



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PARTICIPACIÓN DE LAS MAP CINASAS EN EL
EFECTO INHIBIDOR EJERCIDO POR *Leishmania
mexicana* EN LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS
DENDRÍTICAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JORGE RODRÍGUEZ GONZÁLEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
2012**



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Rodríguez
González
Jorge
54 21 60 22
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300114337
2. Datos del tutor
Dra.
Laila
Gutiérrez
Kobeh
3. Datos del sinodal 1
Dra.
María Magdalena
Aguirre
García
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Lilian
Yepez
Mulia
5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Isabel Cristina
Cañeda
Guzmán
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Augusto José
González
Canto
7. Datos del trabajo escrito
Participación de las MAP cinasas en el efecto inhibitor ejercido por *Leishmania mexicana*
en la apoptosis de las células dendríticas
62 p.
2012

AGRADECIMIENTOS

A Dios mi Señor todo poderoso, a mi salvador y Señor Jesucristo y al Espíritu Santo, por su infinito amor. Por ponerme a prueba y darme la fuerza para salir adelante. Por ser mi guía y mí consuelo. Por poner en mi camino a la gente, el momento y las cosas precias.

A la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, porque siempre permitió que explorara mis propias ideas y desarrollara mis capacidades como investigador científico. Por todo el apoyo que me brindó, que sin ello no habría sido posible la culminación de este trabajo y por nunca haber perdido la confianza en mí. Por ser una gran persona, investigadora y tutora.

Al Biol. Arturo W. Rodríguez, por compartir su amplia experiencia en el laboratorio conmigo, ya que sin esta, el presente trabajo habría demorado más tiempo. Por alentarme a realizar un mejor trabajo y seguir adelante en los momentos más difíciles del mismo. Por todos sus consejos, por exigirme un mejor trabajo y por su amistad.

A la M. en C. Alma R. Escalona, por toda su ayuda en el laboratorio, por sacarme de tantos apuros con el weternblot. Porque siempre, a pesar de sus múltiples responsabilidades, hacia un espacio para ayudarme. Por su infinita paciencia y por su amistad.

A la M. en C. Cristina Cañeda, por ayudarme con los análisis estadísticos, por ser una gran profesora, por todo el apoyo que me dio y por su amistad.

Al M. en C. Jesús Argueta, por su apoyo y explicaciones en relación a la técnica de citometría de flujo y el cultivo de las moDC.

A la Dra. Norma Salaiza y la M. en C. Edith Fernández, por su apoyo en la realización de la técnica de TUNEL, la toma de las micrografías y el posterior análisis de las mismas.

A la Dra. Becker, por permitirme desarrollar mi trabajo en las instalaciones del laboratorio que preside.

De manera muy especial y con mucho cariño, a mi madre Rosina González Virueta, por el enorme esfuerzo que significó hacer para que su hijo llegara a la universidad, por todos los sacrificios que ha realizado a lo largo de su vida en nombre de sus hijos. Porque este trabajo es más de ella que mío. Por su infinito amor y por ser la mejor persona y madre del mundo.

A mis hermanas, Jacqueline y Nely, por su compañía, por ser cómplices de tantas aventuras, por todos los momentos de felicidad y también de tristeza que pasamos, pero sobre todo porque siempre permanecemos unidos. Por todo el apoyo que me han dado.

A todos mis tíos que han tenido que fungir como padres, pero sobre todo a mi tío Arturo, por ser un gran ejemplo de hombre, por corregirme cuando era necesario, por sus consejos y también por todo el apoyo que me ha dado. Por el enorme cariño con el que, desde bebe, me ha criado.

A mi novia Wendy N. Flores, el amor de mi vida, por soportarme desde que iniciamos juntos la carrera y hasta estos días en que la estoy terminando. Por darme su amor, apoyo, comprensión, amistad, por regañarme cuando no hacia las cosas bien. Por prestarme su hombro para llorar y desahogarme. Te amo princesa.

A Lorena, por su amistad y cariño, por hacer más amenos los momentos de tedio en el laboratorio. Por todos los cigarros con largas charlas que hemos pasado juntos.

A la señora Susana, por su amistad y por hacer más amena mi estancia en el laboratorio, por todos los consejos que me ha dado y sobre todo por el cariño que nos une. También es menester agradecerle su labor en el laboratorio, pues siempre lo ha desempeñado de la mejor manera.

A mi amiga Paloma, por todos los consejos que me dio en los momentos más duros de mi vida, en esos en que no le encuentras sentido a la vida, pues te ha quitado a un ser tan amado. Por su amistad y cariño.

Al Ing. en Sistemas Omar, por ayudarme a recuperar los datos de mi computadora cuando se dañó.

A todos aquellos que por falta de memoria no los he mencionado, pero que también me acompañaron a lo largo de esta travesía.

DEDICATORIA

**CON MUCHO CARIÑO A LA MEMORIA DE MI MAMÁ ELVIRA VIRUETA Y A
MÍ TÍO DARIO GONZÁLEZ.**

I. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. El sistema inmune.....	9
1.2. Los monocitos.....	10
1.3. Las células dendríticas.....	11
1.3.1. Subpoblaciones de las células dendríticas humanas.....	12
1.4. <i>Leishmania</i>	13
1.4.1. Taxonomía.....	14
1.4.2. Morfología y ciclo de vida.....	15
1.5. Respuesta inmune contra <i>Leishmania</i>	16
1.5.1. Papel de las células dendríticas en la respuesta inmune contra <i>Leishmania</i> ...	17
1.6. Inhibición de la apoptosis por parásitos.....	17
1.6.1. Modulación de la apoptosis por <i>Leishmania</i>	19
1.7. Apoptosis.....	21
1.7.1. La vía extrínseca.....	21
1.7.2. La vía perforina/granzima.....	22
1.7.3. La vía intrínseca o mitocondrial.....	22
1.7.4. La vía del retículo endoplásmico.....	24
1.7.5 Regulación de la vía intrínseca.....	25
1.8. Las cinasas activadas por mitógenos MAPK.....	26
1.8.1. Participación de las MAP cinasas en la apoptosis.....	27
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29

III. HIPÓTESIS.....	30
VI. OBJETIVO.....	31
4.1. Objetivo general.....	31
4.2. Objetivos específicos.....	31
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
5.1. Obtención de las células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica humana (moDC).....	32
5.2. Caracterización de los monocitos humanos y de las moDC.....	32
5.3. Cultivo de los promastigotes de <i>L. mexicana</i>	33
5.4. Infección y estímulo de las moDC.....	34
5.5. Análisis por Wester Blot de la fosforilación de las MAP cinasas p38 y JNK...34	
5.6. Determinación de la translocación de la fosfatidilserina por citometría de flujo con Anexina-V.....	35
5.7. Análisis de la fragmentación del DNA por TUNEL.....	36
VI. RESULTADOS.....	37
6.1. Caracterización de los monocitos.....	37
6.2. Caracterización de las moDC.....	38
6.3. <i>L. mexicana</i> inhibe la apoptosis de las moDC inducida por la CPT.....	39
6.4. <i>L. mexicana</i> inhibe la fosforilación inducida de JNK por la CPT en las moDC.....	41
6.5. <i>L. mexicana</i> inhibe la fosforilación inducida en p38 por la CPT en las moDC.....	43

6.6. Los inhibidores específicos de JNK y p38 logran inhibir parcialmente la translocación de la fosfatidilserina.....	45
6.7. Los inhibidores específicos de JNK y p38 logran inhibir parcialmente la fragmentación del DNA.....	47
VII. DISCUSIÓN.....	49
VIII. CONCLUSIONES.....	53
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formas clínicas de la leishmaniasis.....	13
Figura 2. Diagrama del ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	16
Figura 3. Representación esquemática de las vías de inducción de la apoptosis.....	23
Figura 4. Apoptosis por la vía del retículo endoplásmico.....	25
Figura 5. Esquema de la vía de señalización de las MAPK activadas por estrés.....	28
Figura 6. Expresión de diferentes moléculas de superficie de los monocitos humanos analizada por citometría de flujo.....	37
Figura 7. Expresión de diferentes moléculas de superficie en las moDC analizada por citometría de flujo.....	38
Figura 8. Efecto de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> en la translocación de la fosfatidilserina en las moDC.....	40
Figura 9. Efecto de <i>L. mexicana</i> y la CPT en la fosforilación de JNK.....	42
Figura 10. Efecto de <i>L. mexicana</i> y la CPT en la fosforilación de p38.....	44
Figura 11. Efecto de los inhibidores específicos de JNK (SP600125) y de p38 (SB203580) en la translocación de la fosfatidilserina.....	46
Figura 12. Efecto de los inhibidores específicos de JNK (SP600125) y de p38 (SB203580) sobre la fragmentación del DNA analizadas por TUNEL.....	48
Tabla 1. Inhibición o inducción de la apoptosis por diferentes organismos patogénicos.....	19

I. INTRODUCCIÓN

1.1. El sistema inmune

El sistema inmune se ha dividido de manera clásica en el sistema inmune adaptativo y el sistema inmune innato. El sistema inmune innato es de respuesta inmediata, ya que es el primero que se presenta ante la entrada de un organismo patogénico en un lapso de horas posteriormente a la infección. Si la infección no es contenida por la respuesta inmune innata, entra en funciones el sistema inmune adaptativo. El sistema inmune adaptativo se encuentra constituido básicamente por dos tipos celulares los linfocitos T y B. Cada linfocito posee un receptor estructuralmente único, generado por recombinación somática, lo que redundante en una enorme diversidad de receptores que permite a los linfocitos reconocer una gran variedad de antígenos. Al reconocer prácticamente cualquier antígeno se corre el riesgo de que los linfocitos también reconozcan antígenos propios, por lo que es necesaria la participación de células que se encarguen de eliminar a los linfocitos autorreactivos. Esta eliminación se da durante el desarrollo de los linfocitos B en la médula ósea y de los linfocitos T en el timo. Aquellos linfocitos que reconocen a los antígenos propios con avidez y afinidad elevadas son eliminados por un proceso de selección negativa. Aún así, es gracias a esta gran diversidad de reconocimiento que los linfocitos tienen mayores probabilidades de reconocer un antígeno extraño, llevándolos a la activación y proliferación o expansión clonal. Este proceso puede tardar de tres a cinco días para producir el número suficiente de clonas y diferenciarlas en células efectoras. En contraste, los mecanismos efectoras del sistema inmune innato, que incluyen, péptidos antimicrobianos, células fagocíticas (neutrófilos, monocitos/macrófagos y células dendríticas) y la vía alternativa del complemento, son activados inmediatamente después de la infección y controlan rápidamente la duplicación de los patógenos. Las células del sistema inmune innato presentan un número limitado de receptores específicos para estructuras moleculares microbianas altamente conservadas, llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), por lo que no reconocen antígenos propios. Los receptores de las células del sistema inmune innato encargados de reconocer a los PAMP son llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRR). El reconocimiento de los PAMP por las células del sistema inmune innato (principalmente las células dendríticas) induce la

expresión de moléculas coestimuladoras, citocinas y quimiocinas, las cuales reclutan y activan a los linfocitos antígeno específicos iniciando así la respuesta inmune adaptativa (Medzhitov y Janeway, 2000).

1.2. Los monocitos

Una de las principales poblaciones celulares implicada en la respuesta inmune innata es la de los monocitos. Los monocitos son reguladores y efectores críticos de la inflamación y la respuesta inmune innata. En un principio, la función más importante que se les atribuyó fue como reservorios sistémicos de precursores mieloides para la renovación de algunos macrófagos tisulares y células dendríticas, sin embargo, la evidencia actual indica que dicha renovación no se debe principalmente a los monocitos. Los datos recientes indican que los monocitos tienen una gran capacidad efectora ante diferentes estímulos, ya que se sabe que pueden producir altas concentraciones de especies reactivas del oxígeno (ROS), proteínas del complemento, prostaglandinas, citocinas tales como TNF- α , IL-1 β , CXCL8, IL-6 e IL-10, enzimas proteolíticas y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Los monocitos expresan MHC-II y pueden presentar antígenos, aunque no lo hacen tan eficientemente como las células dendríticas (Serbina et. al., 2008; Auffray et. al., 2009).

En humanos se han descrito tres poblaciones de monocitos en relación a la presencia de los marcadores de superficie CD14 y CD16. Los monocitos clásicos, CD14⁺CD16⁻CXCR1^{Low}CCR2^{Hi}, son altamente fagocíticos, producen IL-10 ante el estímulo con el lipopolisacárido (LPS) y son la población más abundante de monocitos. Los monocitos no clásicos, CD14⁺CD16⁺CXCR1^{Hi}CCR2^{Low}CD64⁺CD32⁺, tienen una baja actividad fagocítica y producen TNF- α e IL-1 ante el estímulo con LPS. Por último, se encuentran los monocitos CD14^{Low}CD16⁺CD64⁻CD32⁻, que prácticamente no fagocitan y no producen TNF- α ni IL-1 ante el estímulo con LPS (León et. al., 2005; Tacke y Randolph, 2006; Auffray et. al., 2009).

La ontogenia de los monocitos humanos aún no queda completamente clara, sin embargo, se ha observado que guarda grandes similitudes con el modelo murino. A partir de células madre hematopoyéticas surgen progenitores mieloides (MP) y linfoides (LP). El MP da origen al precursor común de macrófagos/células dendríticas (MDP) que a su vez puede dar

origen tanto a los monocitos como a los precursores comunes de las células dendríticas (CDP). El CDP da origen a las células dendríticas convencionales y a las células dendríticas plasmacitoides (Auffray et. al., 2009; Geissmann et. al., 2010). Los monocitos en condiciones basales no dan origen a las células dendríticas, sin embargo, durante los procesos inflamatorios pueden dar origen a células dendríticas inflamatorias (Geissmann et. al. 2010). *In vitro* se pueden obtener células dendríticas convencionales inmaduras a partir de los monocitos CD14⁺ utilizando citocinas tales como: GM-CSF e IL-4 (Sallusto y Lanzavecchia, 1994; León et. al., 2005).

