las siguientes soluciones:

- **Tris-base 1 M, pH= 7.4.**

Disolver en 25 mL de agua desionizada 3.63 g de Tris-base y ajustar a pH= 7.4 con HCl. Aforar a 30 mL. Almacenar a 4° C.

- **NaCl 1 M.**

Disolver en 25 mL de agua desionizada 1.75 g de NaCl y aforar a 30 mL. Almacenar a 4° C.

- **EDTA 50 mM (peso molecular 292.25).**

Disolver en 25 mL de agua desionizada 0.44 g de EDTA e ir adicionando gotas de NaOH 1 M hasta que se disuelva por completo el EDTA, aforar a 30 mL. Almacenar a 4° C.

- **Na₃VO₄ 100 mM, pH= 10.**

a) Disolver en 25 mL de agua desionizada: 0.552 g de Na₃VO₄ y ajustar a pH= 10 con HCl.

b) La solución cambiará de color a naranja, hervirla hasta que cambie a transparente y dejar enfriar a temperatura ambiente.

c) Volver a medir el pH y ajustarlo de nuevo a pH= 10 con HCl o NaOH según sea el caso (si el pH se ajustó con NaOH la solución seguirá transparente).

d) Reperir el inciso b y c hasta que la solución quede a pH= 10 después de enfriar. Aforar a 30 mL, hacer alícuotas de 1 mL y almacenar a -20° C. Si al descongelar la solución forma precipitados calentar en baño maría hasta que desaparezcan.



■ **NaF 100 mM.**

Disolver en 25 mL de agua desionizada 0.125 g de NaF, aforar a 30 mL. Almacenar a 4° C.

■ **PMSF 200 mM.**

Disolver en 5 mL de isopropanol: 0.17 g de PMSF. Hacer alícuotas de 100 μ L y almacenar a -20° C. Este reactivo se descongela a temperatura ambiente hasta que se disuelvan los cristales que se forman.

■ **Aprotinin 10 mg/mL.**

Disolver en 1 mL de agua desionizada 0.1 g de aprotinin. Hacer alícuotas de 10 μ L y almacenar a -20° C.

■ **Leupeptin 1 mg/mL.**

Disolver en 1 mL de agua desionizada 0.001 g de leupeptin. Hacer alícuotas de 10 μ L y almacenar a -20° C.

■ **DTT 10 mM.**

Disolver en 2 mL de agua desionizada 0.0308 g de DTT. Hacer alícuotas de 50 μ L y almacenar a -20° C.

Para preparar 2 mL de amortiguador RIPA:

- Disolver en 1186 μ L de agua desionizada a TA: 20 μ L de Nonident-P40 y homogeneizar hasta que se disuelva por completo.
- Adicionar 20 μ L de Tris-base 1 M,



- Adicionar 300 μ L de NaCl 1 M,
- Adicionar 40 μ L de EDTA 50 mM,
- Adicionar 200 μ L de Na₃VO₄ 100 mM,
- Adicionar 200 μ L de NaF,
- Adicionar 2 μ L de aprotinin 10 mg/mL,
- Adicionar 2 μ L de leupeptin 1 mg/mL,
- Adicionar 10 μ L de PMSF 10 mM.

Mantener el amortiguador en hielo hasta su uso.

Nota: El PMSF y el DTT se adicionan al amortiguador justo antes de comenzar la lisis celular.

9.6. Amortiguador de rehidratación

Para preparar 25 mL amortiguador: Disolver en 10 mL de agua desionizada 10.5 g de urea, 3.8 g de thiourea, 500 μ L de CHAPS y 50 μ L de azul de bromofenol al 1%. Aforar a 25 mL con agua desionizada. Hacer alícuotas de 1 mL y almacenar a -20° C.

Nota: a) Se utilizan 70 mg de DTT por cada 25 mL de amortiguador, que se adicionan al momento de utilizarlo (si se utilizan menos de 25 mL de amortiguador adicionar lo que se requiera de DTT para el volumen a utilizar).

b) Se utilizan 125 μ L de anfolitas por cada 25 mL de amortiguador (si se utilizan menos de 25 mL de amortiguador adicionar lo que se requiera de DTT para el volumen a utilizar).



9.7. BSA a 5 y a 1 mg/mL

5 mg/mL. Para preparar 1 mL: Disolver en 9 μ L de agua desionizada 5 mg de BSA. Aforar a 1 mL. Hacer alícuotas de 50 μ L y almacenar a -20° C.