1.3. Las células dendríticas

Las células dendríticas junto con los monocitos/macrófagos y los linfocitos B forman parte del conjunto de células profesionales presentadoras de antígeno (APC). Las células dendríticas fueron descritas por primera vez por Paul Langerhans en 1868 como células cutáneas del sistema nervioso debido a las proyecciones citoplásmicas o dendritas. Sin embargo, fue más de un siglo después que se describió el papel que juegan en la captura, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T, resultando ser las células dendríticas, las iniciadoras más potentes de la respuesta inmune adaptativa, así como las responsables de la inducción y mantenimiento de la tolerancia a lo propio en condiciones basales y el desarrollo de la memoria inmunológica (Banchereau et. al., 2000; Shortman y Liu, 2002; Geissman et. al., 2010). Las células dendríticas se encuentran en órganos linfoides y no linfoides. Cuando se encuentran en órganos no linfoides funcionan como centinelas y se encuentran en estado inmaduro. Una vez que capturan e inician el procesamiento de algún antígeno migran hacia los órganos linfoides perdiendo la capacidad de capturar otros antígenos, con lo que se convierten en células dendríticas maduras que pueden inmunoestimular a las células T vírgenes y reclutarlas a la zona donde originalmente capturaron el antígeno (Banchereau y Steinman, 1998; Mellman et. al., 1998).

1.3.1. Subpoblaciones de las células dendríticas humanas

Existen diversas subpoblaciones de células dendríticas, típicamente se han dividido en dos grupos: las células dendríticas convencionales o de origen mieloides y las plasmacitoides o de origen linfoides.

Las células dendríticas representan apenas el 3% del total de las células mononucleares de la sangre periférica y dentro de este total, las células dendríticas mieloides son las más abundantes, pues representan el 80%. Todas las células dendríticas mieloides se caracterizan por presentar el marcador de superficie de linaje mieloides, el CD11c, mientras que las células dendríticas linfoides no lo presentan (Rossi y Young, 2005). Dentro de las células dendríticas mieloides se encuentran distintos grupos tales como:

- Las células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica (moDC): provienen de un precursor CD14⁺, se diferencian en CD14^{neg}, CD11c⁺, CD83⁺⁺, HLA-DR⁺, CD1a⁺, en un medio enriquecido con GM-CSF e IL-4. Estas dan origen generalmente a las células dendríticas inmaduras fagocíticas.
- Las células dendríticas de la dermis o intersticiales (DDC o IDC): se localizan en el tejido subepitelial de la dermis en la piel y en los intersticios de los órganos. Presentan marcadores de superficie tales como: CD1a, CD1d, CD11b, CD11c, CD83.
- Las células de Langerhans (LC): éstas se encuentran en la epidermis. Presentan gránulos de Birbeck, marcadores de superficie tales como: langerina, E-cadherina, CD1a, CD11c y carecen de CD1d y CD11b (Rossi y Young, 2005).

Se cree que las células dendríticas plasmacitoides (pDC) tienen origen linfoides, ya que carecen de marcadores de linaje mieloides y expresan marcadores linfoides, producen mRNA tanto para la Ig-K como para el receptor- α de las células pre-T. Poseen un fenotipo único de marcadores de superficie celular (CD4⁺, CD123⁺⁺ y CD11c⁻). Responden a estímulos virales y microbianos produciendo interferones de clase I (IFN- α/β) (Shortman et. al., 2002). Se sabe también que las células dendríticas plasmacitoides presentan los marcadores de superficie BDCA-2 y BDCA-4 (Dzionek et. al., 2000).

El reconocimiento y la activación subsecuente de las células dendríticas por parte de agentes infecciosos es clave para la inducción de la respuesta inmune adaptativa y de esta manera controlar la infección. Un organismo patogénico que es reconocido por las células dendríticas y cuya activación es fundamental para el control de la infección es el parásito *Leishmania*. Además de las células dendríticas, este parásito infecta a los macrófagos y otras células como los neutrófilos.

1.4. *Leishmania*

Los protozoarios del género *Leishmania* son parásitos intracelulares obligados, que causan la enfermedad llamada leishmaniasis, la cual se distribuye principalmente en el holotrópico y es causada por varias especies del mismo género (Fig. 1).

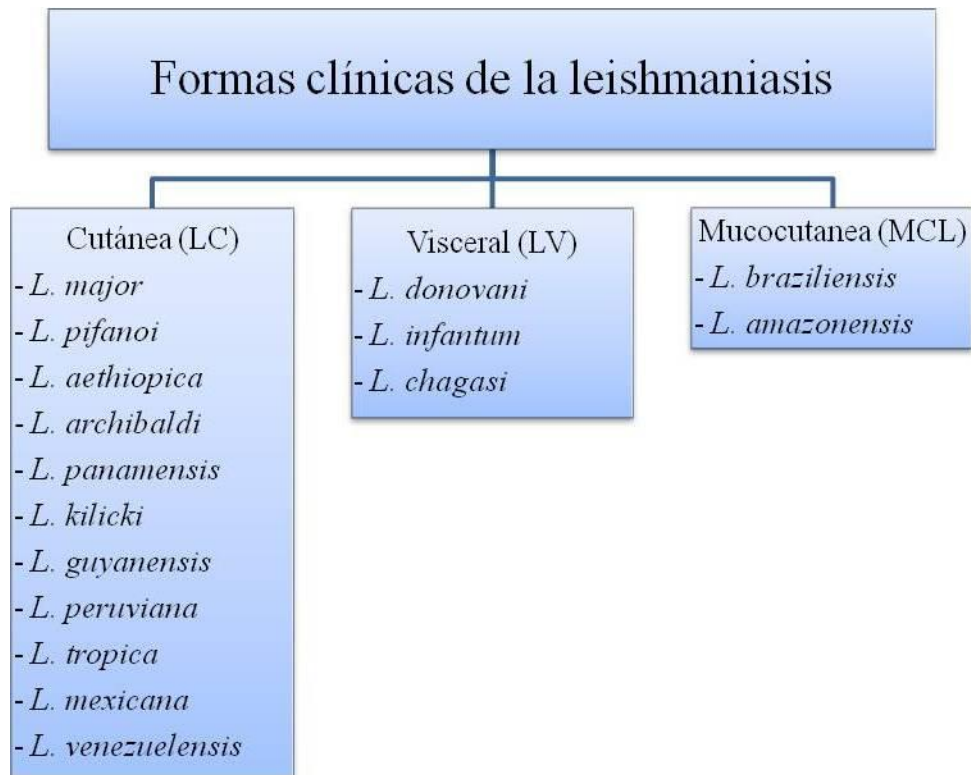


Figura 1.- Especies de *Leishmania* que causan diferentes cuadros clínicos de la enfermedad (Murray et. al., 2005).

Esta enfermedad tiene un amplio espectro de manifestaciones clínicas, como son: la leishmaniasis subclínica, en la cual las personas infectadas con el parásito no presentan ningún síntoma, la leishmaniasis cutánea localizada, en la que las personas infectadas

desarrollan una lesión única en la piel y la leishmaniasis diseminada (cutánea, mucocutánea y visceral), en la que el parásito disemina e infecta diferentes tejidos. La leishmaniasis visceral es la forma clínica con mayor índice de mortalidad de todas las formas. Las diferentes formas clínicas dependen tanto de la especie de *Leishmania*, como de la respuesta inmune del hospedero (Murray et. al., 2005).

En México, la leishmaniasis es causada por *Leishmania mexicana* y es comúnmente conocida como “la úlcera del chiclero”, ya que quienes principalmente la presentaban, eran las personas que se dedicaban a la explotación del árbol del chicle. Este es un ejemplo clásico de una lesión única, por lo que encaja perfectamente en la leishmaniasis cutánea localizada. Sin embargo, esta misma especie puede provocar varias lesiones nodulares diseminadas en toda la piel, exceptuando el cuero cabelludo, las plantas y las palmas junto con los genitales (Murray et. al., 2005), dando lugar a la manifestación clínica conocida como leishmaniasis cutánea diseminada.

En cuanto a la epidemiología, en México, la enfermedad no es de notificación obligatoria, por lo tanto, la prevalencia e incidencia de casos son difíciles de conocer. Se estima que anualmente se presentan 400 casos nuevos de leishmaniasis en el país (Secretaría de Salud) y la población en riesgo incluye a más de 9 millones de habitantes distribuidos en 149 municipios de 13 estados de la República Mexicana, la mayoría de ellos ubicados en el sur y sureste de México (Becker, 2006).

1.4.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica del género *Leishmania*, que a continuación se presenta, es la propuesta por Corliss (1994), ya que es una clasificación amigable, útil y comprensible para todos aquellos interesados en el tema. Este sistema taxonómico incorpora líneas tradicionales, pero también datos ultraestructurales y moleculares, además une el pasado con el presente y el futuro (Aladro, 2006).

Imperio Eukaryota

Reino Protozoa (Goldfuss, 1818)

Phylum Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981)

Clase Kinetoplastidea (Honigberg, 1963)

Orden Trypanosomatida (Kent, 1880)

Género *Leishmania* (Ross, 1903)

1.4.2. Morfología y ciclo de vida

Leishmania tiene un ciclo de vida digenético, es decir, que necesita de un vector (mosca) y un hospedero vertebrado (mamífero).

Este vector es una mosca hematófaga del género *Lutzomyia* en el continente americano y del género *Phlebotomus* en el continente euroasiático y africano. En el vector se desarrolla el estadio de promastigote, el cual se caracteriza por ser fusiforme, medir entre 12 y 20 μm y presentar un flagelo anteronuclear. El desarrollo del promastigote consta de dos fases, la primera de ellas es el promastigote procíclico, el cual se desarrolla y reproduce por fisión binaria y permanece adherido al intestino medio de la mosca; La siguiente fase es la de promastigote metacíclico, el cual es infectivo; en esta fase se desprende del intestino medio de la mosca y migra a la faringe y a la cavidad bucal. Esta transformación se produce principalmente por los cambios estructurales que sufre la molécula de superficie más abundante del parásito, el lipofosfoglicano (LPG), que es una de las moléculas que participan en la adhesión al epitelio del intestino medio de la mosca y posteriormente en la separación del mismo. La mosca al picar para alimentarse inocula los promastigotes metacíclicos al hospedero definitivo, es decir mamíferos (v.g. el humano), y éstos son internalizados rápidamente por las células fagocíticas. El promastigote sobrevive, se transforma y se reproduce en el interior del fagolisosoma de dichas células. Ahí se transforma a la forma de amastigote, la cual se caracteriza por ser ovoide, medir entre 2.5 y 3.5 μm y carecer de flagelo. El amastigote se divide intensamente por fisión binaria hasta lisis a la célula, de esta manera el amastigote se libera e infecta células vecinas. El ciclo se cierra cuando la mosca pica al hospedero definitivo infectado y a su vez se infecta o reinfecta con amastigotes (Becker et. al., 2004) (Fig. 2).

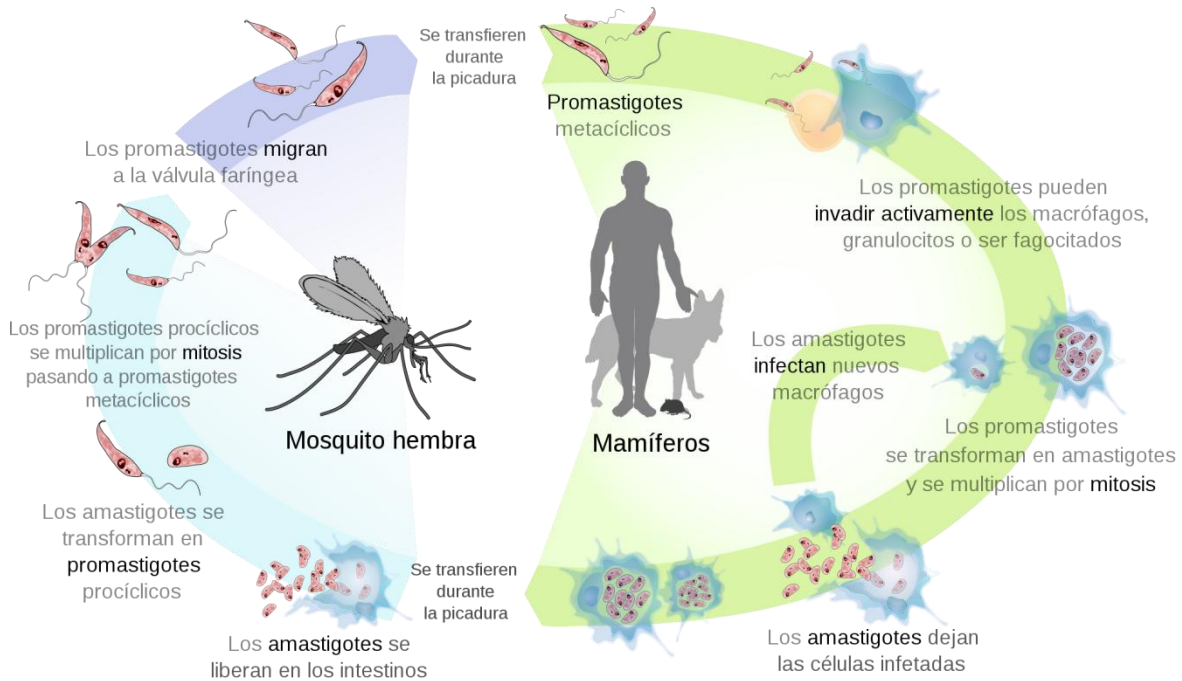


Figura 2.- Diagrama del ciclo de vida de *Leishmania*. Se observa la diferenciación del parásito en la mosca transmisora y en el hospedero vertebrado (Wikipedia).

1.5. Respuesta inmune contra *Leishmania*

Como se mencionó anteriormente, *Leishmania* es reconocido y fagocitado por células como los macrófagos y las células dendríticas, sin embargo, se ha demostrado que los neutrófilos son las primeras células en ser infectadas (Peters et. al., 2008).

El parásito infecta a los macrófagos a través de receptores tales como el receptor del complemento CR1 y del receptor para la fosfatidilserina, los cuales son receptores que no activan a los macrófagos. Durante la infección, *Leishmania* inhibe la producción de la IL-12, regula negativamente la expresión del MHC-II, promueve la producción de citocinas reguladoras tales como IL-10 y TGF- β , y logra inhibir la producción de óxido nítrico (NO) (Nylén y Gautam, 2010).

Una vez que el parásito ha establecido la infección, se ha demostrado en el modelo murino que la respuesta Th1 (producción de IL-12, IFN- γ , TNF- α), definida por los linfocitos T CD4⁺ o también llamados T cooperadores, está asociada con la cura de la enfermedad,

mientras que la respuesta Th2 (producción de IL-4, IL-10, TGF- β) está asociada con la progresión de la enfermedad (Becker et. al., 2004).

1.5.1. Papel de las células dendríticas en la respuesta inmune contra *Leishmania*

Las células dendríticas son cruciales en el desarrollo de la leishmaniasis dada su gran capacidad para producir IL-12, la que a su vez es una potente citocina inductora de la respuesta Th1. En el modelo murino se demostró que al infectar células dendríticas con *L. major*, es esta población de células la principal fuente de IL-12 (Belkaid et. al., 1998).

Por otro lado está demostrado que *Leishmania* interfiere con el proceso de maduración de las células dendríticas y que las células dendríticas inmaduras, a diferencia de las células dendríticas maduras, promueven una respuesta Th2. En este sentido, se observó que al infectar células dendríticas con *L. mexicana*, no sólo dejan de producir IL-12, sino que tampoco se induce la maduración. Sin embargo, al infectar en presencia de LPS e IFN- γ se logra restaurar la producción de IL-12 junto con la maduración (Bennett et. al., 2001). Se sabe también que al infectar CD humanas con *L. major*, se requiere la presencia de CD-40L para lograr producir IL-12, aunque, en ausencia de CD40-L, el proceso de maduración no se ve afectado (Marovich et. al., 2000).

La interacción de *Leishmania* con los diferentes subtipos de células dendríticas genera diferentes respuestas. De esta manera, las pDC no internalizan a *Leishmania*, producen IFN- α/β y muy poca IL-12 (Soong, 2008). En cambio las DDC logran internalizar al parásito y activan la respuesta Th1, mientras que las LC captan el antígeno liberado por el parásito (moléculas secretadas o debris generado al morir la célula) o de las células hospederas dañadas para activar otros subtipos de linfocitos T (Ritter y Osterloh, 2006).

Una vez que *Leishmania* logra ingresar a las células dendríticas u otra célula hospedera, debe asegurar la sobrevivencia. Para lograr esto una estrategia importante es la inhibición de la apoptosis.

1.6. Inhibición de la apoptosis por parásitos

Cualquier microorganismo parásito intracelular necesita inhibir la apoptosis de la célula hospedera para aumentar su propia sobrevivencia, ya que la inducción de la apoptosis por

los linfocitos T citotóxicos o las células NK, es un mecanismo muy efectivo para eliminar tanto al parásito como a la célula infectada. Al inhibir la apoptosis, se aumenta el tiempo en el que el parásito se puede reproducir y así invadir más células vecinas. Entre los parásitos que se sabe tienen como estrategia de sobrevivencia la inhibición de la apoptosis están, *Cryptosporidium parvum*, *Leishmania* ssp., *Plasmodium* ssp., *Trypanosoma cruzi*, *Theileria* ssp. y *Toxoplasma gondii* (Carmen y Sinai, 2007). Los factores mediadores del organismo patogénico responsables de esta modulación aún no se conocen del todo, pero se sabe que los parásitos interactúan con diversos sistemas reguladores de la apoptosis con el fin de revertirla durante fases críticas de la infección intracelular que incluyen la invasión, establecimiento y replicación (Tabla 1). Se sabe que la etapa del ciclo de vida del parásito tiene un impacto sobre la modulación de la apoptosis al igual que su diferenciación. El análisis de las interacciones hospedero/parásito sobre la modulación de la apoptosis revela que son complejas y dinámicas y diferentes estudios las están definiendo de manera más precisa. (Carmen y Sinai, 2007).

Se conoce ampliamente que *Leishmania* logra inhibir la apoptosis de la célula hospedera, ya sean macrófagos (Moore y Matlashewski, 1994; Akarid et. al., 1994; Ruhland et. al., 2007), neutrófilos (Aga et. al., 2002) y células dendríticas (Valdés-Reyes et. al. 2009; de Oyarzabal, 2011).

Tabla 1. Inhibición o inducción de la apoptosis por diferentes organismos patogénicos (Carmen y Sinai, 2007).

Especies	Tipo de modulación	Población celular	Tipo de célula ^a	Mecanismo
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Inducción	Células epiteliales intestinales y biliares	HC	Incrementa niveles de Fas y FasL
<i>L. donovani</i>	Inhibición	Células epiteliales intestinales	HC	Activa NF- κ B
	Inducción	Células T CD4 ⁺	IC	ND
<i>L. braziliensis</i>	Inhibición	Macrófagos	HC	Induce TNF- α , ¿otros?
	Inducción	Células t (CD4 ⁺ y CD8 ⁺)	IC	ND
<i>Plasmodium</i>	Inducción	Linfocitos	IC	Incrementa niveles de Fas y FasL
<i>Theileria parva</i>	Inhibición	Células T	HC	Activa NF- κ B
<i>Toxoplasma gondii</i>	Inducción	Macrófagos; células T	IC; HC	Anergia mediada por activación;
	Inhibición	Macrófagos; diferentes líneas celulares	HC	sobrerregulación de Fas Expresión de HSP65; sobrerregulación de A1; ¿otros?
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Inducción	Células T;	IC; HC	Interacción Fas-FasL,
	Inhibición	macrófagos Macrófagos; líneas células neuronales	HC; ND	NO, INF- γ ; INF- γ HSP65

^a El tipo celular indica si el efecto modulador de la apoptosis del parásito afecta a la célula hospedera (HC) o las células no infectadas del sistema inmune (IC).
Abreviaturas: ND; no determinado.

1.6.1. Modulación de la apoptosis por *Leishmania*

Como ya se mencionó anteriormente, *Leishmania* es un parásito protozoario intracelular que infecta principalmente macrófagos y células dendríticas. Está demostrado que la infección de los macrófagos por los promastigotes de *L. donovani* o el LPG inhiben la apoptosis de estas células, aún en ausencia de factores de crecimiento exógenos. Este efecto se observó también con los sobrenadantes colectados de los macrófagos infectados con el parásito y se relacionó con la existencia de un factor soluble producido por las células infectadas como mediador de esta inhibición. La infección de los macrófagos indujo la expresión de genes para diferentes citocinas y algunas de éstas como TNF- α y GM-CSF recombinantes, aplicadas de manera exógena, inhibieron la apoptosis inducida por la eliminación del M-CSF (Moore y Matlashewski, 1994). La inhibición de la apoptosis

inducida por la privación del M-CSF se demostró también en los macrófagos infectados con *L. major*. En este estudio se comparó el efecto inhibitorio de la apoptosis en macrófagos de ratones susceptibles y resistentes a la infección por *L. major* y no se encontraron diferencias en la inhibición de la apoptosis entre las dos cepas. La inhibición de la apoptosis e inactivación de las caspasas efectoras se asoció con la represión de la liberación mitocondrial del citocromo *c* y no se relacionó con la vía de NF- κ B (Akarid et al., 2004). Por otro lado, se demostró que la exposición de la línea celular de monocitos U-937 a los promastigotes de *L. infantum*, medio condicionado de los parásitos o al LPG, inhibió al apoptosis inducida por la actinomicina (Lisi et al. 2005) y la apoptosis de los macrófagos se inhibe por *Leishmania* en una forma dependiente de la cepa del parásito utilizada (Donovan et al. 2009).

Aunque los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son capaces de internalizar a los promastigotes de *Leishmania*, estas células no se consideran hospederas de este parásito, principalmente por su corto tiempo de vida. Está demostrado que la coincubación de los PMN con los promastigotes de *L. major* disminuye la apoptosis de manera significativa y este efecto antiapoptótico está asociado con una reducción de la actividad de la caspasa 3 (Aga et al., 2002). Nuestro grupo de trabajo demostró que los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* inhiben la apoptosis de otra de las células hospederas del parásito, las células dendríticas. Se demostró que la infección de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos con los amastigotes o los promastigotes de *L. mexicana* inhibe la translocación de la fosfatidilserina, los cambios en la morfología nuclear, la fragmentación del DNA y la activación de la caspasa-3 (Valdés-Reyes et. al. 2009; de Oyarzabal, 2011).

Los mecanismos a través de los cuales *Leishmania* ejerce la inhibición de la apoptosis no han sido definidos. Ruhland y colaboradores (2007) encontraron que los promastigotes inducen la activación de diferentes vías que inhiben la apoptosis (NF- κ B, PI3K and p38 MAPK) en los macrófagos. Sin embargo, únicamente la inhibición de la PI3K resultó en la supresión del fenotipo antiapoptótico (Ruhland et al. 2007).

Esta capacidad de *Leishmania* para retrasar la apoptosis en células infectadas puede tener implicaciones para la patogénesis del parásito al favorecer la invasión del hospedero y la persistencia del parásito en las células infectadas.

1.7. Apoptosis

El término apoptosis fue introducido por primera vez por Kerr en el año de 1972. Sin embargo, casi veinte años antes, Glücksmann describió la muerte celular como un proceso normal de la ontogenia de los vertebrados y yendo aún más atrás, Rudolf Virchow en 1858, describió la “necrobiosis” como un tipo de muerte diferente a la necrosis, lo que hoy conocemos como apoptosis. Kerr describió la apoptosis como un tipo de muerte celular que no causa inflamación, con cambios morfológicos característicos tales como la condensación de la cromatina, el encogimiento del citoplasma, la formación y separación de los cuerpos apoptóticos, los cuales son rápidamente fagocitados por las células vecinas (Geske y Gerschenson, 2001; Blatt y Glick, 2001).

La apoptosis se induce por varios estímulos, como son la interacción con células citotóxicas (linfocitos T citotóxicos, células NK), ligandos solubles (TNF- α), estrés o daño celular (hipoxia, deprivación de nutrientes, hipertermia, radiación UV, radiación- γ , quimioterapia, etc.). Hay dos vías que llevan a la apoptosis, la vía extrínseca o vía de los receptores y la vía intrínseca o vía mitocondrial (Wang et. al., 2005; Elmore, 2007). En mi opinión, la vía extrínseca se podría dividir en aquella dependiente directa de receptores (v.g. FasL/Fas) y en la que no depende directamente de receptores (v.g. perforina/granzima). Mientras que dentro de la vía intrínseca podríamos agrupar la vía del retículo endoplásmico (ER), ya que, aunque se origina en el mismo, desemboca en la vía mitocondrial. Tanto la vía intrínseca como la extrínseca convergen en la activación de la caspasa-3, además que se interconectan formando círculos de retroalimentación positiva.

1.7.1. La vía extrínseca

La vía extrínseca es dependiente de receptores y la unión de sus respectivos ligandos, FasL/Fas, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, TRAIL/DR4 y TRAIL/DR5 (Burz et. al., 2009). Todos estos receptores en su dominio intracelular contienen dominios de muerte (DD), que al unirse el ligando, atraen proteínas adaptadoras tales como FADD/MORT que también

contienen DD junto con el dominio efector de muerte (DED). Las proteínas adaptadoras unidas al dominio intracelular del receptor forman el complejo de señalización de muerte (DISC). El DISC a través del DED recluta a la caspasa-8 y, al aumentar la concentración local de la misma, se activa por autoproteólisis. La caspasa-8 activa puede activar a su vez a la caspasa-3, que es una caspasa efectora (junto con las caspasas-6 y 7), y finalmente se lleva a cabo la degradación proteolítica de la célula y la activación de la DNasa CAD que se encarga de la fragmentación del DNA (fase efectora de la apoptosis). La caspasa-8 activa también puede cortar a Bid y de esta manera Bid truncado (tBid) se transloca a la mitocondria e inicia así la vía intrínseca (Fig. 3) (Danial y Korsmeyer, 2004; Doseff, 2004; Jin y El-Deiry, 2005).

1.7.2. La vía perforina/granzima

Esta vía se inicia por células citotóxicas (v.g. linfocitos T citotóxicos, células NK,) que forman poros en la membrana celular y vierten al interior de la célula blanco las granzimas A y B, las cuales son proteasas de serina. La perforina, que se encuentra en vesículas de las células NK, es liberada sobre la célula blanco donde se acopla a la membrana celular de manera dependiente de calcio y forma poros por los cuales se vierte la granzima B. La granzima B puede cortar y activar directamente a la caspasa-3 y de esta manera iniciar la degradación proteolítica y del DNA. Puede también cortar a Bid y de esta manera iniciar la vía mitocondrial de la apoptosis. La granzima A puede degradar al grupo de proteínas llamadas SET, las cuales son supresoras del gen *NM23-H1*, por lo que se inicia la síntesis de la DNasa NM23-H1, que a su vez inicia la degradación apoptótica del DNA (Fig. 3) (Elmore, 2007).