1 mg/mL. Para preparar 100 μ L: Mezclar 80 μ L de agua desionizada y 20 μ L de BSA 5 mg/mL.

9.8. Reactivos para Western-blot

Preparar por separado las siguientes soluciones:

- **Amortiguador concentrador. Tris-base 0.5 M, pH= 6.8, SDS 0.4 %.**

Para preparar 50 mL de amortiguador: Disolver en 40 mL de agua desionizada 3.02 g de Tris-base, ajustar a pH= 6.8, adicionar 0.2 g de SDS y aforar a 50 mL con agua desionizada. Almacenar a 4° C.

- **Amortiguador separador. Tris-base 1.5 M, pH= 8.8, SDS 0.4 %.**

Para preparar 50 mL de amortiguador: Disolver en 40 mL de agua desionizada 9.08 g de Tris-base, ajustar a pH= 8.8, adicionar 0.2 g de SDS y aforar a 50 mL con agua desionizada. Almacenar a 4° C.

- **Persulfato de amonio 10 %.**

Para preparar 10 mL de solución: Disolver en 8 mL de agua desionizada 1 g de de PSA y aforar a 10 mL con agua desionizada. Hacer alícuotas de 150 μ L y almacenar a -20° C.



■ **Acrilamida-bisacrilamida 30 %.**

Para preparar 100 mL de solución: Disolver en 60 mL de agua desionizada 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida, aforar a 100 mL con agua desionizada y filtrar.

Almacenar a 4° C. De ser posible desgasificar la solución después de filtrarla.

9.8.1. Geles 1D

La siguiente tabla muestra el volumen que se utiliza de cada solución para preparar 2 geles de 0.75 mm de grosor.

	Separador				Concentrador
	Gel al 5%	Gel al 7.5%	Gel al 10%	Gel al 15%	----
Amortiguador separador	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	----
Amortiguador concentrador	----	----	----	----	750 µL
Acrilamida-bis-acrilamida	1.69 mL	2.5 mL	3.3 mL	4.9 mL	500 µL
Agua desionizada	5.81 mL	5 mL	4.2 mL	2.6 mL	1.75 mL
PSA 10%	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	40 µL
TEMED	7 µL	7 µL	7 µL	7 µL	3 µL

9.8.2. Amortiguador Laemmli 2X

Para preparar 10 mL de amortiguador: Mezclar 2.5 mL de amortiguador concentrador (ver sección Western-blot), 0.4 g de SDS, 2 mL de glicerol, 1 mL de β -mercaptoetanol, tomar con la punta de un palillo pironina-Y y con otra punta azul de bromofenol. Mezclar hasta homogenizar la solución. Hacer alícuotas de 0.5 mL y almacenar a -20° C.



9.8.3. Amortiguador de corrida 1X

Para preparar 1 L de amortiguador: Disolver en 900 mL de agua desionizada 3 g de Tris-base y ajustar a pH= 8.3. Adicionar 14.2 g de glicina y 1 g de SDS. Aforar a 1 L y almacenar a 4° C.

9.8.4. TBST 10X

Para preparar 1L de amortiguador: Disolver en 800 mL de agua desionizada 12.11 g de Tris-base y ajustar a pH= 7.4. Adicionar 87.7 g de NaCl y 5 mL de Tween 20. Aforar a 1 L y almacenar a 4° C. Para preparar 1 L de TBST 1X: Mezclar 900 mL de agua desionizada y 100 mL de TBST 10X.

9.8.5. Amortiguador de transferencia semi-seco 1X

Para preparar 1 L de amortiguador: Disolver en 700 mL de agua desionizada 3.02 g de Tris-base y 14.41 g de glicina. Cuando este completamente homogenizada la solución adicionar 200 mL de metanol y aforar a 1 L con agua destilada. Almacenar a 4° C.

9.8.6. Leche y/o BSA al 5 %

Para preparar 100 mL de leche o BSA: Disolver en 90 mL de TBST 1X 5 g de leche o BSA (según sea el caso), mezclar y aforar a 100 mL con TBST 1X. Ajustar el volumen de TBST 1X y los gramos de leche o BSA cuando se necesite menos o más volumen.



9.9. Soluciones para geles 2D

9.9.1. Azul de bromofenol 1 %

Para preparar 10 mL: Mezclar en 10 mL de agua desionizada 100 mg de azul de bromofenol y 60 mg de Tris-base. Almacenar a 4° C.