1.7.3. La vía intrínseca o mitocondrial

Esta vía se inicia principalmente por el daño al DNA, que activa a la proteína cinasa dependiente de DNA (DNA-PK), la cual a su vez puede activar a p53. Una vez que es activado p53, éste actúa como factor de transcripción e inicia la síntesis de proteínas proapoptóticas tales como, Bax, Noxa, PUMA, Bid, Apaf-1, Fas, DR5. Activa también genes que participan en la generación de ROS, que se sabe regulan ampliamente la apoptosis (Simon et. al., 2000), incrementa el tráfico de Fas desde el aparato de Golgi,

hacia la membrana citoplásmica y de esta manera la célula se hace más susceptible a la apoptosis por FasL/Fas (Haupt et. al., 2003). La acumulación de p53 en la membrana mitocondrial puede iniciar la permeabilidad de ésta (Kiechle y Zhang, 2002), aunque esta función es llevada a cabo principalmente por las proteínas proapoptóticas Bax, Bad y Bid (Reed, 2008). Cuando estas proteínas se unen a la membrana mitocondrial se polimerizan y forman un poro por el cual son liberados hacia el citoplasma iniciadores de la apoptosis tales como el AIF (factor iniciador de la apoptosis), la Endonucleasa G, el citocromo c, la Smac/DIABLO y la procaspasa-9. El AIF junto con la Endo G pueden iniciar por si solos la fragmentación del DNA (Danial y Korsmeyer, 2004). Apaf-1 funciona como una molécula adaptadora que, gracias a la presencia del dominio CARD (dominio para el reclutamiento de las caspasas), homólogo a DED, logra aumentar la concentración local de la caspasa-9, por lo que ésta se activa por autoproteólisis. La caspasa-9 activada corta y activa a su vez a la caspas-3 iniciando así la fase efectora de la apoptosis (Fig. 3) (Wyllie, 2010).

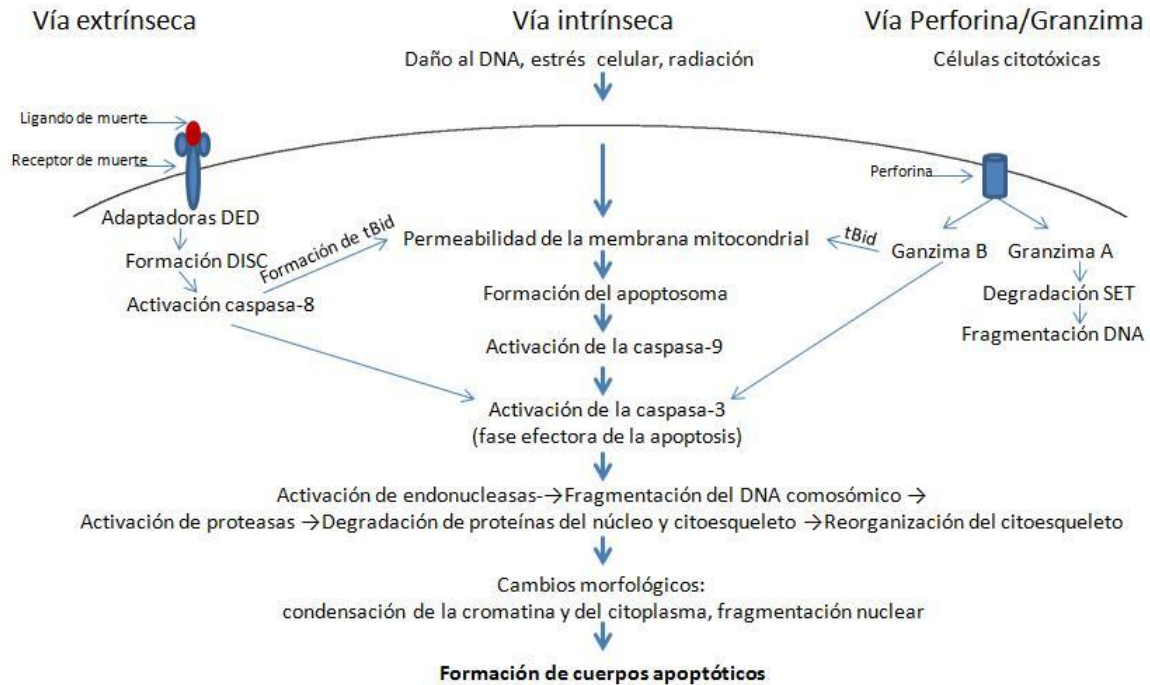


Figura 3.- Representación esquemática de las vías de inducción de la apoptosis. Se han descrito dos vías principales de la apoptosis, la vía intrínseca y la vía extrínseca, además de la vía del perforina/granzima. En cada vía se activa su caspasa iniciadora (8 o 9) la cual a su vez, activa a la caspasa ejecutora, la caspasa-3. Sin embargo, la granzima A puede iniciar la apoptosis de manera independiente a las caspasas. La fase ejecutora de la apoptosis da como resultado la morfología característica de la célula apoptótica y finalmente a la formación de los cuerpos apoptóticos (Elmore, 2007).

1.7.4. La vía del retículo endoplásmico

Esta vía se presenta al acumularse proteínas mal plegadas o que no logran plegarse en el retículo endoplásmico, las cuales en un inicio son degradadas por el proteasoma y, cuando la degradación no es suficiente, se inicia la apoptosis. La proteína integral del ER, Bap31 recluta a la caspas-8 para activarla, ésta a su vez forma tBid y este último inicia la vía mitocondrial de la apoptosis. La proteína del ER encargada de evaluar el daño al mismo, IRE1 α (cinasa y endonucleasa residente del ER), recluta al TRAF2 (factor 2 asociado al receptor de TNF), el cual a su vez activa a ASK (cinasa reguladora de la señalización para la apoptosis) llevando a la activación de JNK. Una vez activado JNK, fosforila a Bim y de esta manera se inicia la vía mitocondrial de la apoptosis (Fig. 4) (Momoi, 2004).

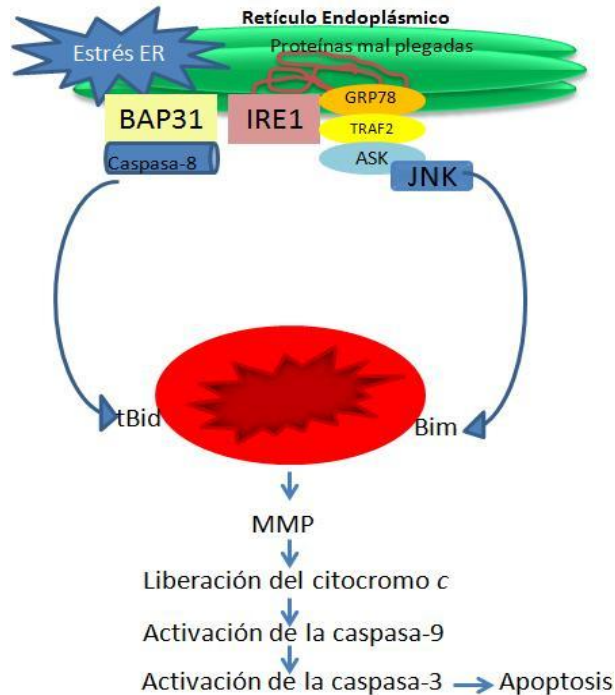


Figura 4.- Apoptosis por la vía del retículo endoplásmico. BAP31 recluta a la caspasa-8, que a su vez corta a Bid y forma tBid e induce la liberación del citocromo *c* y la activación de la caspasa-9. TRAF2 inicia la vía ASK/JNK la que también induce la liberación del citocromo *c* y la activación de la caspasa-9 (Momoi, 2004).

1.7.5. Regulación de la vía intrínseca

Una vez que se inicia la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP) se considera que ya no existe un punto de retorno para la muerte de las células por apoptosis (von Herbay y Rudi, 2000). Las proteínas que se encargan de regular este mecanismo son las que pertenecen a la familia Bcl-2, las cuales se caracterizan por presentar hasta cuatro dominios de homología Bcl-2 (BH). Dicha familia de proteínas se divide en dos grupos principales, las proteínas antiapoptóticas y las proapoptóticas. Todos los miembros de las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL y Mcl-1) contienen los cuatro dominios, BH-1, BH-2, BH-3 y BH-4. Dentro de las proteínas proapoptóticas existen tres grupos, el primero (Bax y Bak) es el formado por proteínas que contienen los dominios BH-1, BH-2 y BH-3, las proteínas que forman el segundo grupo (Bad, Bid, Bik, Bmf, Noxa, PUMA y Hrk) contienen únicamente el dominio BH-3, mientras que el tercer grupo está formado por

una proteína, Bcl-x_s, y contiene los dominios BH-3 y BH-4. Las proteínas antiapoptóticas y las proapoptóticas interactúan entre sí para iniciar o inhibir la MMP (Blatt y Glick, 2001).

Como ya se mencionó anteriormente, existen cinasas, como ASK/JNK, que participan en el complejo de señalización que lleva a la apoptosis. Estas cinasas pertenecen a un grupo de proteínas llamado MAP cinasas y más específicamente a las MAP cinasas activadas por estrés celular (SAPK).

1.8. Las cinasas activadas por mitógenos (MAPK)

La vía de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) se encuentra presente en todas las células eucariontes (Roux y Blenis, 2004) y es una de las más conservadas a nivel evolutivo (Zhang y Dong, 2005). En mamíferos se han descrito al menos cinco grupos de MAPK, las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) 1 y 2, la cinasa amino terminal de c-Jun (JNK) 1, 2 y 3, p38 y sus isoformas (α , β , γ , y δ), ERK 3 y 4 y ERK 5 (Roux y Blenis, 2004).

Las MAPK son de especificidad dual, ya que fosforilan residuos de serina o treonina siempre seguidos por residuos de prolina (Roux y Blenis, 2004). Sin embargo, para que éstas sean activadas requieren ser fosforiladas en residuos de treonina y tirosina. Cada grupo de MAPK tiene su propio dominio de activación, así por ejemplo, en el grupo de ERK el dominio de activación es Thr-Glu-Tyr, en el grupo de p38 es Thr-Gly-Tyr, mientras que en el grupo de JNK es Thr-Pro-Tyr (Dong et. al., 2002).

La cascada de señalización de las MAPK está compuesta por módulos de señalización intracelular, agrupados en tres niveles de activación consecutiva de cinasas, las cuales son llamadas MAP cinasa (MAPK), cinasa de la MAPK (MAPKK) y cinasa de la MAPKK (MAPKKK). La fosforilación de una MAPKKK se inicia por la interacción con una proteína G pequeña o con una proteína de la familia Ras/Rho en respuesta a un estímulo extracelular. Una vez activada la MAPKKK, fosforila y activa a una MAPKK específica, la cual posteriormente activa a una MAPK específica (Fig. 5) (Takekawa y Saito, 1998).

Las MAPK pueden ser activadas por una amplia variedad de estímulos. De esta manera, el grupo de ERK es activado preferentemente por factores de crecimiento, mientras que el

grupo de JNK y p38 son activados por estrés celular, citocinas inflamatorias, productos de patógenos (LPS). La respuesta que generan con una amplia gama de estímulos es igualmente variada. En este orden de ideas, la activación de las MAPK puede desembocar en crecimiento celular, diferenciación celular, inflamación, apoptosis. De igual manera, los sustratos que pueden fosforilar las MAPK incluyen factores de transcripción, proteínas estructurales y funcionales.

1.8.1. Participación de las MAP cinasas en la apoptosis

Como ya se mencionó anteriormente, las MAPK participan en la apoptosis. Sin embargo, hasta hace poco tiempo se describió el mecanismo por el cual las MAPK regulan la apoptosis.

En líneas celulares de cáncer gástrico se demostró que un inductor de la apoptosis, la camptotecina (CPT), la cual es un inhibidor de la topoisomerasa-I, induce la fosforilación de JNK y p38, aún utilizando inhibidores de las caspasas, lo que sugiere que la participación de las MAPK ocurre corriente arriba de las caspasas (Lee et. al., 2002). Por otro lado, en la línea celular NB4 de leucemia promielocítica aguda se demostró que al utilizar el inductor de la apoptosis, trióxido de arsénico (As_2O_3), se induce la activación de JNK1. Interesantemente se observó que en las células que sobreexpresan glutatión (un antioxidante endógeno), no se induce la activación de JNK1 aun en presencia del As_2O_3 , lo que sugiere que es necesaria la producción de ROS para que se logre la activación de JNK1 (Davison et. al., 2004). En un estudio posterior, utilizando la línea celular de hepatoma HepG2 e inductores de la apoptosis tales como la estaurosporina, el H_2O_2 , la radiación UV, el etopósido (inhibidor de la topoisomerasa-I) se demostró en que son necesarios JNK y p38 activados para que fosforilen a Bax y de esta manera se logren translocar a la membrana mitocondrial e iniciar la MMP (Kim et. al., 2006). Posteriormente, se demostró en la línea celular de cáncer cervical HeLa, que al inducir la apoptosis con As_2O_3 es necesario JNK activo para que fosforile a Bcl-2, lo que reduce la interacción de Bcl-2 y Bax. También se demostró que es necesario p38 activo para que Bax se transloque a la membrana mitocondrial e iniciar la MMP. Además se demostró que es necesaria la presencia de ROS para que se activen JNK y p38 (Kang y Lee, 2008). Por otro lado, utilizando la línea celular de cáncer cervical HeLa, se demostró que JNK activo es la cinasa

encargada de fosforilar a Bcl-2. Después de periodos cortos de privación de nutrientes, JNK activo fosforila a Bcl-2, lo que permite que se disocie del complejo Bcl-2-Bcl-1 y así promueve la autofagia. Mientras que, al transcurrir periodos largos de privación de nutrientes JNK activo fosforila el complejo Bcl-2-Bax, lo que permite que Bax se disocie y se transloque a la membrana mitocondrial e iniciar la MMP (Wei et. al., 2008).

La activación de JNK y p38 causada por el daño o estrés celular es mediada por la activación de ASK1, una MAPKKK, la cual se puede autofosforilar al aumentar la concentración intracelular de ROS. Varias fosfatasa endógenas, de la familia de las PP2C, se encuentran regulando la vía ASK1/JNK-p38, ya sea para inhibir o incrementar la apoptosis (Fig. 5) (Tamura et. al., 2006).

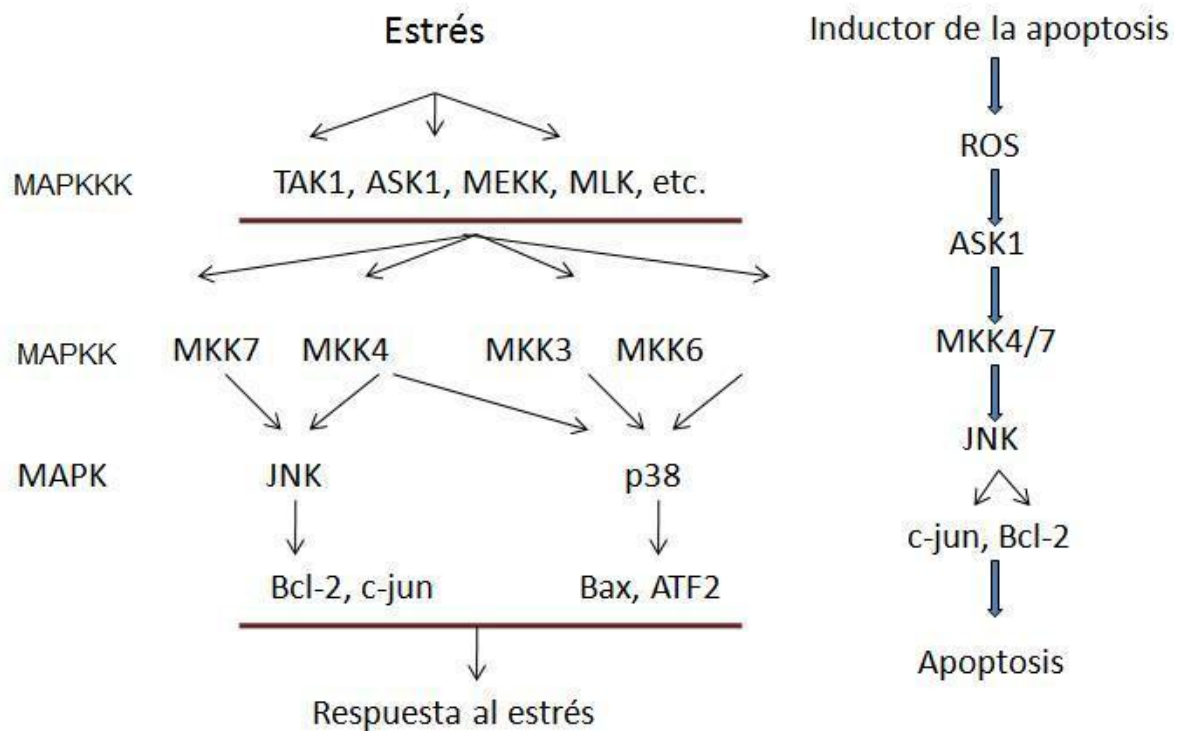


Figura 5.- Esquema de la vía de señalización de las MAPK activadas por estrés. La vía de las MAPK requiere de tres ciclos de activaciones consecutivas. ASK1 es activado por autofosforilación al incrementarse la concentración de ROS y lleva a la activación de JNK, ante un estímulo apoptótico (Tamura et. al., 2006).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Leishmania, al ser un parásito intracelular obligado, requiere asegurar su sobrevivencia en la célula hospedera. Una de las estrategias que utiliza para lograr esto es la inhibición de la apoptosis. Las células dendríticas son células hospederas de este parásito y nuestro grupo de trabajo demostró que los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* inhiben la apoptosis de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos. La infección con ambos estadios morfológicos disminuyó significativamente la translocación de la fosfatidilserina, los cambios en la morfología nuclear, la fragmentación del DNA y la activación de la caspasa-3. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales *Leishmania* inhibe la apoptosis de estas células y otras en las que la inhibición ha sido demostrada, no se conocen del todo. Ruhland y colaboradores (2007) demostraron que *Leishmania* activa la vía de señalización PI3K/AKT para inhibir la apoptosis inducida en los macrófagos murinos. Por esta razón, resulta de vital importancia determinar los mecanismos por los cuales el parásito logra inhibir dicho proceso. Una vía cuya participación es crucial en el desarrollo de la apoptosis es la de las MAPK, en la cual algunas cinasas activadas fosforilan proteínas proapoptóticas tales como, Bax y Bim, con lo cual se logra la translocación a la membrana interna mitocondrial. Por esta razón, decidimos analizar dos proteínas de esta vía, la p38 y JNK, como posibles blancos de acción del parásito *Leishmania* para lograr la inhibición de la apoptosis.

III. HIPÓTESIS

La infección de las células dendríticas derivadas de los monocitos humanos con los promastigotes de *Leishmania mexicana* inhibe la activación de las MAP cinasas JNK y p38, lo que contribuye a la inhibición de la apoptosis ejercida por el parásito sobre estas células.

VI. OBJETIVO

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto de los promastigotes de *L. mexicana* en la activación de JNK y p38 inducida por la camptotecina en las células dendríticas apoptóticas.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Caracterizar la apoptosis en las células dendríticas derivadas de los monocitos humanos inducida con la camptotecina.
- 4.2.2. Analizar la fosforilación de JNK y p38 en las células dendríticas infectadas previamente con los promastigotes de *L. mexicana* y tratadas con la camptotecina.
- 4.2.3. Analizar el efecto de los inhibidores específicos de JNK y p38 en la translocación de la fosfatidilserina de las células dendríticas infectadas con los promastigotes de *L. mexicana* y tratadas con la camptotecina.
- 4.2.4. Analizar el efecto de los inhibidores específicos de JNK y p38 en la fragmentación del DNA de las células dendríticas infectadas con los promastigotes de *L. mexicana* y tratadas con la camptotecina.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Obtención de las células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica humana (moDC)

Las moDC se obtuvieron a partir de agregados celulares o “buffy coats” de donadores sanos, los cuales fueron proporcionados por el banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Las células mononucleares se separaron por centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll Paque Premium (General Electric Helthcare Company, Amersham, Inglaterra) según las especificaciones del fabricante. Las células mononucleares se marcaron con un anticuerpo monoclonal anti-CD14 acoplado a microperlas magnéticas, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). De esta manera se purificaron los monocitos por selección positiva. Los monocitos CD14⁺ se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Sigma, ST Louis, MO, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM de L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), 50 µM de 2-mercaptoetanol, 25 mM de amortiguador HEPES y 24 mM de NaHCO₃ (Sigma, ST Louis, MO, EUA) (R-10). Con el fin de diferenciar los monocitos humanos en células dendríticas, éstos se sembraron en medio R-10 adicionado con 1000 U/ml de IL-4 y 1000 U/ml de GM-CSF (BD Pharmingen, San José, CA, EUA) y se colocaron en placas de 24 pozos (Corning Life Sciences, NY, EUA) a una densidad de 1×10^6 células/ml en una incubadora con atmósfera húmeda, a 37 °C con 5% de CO₂. En los días dos, cuatro y seis de cultivo se cambió el 50% de medio por medio fresco adicionado con las citocinas. En el día siete de cultivo se cosecharon las células no adherentes para caracterizarlas y utilizarlas en los experimentos.

5.2. Caracterización de los monocitos humanos y de las moDC

Los monocitos y las moDC se caracterizaron por citometría de flujo mediante anticuerpos acoplados a fluorocromos dirigidos contra marcadores específicos de superficie. 1×10^6 monocitos o moDC se resuspendieron en 50 µl de PBS suplementado con 5% de suero de caballo y 5 mM de EDTA y se tiñeron con los siguientes anticuerpos: anti-CD14 PE, anti-CD1a PE, anti-HLA-DR FITC, anti-CD86 FITC y anti-CD3 PE-Cy5 (BD Pharmingen, San

José, CA, EUA), durante 20 min a 4 °C. Todos los anticuerpos se prepararon a una dilución 1:50. Las células se lavaron tres veces con PBS y se leyeron en el citómetro FACSsort con el software CellQuest (BD, San José, CA, EUA). Si las células no se leyeron el mismo día, se fijaron con paraformaldehído al 2% y se leyeron al día siguiente.

5.3. Cultivo de los promastigotes de *L. mexicana*

La cepa de *Leishmania mexicana* utilizada en este trabajo fue la MNYC/BZ/62/M379; ATCC 50156, que fue generosamente donada por el Dr. Eric Dumonteil y la Dra. Ma. Del Rosario García (Centro de Investigaciones Regionales, CIR, Dr. Hideyo Noguchi, UADY, Mérida, Yucatán, México). Los promastigotes se cultivaron en medio 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 2 mM de L-Glutamina (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), a una densidad de 1×10^5 parásitos/ml en un volumen final de 10 ml en cajas de cultivo celular de 25 cm², a 26 °C. Los parásitos se subcultivaron en el día 4-5 de cultivo y se cosecharon en la fase estacionaria del cultivo, se lavaron tres veces con PBS a 2000 × g durante 10 min a temperatura ambiente, se fijaron en glutaraldehído al 0.2% y se contaron en cámara de Neubauer. Para mantener la virulencia de la cepa, se inocularon 1×10^7 promastigotes de la fase estacionaria en el cojinete plantar de ratones BALB/c. Una vez desarrolladas las lesiones, los parásitos se aislaron de acuerdo a una metodología descrita anteriormente (Hart et al, 1981; Mosser y Edelson, 1985), con algunas modificaciones. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extirpó la pata infectada, la cual se maceró con el émbolo de una jeringa de 10 ml sobre una malla de nylon con un poro de 100 µm (BD Falcon, Bedford, MA, USA) El macerado obtenido se pasó tres veces por tres agujas de diferente calibre: 21G, 23G y 25G con la finalidad de lisis a las células y liberar a los amastigotes intracelulares. La suspensión obtenida se centrifugó a 100 × g durante 5 min a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante y éste se centrifugó a 2000 × g durante 10 min para obtener a los amastigotes. Los amastigotes se lavaron tres veces y se cultivaron en el medio arriba descrito a 26 °C para lograr la diferenciación a los promastigotes.

5.4. Infección y estímulo de las moDC

Las moDC se sembraron en placas de 24 pozos (Corning Life Sciences, NY, EUA) a una densidad de 1×10^6 células/ml de R-10 y se dejaron reposar durante dos horas a 37 °C con 5% de CO₂. Para analizar el efecto de los promastigotes de *L. mexicana* en la fosforilación de las MAP cinasas inducida por la camptotecina, las moDC se incubaron con los promastigotes de *L. mexicana* durante dos horas a 26 °C. Una vez infectadas las células, se adicionó la camptotecina 10 μM (Sigma, ST Louis, MO, EUA) y se incubaron por diferentes tiempos (1, 6, 12 y 24h) a 37 °C con 5% de CO₂. Para los ensayos de determinación de la apoptosis por citometría de flujo con anexina-V y la determinación de la fragmentación del DNA por TUNEL las moDC se incubaron con los inhibidores específicos de JNK y p38, el SP600125 (Clabiochem, San Diego, CA, EUA) y el SB203580 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) respectivamente, ambos a una concentración de 10 μM, durante dos horas a 37 °C con 5% de CO₂. Posteriormente se incubaron con la camptotecina 10 μM (Sigma, ST Louis, MO, EUA) durante 12 h a 37 °C con 5% de CO₂. Como control negativo se utilizaron células en medio solo, mientras que el control del vehículo se realizó con 5 μl de dimetilsulfóxido (DMSO), pues fue en este que se disolvieron tanto la camptotecina, como los inhibidores.

5.5. Análisis por Western Blot de la fosforilación de las MAP cinasas p38 y JNK

Las moDC, estimuladas en la forma descrita anteriormente, se cosecharon y se lavaron tres veces con PBS a 500 × g durante 10 min a 4 °C. La pastilla se resuspendió en 40 μl de amortiguador de lisis (100 mM de Tris-HCL, 2 mM de EDTA, 100 mM de NaCl y 1% de Triton X-100), suplementado con el coctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA) y con el coctel de inhibidores de fosfatasa (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). El lisado celular se centrifugó a 14 000 × g durante 10 min a 4 °C y se colectó únicamente el sobrenadante (extracto total) para eliminar los restos celulares. Al extracto total se le determinó la concentración de proteína utilizando el método compatible con detergente o DC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Las proteínas obtenidas se analizaron por SDS-PAGE en un gel preparado al 15% se cargaron 40 μg de proteína y se corrieron a 120 V durante 90 min. Posteriormente, las

proteínas se transfirieron a membranas de Immobilon-P en una cámara de electrotransferencia semiseca (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a 20 V durante 60 min. Las membranas se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en amortiguador Tris-salino/Tween 20 al 0.05% (TBST: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% de Tween 20) durante 1 h. Las membranas se lavaron cuatro veces cada 15 min con TBST. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación constante con los anticuerpos monoclonales primarios contra p-JNK (hecho en conejo), β -Actina (hecho en cabra) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), p-p38 (hecho en ratón), (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), a una dilución 1:1000 en TBST con BSA al 1%. Las membranas se lavaron nuevamente con TBST cuatro veces cada 15 min. Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios contra las IgG de ratón, las IgG de conejo (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA; diluidos 1:5000 en BSA al 1%) y contra las IgG de cabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; diluido 1:10 000 en BSA al 1%). Todos los anticuerpos secundarios estaban acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP). Después de lavar seis veces con TBST cada 10 min, las membranas se revelaron usando un substrato quimioluminiscente (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) y se expusieron a películas para rayos-X (Kodak BioMax, MR). El análisis de densitometría se realizó con el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

5.6. Determinación de la translocación de la fosfatidilserina por citometría de flujo con Anexina-V

Las moDC estimuladas se cosecharon y se lavaron tres veces con PBS a $500 \times g$ durante 10 min a 4 °C. La pastilla se resuspendió en 50 μ l de amortiguador de unión (10 mM de HEPES-NaOH, pH 7.4, 140 mM de NaCl y 2.5 mM de CaCl_2) y se incubaron a 4 °C durante 20 min con 2 μ l de anexina-V FITC (BD, San José, CA, EUA). Las células se analizaron en un lapso no mayor a una hora en un citómetro FACSsort con el software CellQuest (BD, San José, CA, EUA). El análisis estadístico de los datos se realizó con una “t de student”.