9.9.2. Amortiguador de equilibrio (reductor)

Para preparar 200 mL de amortiguador: Disolver 40 mL de agua desionizada 72.1 g de urea, 10 mL de amortiguador separador (ver sección de Western-blot), 69 mL de glicerol, 4 g de SDS, 400 μ L de azul de bromofemol al 1 % y aforar a 200 mL con agua desionizada. Hacer alícuotas de 10 mL y almacenar a -20° C.

Descongelar a TA el amortiguador y por cada 10 mL que se utilicen adicionar 100 mg de DTT justo antes de incubar.

9.9.3. Amortiguador de equilibrio (alquilante)

Para preparar 200 mL de amortiguador: Disolver 40 mL de agua desionizada 72.1 g de urea, 10 mL de amortiguador separador (ver sección de Western-blot), 69 mL de glicerol, 4 g de SDS, 400 μ L de azul de bromofemol al 1 % y aforar a 200 mL con agua desionizada. Hacer alícuotas de 10 mL y almacenar a -20° C.

Descongelar a TA el amortiguador y por cada 10 mL que se utilicen adicionar 250 mg de iodoacetamida justo antes de incubar.



9.9.4. Azul de Coomassie

Para preparar 1 L de solución: Mezclar 400 mL de agua desionizada, 100 mL de ácido acético, 20 g de azul brillante y 500 mL de etanol durante toda la noche a TA. Filtrar la solución y almacenar a TA.

9.9.5. Solución desteñidora

Para preparar 1 L de solución: Mezclar 500 mL de agua desionizada, 100 mL de ácido acético y 400 mL de metanol.

9.10. Soluciones para digestión de proteínas

- **Bicarbonato de amonio 50 mM.**

Para preparar 5 mL de solución: Disolver en 5 mL de agua desionizada 19.765 mg de NH_4HCO_3 .

- **Acetonitrilo (ACN) 50 % - NH_4HCO_3 50 mM.**

Para preparar 50 mL: Disolver en 25 mL de agua desionizada 197.65 mg de NH_4HCO_3 y 25 mL de ACN.

- **DTT 10mM.**

Para preparar 1 mL de solución: Disolver en 1 mL NH_4HCO_3 50 mM 1.5 mg de DTT.

- **Iodoacetamida 100mM.**



Para preparar 1 mL de solución: Disolver en 1 mL NH_4HCO_3 50 mM 18.5 mg de iodoacetamida.

■ **Tripsina 25 ng/ μL .**

A un stock de 50 μL (100 ng/ μL) de tripsina agregar 150 μL de NH_4HCO_3 50 mM.

Nota:

a) Las soluciones de Iodoacetamida y DTT es necesario preparadas 1h antes de utilizarse, debido a la estabilidad de estas.

b) A un vial de tripsina de 100 μg agregar 1 mL de NH_4HCO_3 50 mM para obtener una concentración de 100 ng/ μL , resuspender suavemente. Hacer alícuotas de 50 μL y almacenar a -20°C .

9.11. Solución de extracción de péptidos

■ **Amortiguador de extracción 50 % (v/v) acetonitrilo, 5 % (v/v) ácido fórmico.**

Para preparar 5 mL de solución: Disolver en 2.5 mL de acetonitrilo 250 μL de ácido fórmico y aforar a 5 mL con agua desionizada.

■ **Solución de equilibrio. Ácido trifluoroacético (TFA) 0.1 %.**

Para preparar 5 mL de solución: Disolver en 4.995 mL de agua desionizada 5 μL de TFA.

■ **Solución de elusión. Acetonitrilo 50 % - TFA 0.1 %**

Para preparar 5 mL de solución: Disolver en 4.995 de ACN al 50 % 5 μL de TFA.



Nota: Las soluciones son estables por 7 días a 4°C, sin embargo, se recomienda preparar en el momento de su uso, por lo que es necesario preparar sólo la cantidad requerida para el número de muestras a procesar. Los volúmenes especificados en esta sección están calculados para aproximadamente 20 muestras, sin embargo, los volúmenes pueden variar dependiendo del pedazo de gel a procesar.

9.12. Amortiguador de lavado para placas de ELISA

Para preparar 1 L de amortiguador: Mezclar 1 L de PBS 1X y 5 mL de Tween-20. Filtrar y almacenar a 4° C.