5.7. Análisis de la fragmentación del DNA por TUNEL

Las moDC estimuladas se cosecharon y se lavaron tres veces con PBS a $500 \times g$ durante 10 min a 4 °C. La pastilla se resuspendió en 50 μ l de PBS, las células se adhirieron en un portaobjetos y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 1 h. Posteriormente se incubaron durante 10 min con metanol-peróxido de hidrógeno al 3%, con el fin de bloquear la actividad de las peroxidasas endógenas. Después de lavar las muestras tres veces con PBS, se incubaron con la solución permeabilizadora (Triton X-100 al 0.1% en citrato de sodio al 0.1%) en hielo durante dos min. Nuevamente las muestras se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con la mezcla amortiguador-enzima del kit de TUNEL (*In situ* Cell Death Detection Kit; Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Alemania) durante 1 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con el convertidor POD (anticuerpo antiluoresceína, fragmento Fab de cabra conjugado con peroxidasa) (*In situ* Cell Death Detection Kit; Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Alemania). La actividad de la peroxidasa se reveló con diaminobenzidina (Sigma, ST Louis, MO, EUA). Las muestras se analizaron en el microscopio AxioPlan II Zeiss (Zeiss, Thornwood, NY, EUA). El análisis estadístico de los datos se realizó con una “t de student”.

VI. RESULTADOS

6.1. Caracterización de los monocitos

Los monocitos que se obtuvieron por selección magnética positiva con anticuerpos dirigidos contra el marcador de superficie CD14 fueron analizados por citometría de flujo. De acuerdo a la presencia del CD14, los monocitos mostraron una pureza media del $88.7\% \pm 7.4\%$ ($n=7$). Además expresaron porcentajes mayores al 89% de los marcadores de superficie HLA-DR, CD86 y menores al 1% de CD3, el cual es un marcador de linaje linfocitario (Fig. 6).

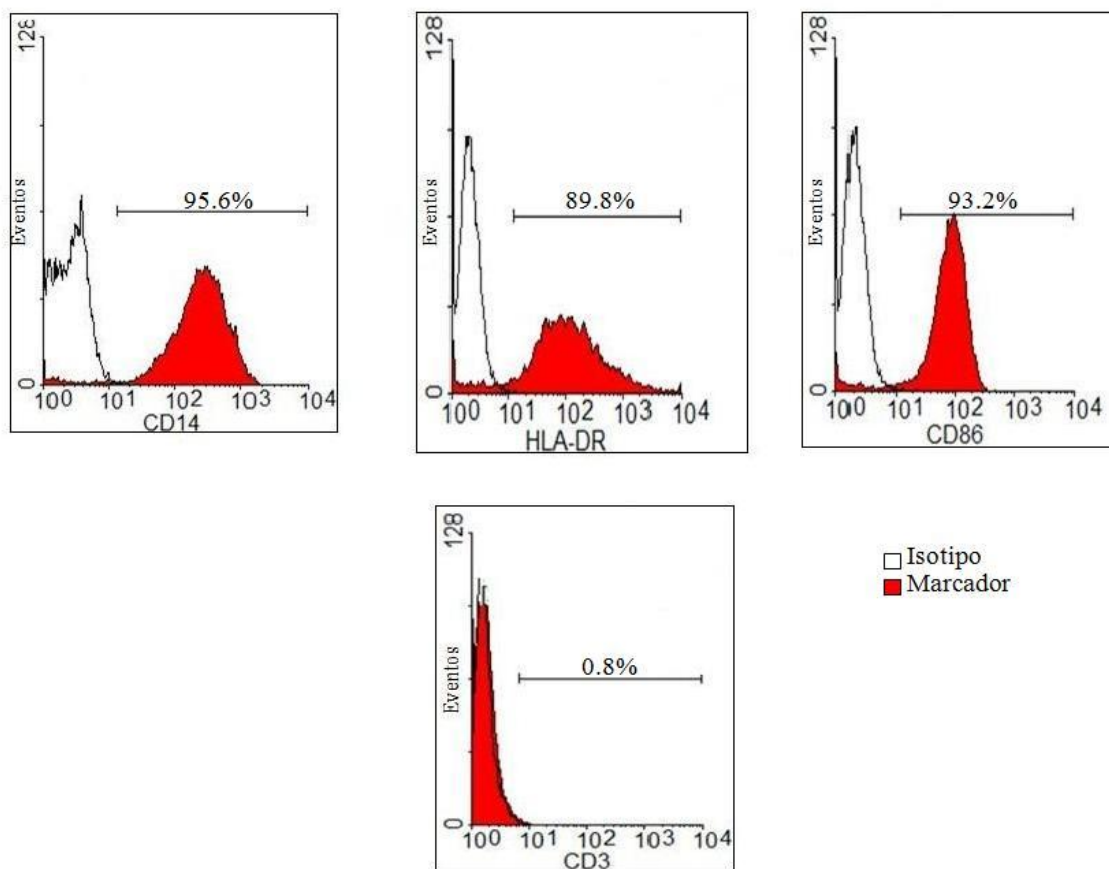


Figura 6.- Expresión de diferentes moléculas de superficie de los monocitos humanos analizada por citometría de flujo. Los monocitos se aislaron por selección positiva con microperlas magnéticas anti-CD14 y se determinó la expresión en superficie de CD14, HLA-DR, CD86 y CD3. Gráficas representativas de siete experimentos independientes.

6.2. Caracterización de las moDC

Las moDC que se obtuvieron después de siete días de cultivo de los monocitos humanos en medio enriquecido con las citocinas GM-CSF e IL-4 fueron analizadas por citometría de flujo. Mostraron una expresión media del 55.8% \pm 12.8% (n=6) con respecto al marcador de superficie CD1a, mientras que los niveles de HLA-DR nunca fueron mayores al 99% y los de CD86 nunca fueron mayores al 66.6%. La expresión de CD14 y CD3 nunca fue mayor al 4.4%(Fig. 7).

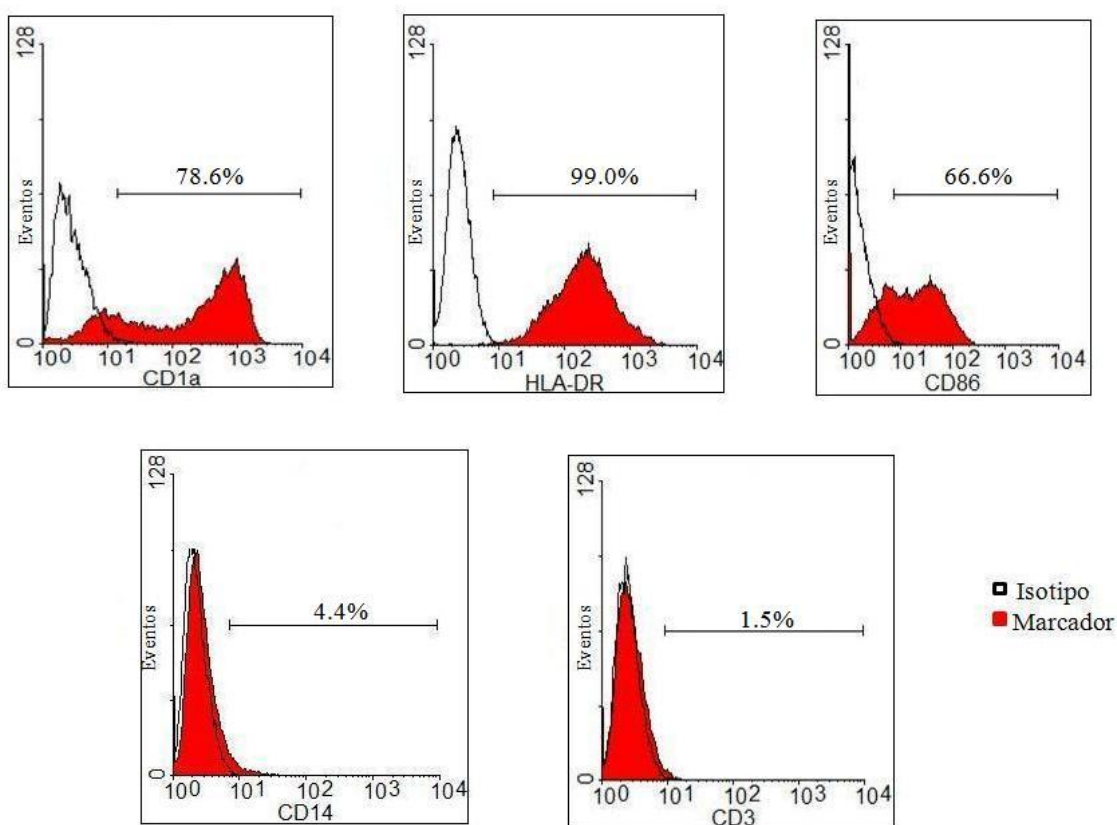


Figura 7.- Expresión de diferentes moléculas de superficie en las moDC analizada por citometría de flujo. Las moDC obtenidas se les determinó la expresión en superficie de CD1a, HLA-DR, CD86, CD14 y CD3. Graficas representativas de 6 experimentos independientes.

6.3. *L. mexicana* inhibe la apoptosis de las moDC inducida por la CPT

Las moDC obtenidas se infectaron con los promastigotes de *L. mexicana* y posteriormente se trataron con 10 μ M de CPT durante 12 h para inducir la apoptosis. Como control se utilizaron las moDC sin infectar y tratadas con 10 μ M de CPT. La translocación de la fosfatidilserina se determinó mediante citometría de flujo utilizando la Anexina-V FITC. El porcentaje de translocación medio para las moDC únicamente tratadas con la CPT fue del 41.3% \pm 10.5%, mientras que las moDC infectadas con los promastigotes de *L. mexicana* y tratadas con la CPT, se observaron valores iguales o menores al basal. El vehículo DMSO, en el que se disuelve tanto la CPT como los inhibidores, no tuvo ningún efecto sobre la apoptosis de las moDC (Fig. 8).

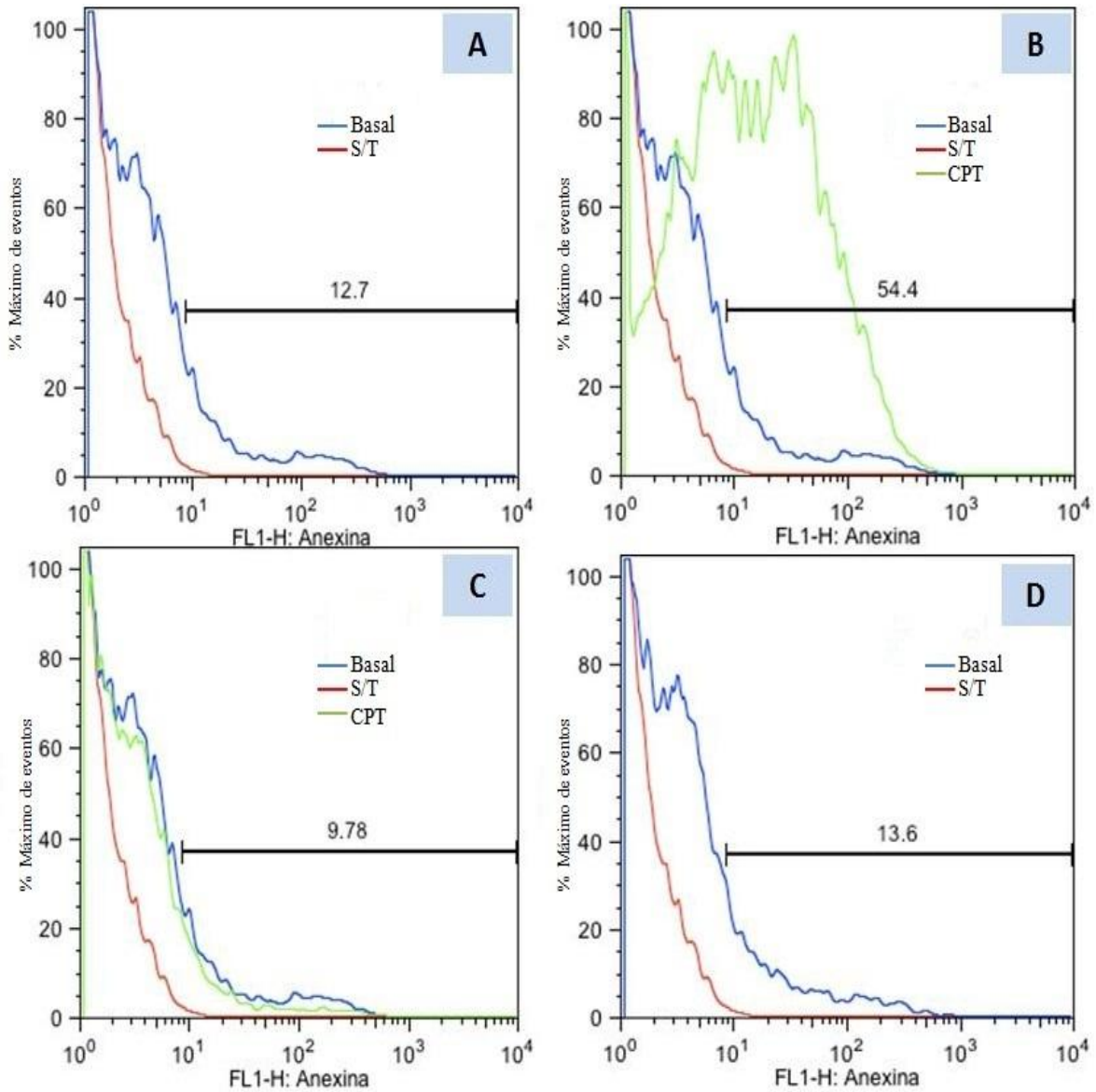


Figura 8.- Efecto de los promastigotes de *L. mexicana* en la translocación de la fosfatidilserina en las moDC. La translocación de la fosfatidilserina en las moDC se determinó con la anexina-V bajo diferentes condiciones. A) moDC en estado basal. B) moDC tratadas con 10 μ M de CPT durante 12 h. C) moDC infectadas con promastigotes de *L. mexicana* y tratadas con 10 μ M de CPT. D) moDC tratadas con 5 μ l de DMSO.

6.4. *L. mexicana* inhibe la fosforilación de JNK inducida por la CPT en las moDC

Para analizar el efecto de los promastigotes de *L. mexicana* en la activación de las MAPK p-38 y JNK, las moDC se infectaron con los parásitos durante 2 h y posteriormente se trataron durante diferentes tiempos con la CPT para inducir la apoptosis. Transcurrido este tiempo, se obtuvieron los lisados totales de las células y se determinó la fosforilación de las enzimas mediante western blot. Los niveles de fosforilación de JNK, tanto de la isoforma p54 como de la p46 aumentaron con respecto al basal en las moDC tratadas con la CPT, lo cual fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). En ambas isoformas se observó un incremento en la fosforilación durante la primera hora de tratamiento con la CPT, sin embargo en el caso de p54 a partir de las seis horas se observó una disminución en la presencia de la forma fosforilada. En las células infectadas con los promastigotes de *L. mexicana* y tratadas con la CPT, los niveles de fosforilación de la isoforma p46 disminuyeron significativamente al compararlos con los observados en las moDC tratadas únicamente con la CPT, lo cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Los niveles de la isoforma p54 disminuyeron a las 12 h en las moDC infectadas y tratadas con la CPT con respecto a las moDC tratadas únicamente con la CPT, lo cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$), aunque a las 24 h todavía hubo presencia de esta isoforma fosforilada (Fig. 9). De manera interesante, como se observa en la figura 9, en las moDC infectadas hay un aumento inicial en la fosforilación de las dos isoformas, y es a partir de las 6 h que se observa una disminución en los niveles de fosforilación.

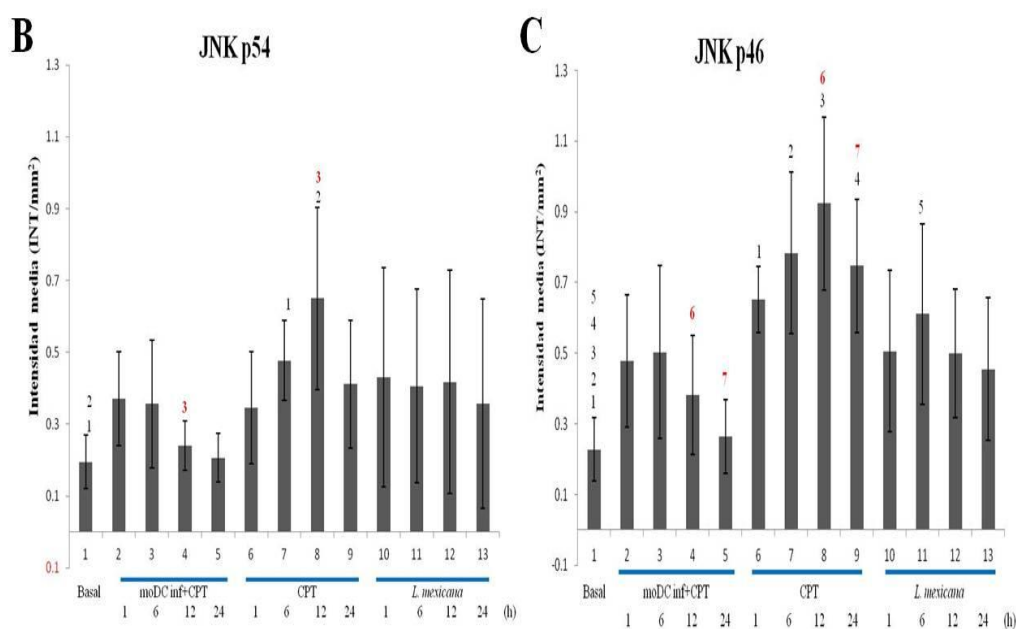
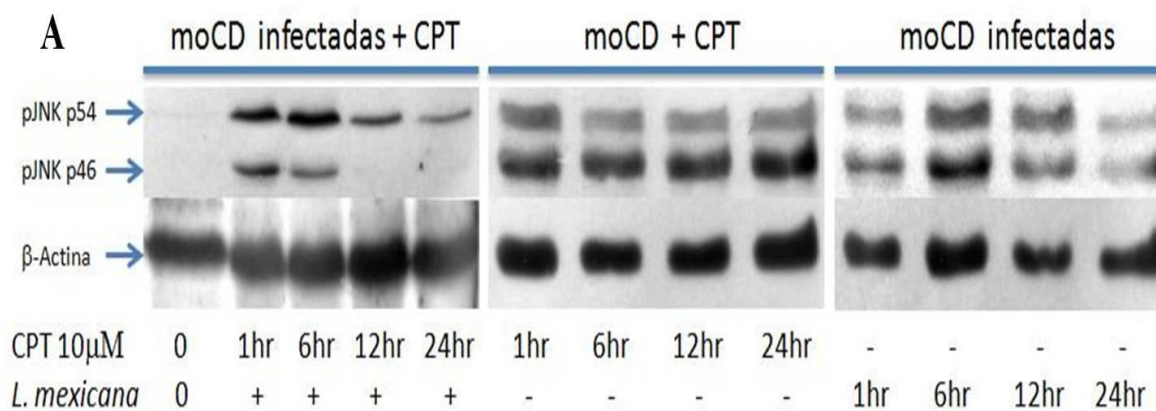


Figura 9.- Efecto de *L. mexicana* y la CPT en la fosforilación de JNK. A) Cinética de fosforilación de JNK en las moDC infectadas y tratadas con CPT, moDC tratadas solo con CPT y moDC infectadas. B) Análisis densitométrico de la fosforilación de la isoforma p54 de JNK, bajo las diferentes condiciones experimentales. C) Análisis densitométrico de la fosforilación de la isoforma p46 de JNK, bajo las diferentes condiciones experimentales. Experimento representativo de cuatro experimentos independientes.

6.5. *L. mexicana* inhibe la fosforilación inducida en p38 por la CPT en las moDC

Los niveles de fosforilación de la MAPK p38 aumentaron en las moDC tratadas con la CPT, con respecto a las moDC sin tratamiento. Estos niveles disminuyeron, al igual que con JNK, cuando las moDC fueron infectadas con *L. mexicana* y tratadas con la CPT a partir de las 12 h, lo cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$). En las moDC infectadas con el parásito durante diferentes tiempos y no tratadas con la CPT se observa un aumento en los niveles de p38 fosforilada a las 6 h post-infección, los cuales disminuyeron a partir de las 12 h de infección (Fig. 10).

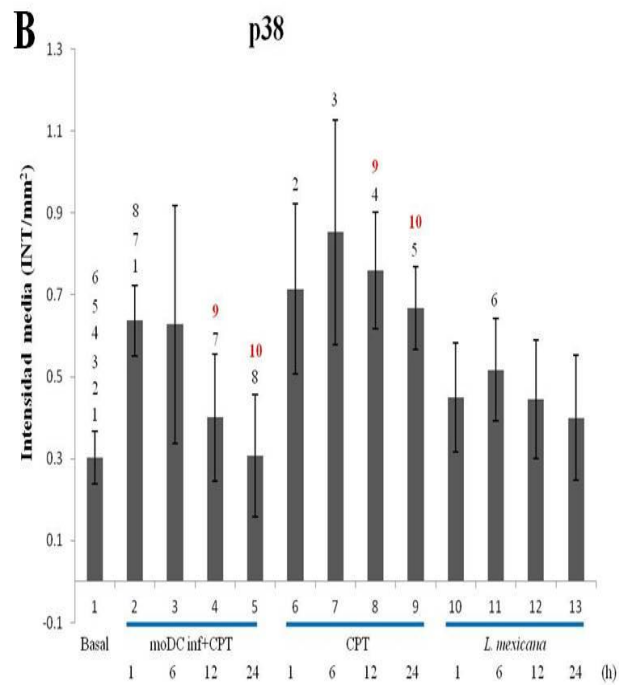
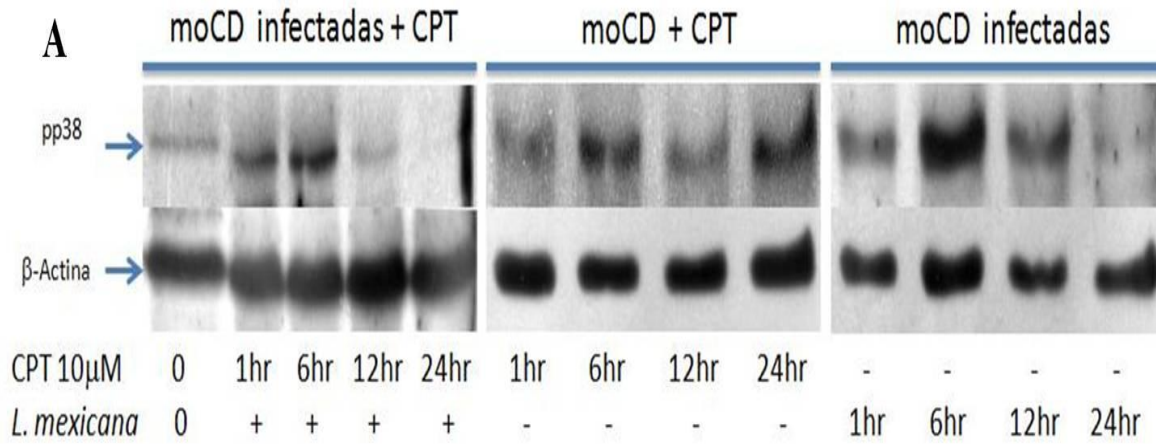


Figura 10.- Efecto de *L. mexicana* y la CPT en la fosforilación de p38. A) Cinética de fosforilación de p38 en las moDC infectadas y tratadas con CPT, moDC tratadas solo con CPT y moDC infectadas. B) Análisis densitométrico de la fosforilación de la isoforma p38, bajo las diferentes condiciones experimentales. Experimento representativo de cuatro experimentos independientes.

6.6. Los inhibidores específicos de JNK y p38 logran inhibir parcialmente la translocación de la fosfatidilserina

Con el fin de corroborar la participación de las MAPK fosforiladas en la apoptosis inducida en las moDC empleando la CPT se utilizaron inhibidores específicos de JNK (SP600125) y p38 (SB203580). Al analizar la translocación de la fosfatidilserina se observó que al preincubar las moDC con el inhibidor específico de JNK y posteriormente con la CPT, disminuyeron los porcentajes de externalización de la fosfatidilserina, aunque estos cambios no fueron estadísticamente significativos. Sin embargo, con el inhibidor específico de p38 no se logró inhibir la translocación de la fosfatidilserina (Fig. 11).

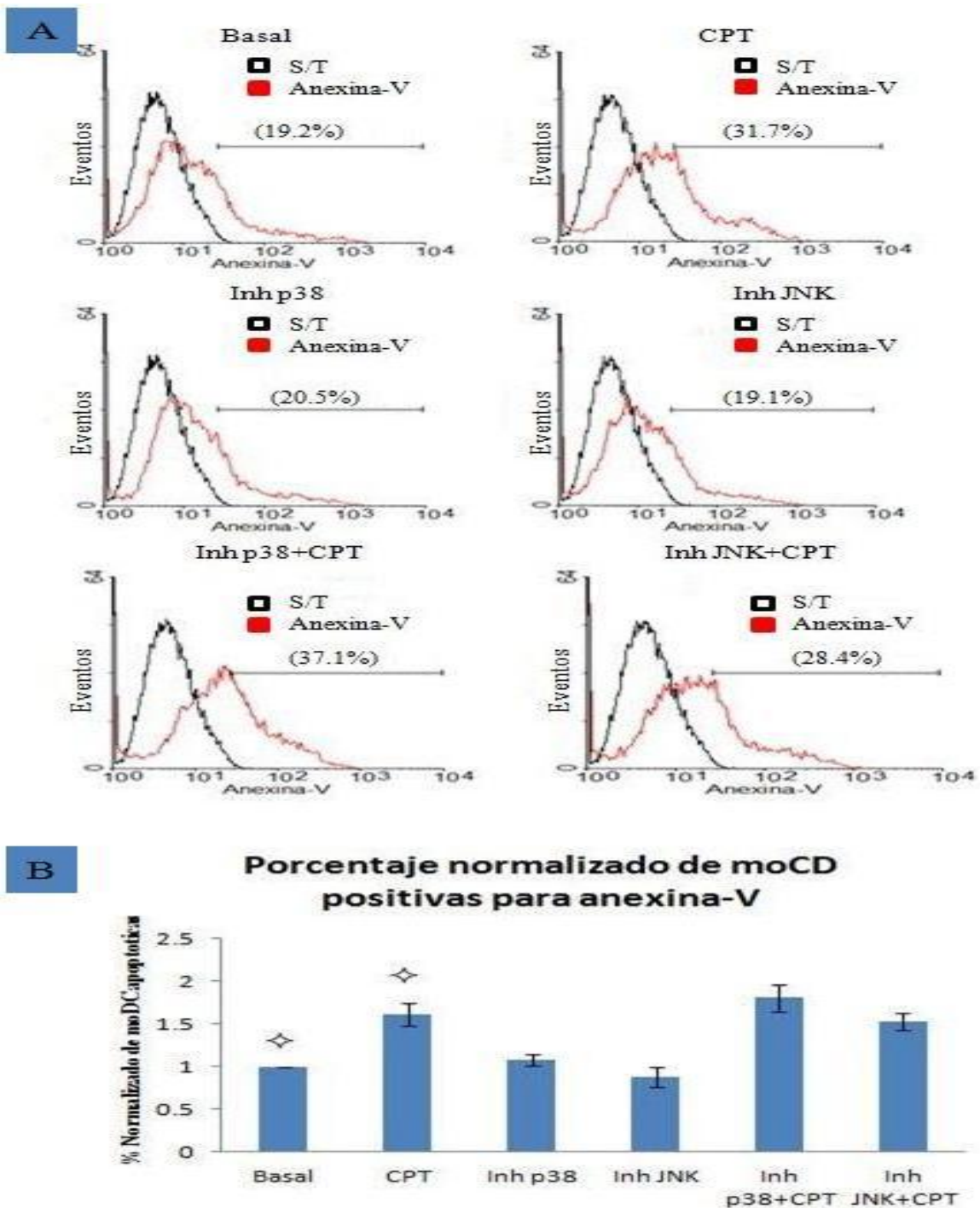


Figura 11.- Efecto de los inhibidores específicos de JNK (SP600125) y de p38 (SB203580) en la translocación de la fosfatidilserina. A) Histogramas de la citometría de flujo utilizando anexina-V para marcar la fosfatidilserina externalizada bajo las diferentes condiciones experimentales. B) Gráfica del promedio normalizado de moDC positivas para la anexina-V de tres experimentos independientes. Únicamente el aumento de la apoptosis inducida por la CPT es estadísticamente significativa, mientras que las diferencias observadas utilizando los inhibidores específicos junto con la CPT no los son ($p < 0.05$).

6.7. Los inhibidores específicos de JNK y p38 logran inhibir parcialmente la fragmentación del DNA

Con el objeto de corroborar la participación de las MAPK en diferentes parámetros apoptóticos, se analizó la fragmentación del DNA en las moDC en presencia del inhibidor para JNK (SP600125) y el inhibidor para p38 (SB203580). En las moDC tratadas con el inhibidor para JNK y con la CPT se observó una disminución en el número de células apoptóticas con respecto a las moDC tratadas con la CPT (10 vs 30%), la cual fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). El número de células apoptóticas observadas cuando las moDC fueron tratadas con el inhibidor fue similar al observado con las células control (moDC sin tratamiento). Cuando se evaluó el inhibidor para p38 se observó una disminución en el número de las células apoptóticas con respecto al observado cuando las moDC se trataron únicamente con la CPT, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 12).

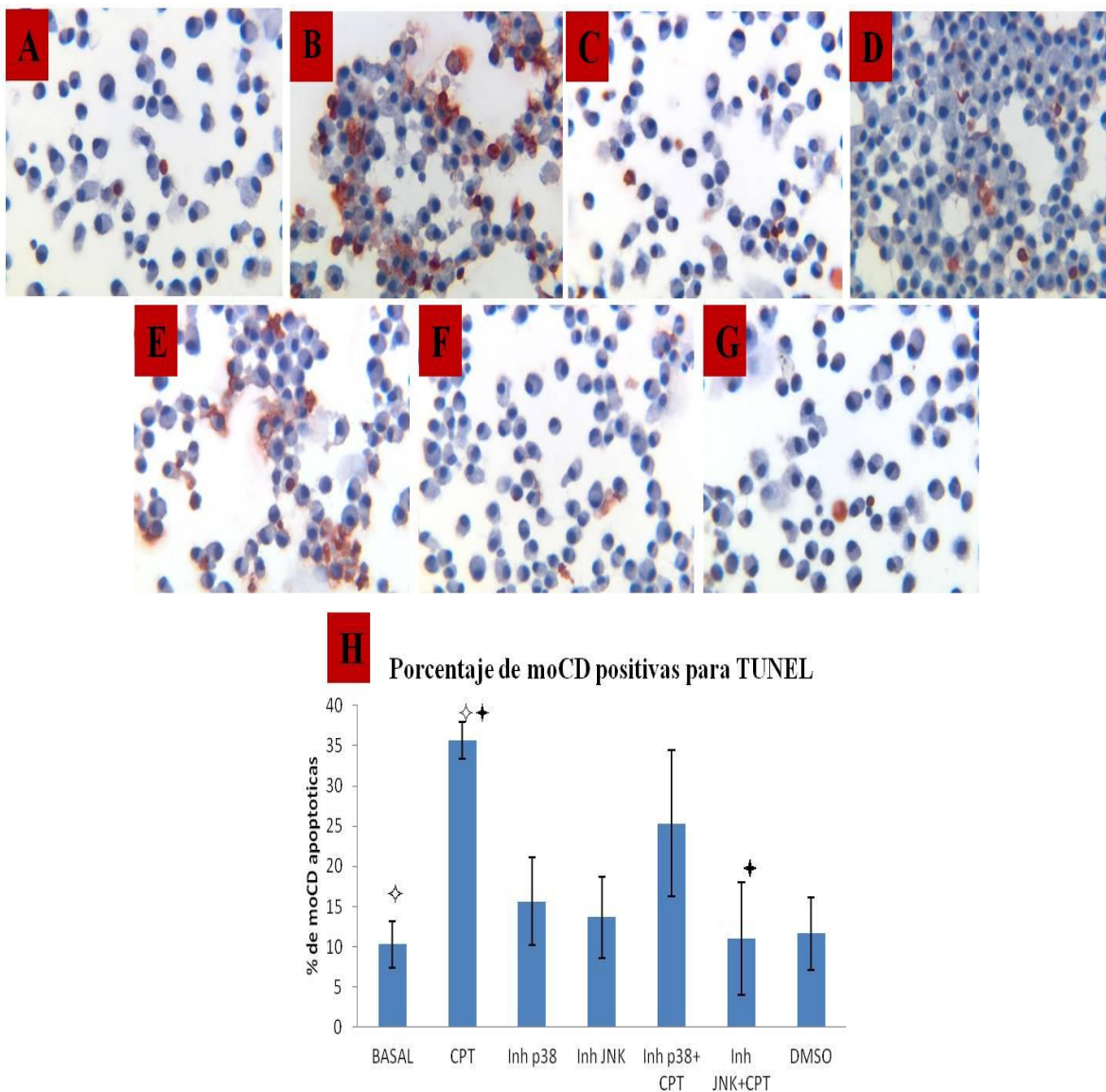


Figura 12.- Efecto de los inhibidores específicos de JNK (SP600125) y de p38 (SB203580) sobre la fragmentación del DNA analizadas por TUNEL. Micrografías de las moDC donde se muestra la fragmentación del DNA (teñidas de rojo/café) bajo los diferentes condiciones experimentales: A) sin ningún estímulo, B) tratadas con la CPT, C) inhibidor de p38, D) inhibidor de JNK, E) inhibidor de p38 más la CPT, F) inhibidor de JNK más la CPT y G) DMSO. H) Gráfica del porcentaje de moDC positivas para la fragmentación del DNA, utilizando la técnica de TUNEL. El aumento de las moDC positivas para la fragmentación nuclear inducida por la CPT es estadísticamente significativo, con respecto al basal ($p < 0.05$), así mismo la disminución de las moDC positivas para la fragmentación del DNA utilizando el inhibidor de JNK junto con la CPT es estadísticamente significativa con respecto a las moDC tratadas únicamente con la CPT ($p < 0.05$). Experimento representativo de tres repeticiones independientes.

VII. DISCUSIÓN

Leishmania es un parásito intracelular que infecta principalmente células dendríticas y macrófagos aunque también puede infectar otras células tales como los neutrófilos y los fibroblastos. El parásito en la forma de promastigote se desarrolla en el tracto digestivo de la mosca hematófaga la mosca hematófaga de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus* y es inoculado al hospedero mamífero por la picadura de ésta. La mosca causa una lesión de tal forma que los promastigotes son depositados en la dermis, donde entran en contacto con los neutrófilos, los macrófagos y las células dendríticas dérmicas. Los promastigotes escapan del medio extracelular tóxico al ser internalizados por los macrófagos y las células dendríticas (Solbach y Laskay 2000). Posteriormente, los promastigotes se diferencian en los amastigotes, que son más pequeños y sin flagelo, los cuales proliferan dentro del fagolisosoma de la célula hospedera (Kane y Mosser 2000). Los amastigotes perpetúan la enfermedad en el hospedero mamífero como resultado de una liberación continua debida a la lisis celular o eventos exocíticos específicos e invasión de otras células (Rittig y Bogdan 2000).

Con la finalidad de estudiar diferentes aspectos de la interacción de las células dendríticas con *Leishmania*, uno de los modelos humanos de células dendríticas es el de las células dendríticas derivadas de los monocitos (León et. al., 2005). Este fue el modelo que nosotros utilizamos, en el que los monocitos de sangre periférica humana se diferencian a células dendríticas mediante el uso del GM-CSF e IL-4 (Sallusto y Lanzavecchia, 1994). CD1a es una molécula que pertenece a la familia de moléculas CD1. Como se muestra en la figura 5, la presencia del CD1a en las moDC obtenidas en el presente trabajo nunca fue mayor al 78.6% y con una presencia media del 55.8% (Fig. 5). La utilización del amortiguador HEPES en el medio de cultivo que se empleó pudo haber influido negativamente en la expresión del marcador CD1a y por tanto en la diferenciación de las células dendríticas inmaduras de acuerdo a lo descrito por (Svajger y Jeras., 2011). Así mismo, las moDC mostraron porcentajes elevados de HLA-DR (99%), moderados de CD86 (66.6%) y muy bajos o nulos de CD14 (4.4%) y CD3 (1.5%).

Al ser *Leishmania* un parásito intracelular, esto le genera una dependencia hacia la célula hospedera, por lo que requiere mantener la sobrevivencia de ésta. La inhibición de la

apoptosis es un tema común en la biología de muchas bacterias intracelulares obligadas tales como *Chlamydia* (Perfettini et al, 2002) *Rickettsiae* (Clifton et al, 1998) y en protozoarios que incluyen a *T. gondii* (Payne et al, 2003) y *Theileria* spp. (Heussler et al, 1999). Además, la modulación de la apoptosis se ha observado en diversos organismos intracelulares facultativos (Gao y. Abu Kwaik. 2000) y en otros con fases tanto intracelulares como extracelulares como es el caso de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* (Freire de Lima et al, 2000), así como diferentes virus (Roulston et al, 1999).

En el caso particular de *Leishmania* está demostrado que inhibe la apoptosis natural e inducida de los macrófagos (Moore y Matlashewski, 1994; Akarid et. al., 1994; Lisi et. al., 2005; Ruhland et. al., 2007; Donovan et. al., 2009) y de los neutrófilos (Aga et. al., 2002). Nuestro grupo demostró que los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* inhiben en las moDC tratadas con la CPT la translocación de la fosfatidilserina, la fragmentación del DNA y la activación de la caspasa-3, aunque no se determinaron los mecanismos involucrados en este efecto de inhibición (Valdés-Reyes, 2009; de Oyarzabal, 2011). En el caso de la inhibición de la apoptosis de los macrófagos por los promastigotes de *Leishmania*, Ruhland y colaboradores (2007) describieron que la activación de PI3K/AKT es una vía importante utilizada por el parásito para asegurar la sobrevivencia prolongada en las células.

Por otro lado, se sabe que las MAPK participan en la cascada de señalización que lleva a la apoptosis específicamente en la fosforilación de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas tales como Bax, Bak, Bim y Bcl-2 (Momoi, 2004; Kim et. al., 2006; Kang et. al., 2008; Wei et. al., 2008).

En este estudio analizamos la fosforilación de las MAPK en las moDC a las que se les indujo apoptosis con la CPT (Morris y Geller, 1996), la cual es un inhibidor de la topoisomerasa, lo que lleva a la inducción de la apoptosis por la vía intrínseca. Se demostró que en las moDC tratadas con la CPT las MAPK JNK y p38 presentaron un incremento en la fosforilación con respecto a las células sin tratamiento. Interesantemente cuando las moDC se infectaron con los promastigotes de *L. mexicana* y se trataron con la CPT observamos que la fosforilación de la isoforma p46 de JNK (JNK1) y p38 se inhibió ampliamente no siendo así con la isoforma p54 de JNK (JNK2). Todos estos resultados son

consistentes con los reportes mencionados anteriormente (Lee et. al., 2002; Davison et. al., 2004; Kim et. al., 2006; Kang y Lee, 2008; Wei et. al., 2008), ya que es JNK1 el encargado de fosforilar el complejo Bax-Bcl-2 y una vez liberado Bax es fosforilado por p38 para que de esta manera se logre translocar a la membrana mitocondrial. Uno aspecto de gran relevancia, es determinar es lo que ocurre corriente arriba de las MAPK, ya que se ha reportado que la participación de las ROS resulta clave en la activación de las MAPK en la apoptosis, tanto en la inducida como en la natural (Davison et. al., 2004), y es muy probable que este sea un punto nodal, donde el parásito intervenga inhibiendo la inducción de las ROS y como consecuencia inhibiendo la apoptosis. Aunque la importancia de la inhibición de la apoptosis por diferentes microorganismos no ha sido definida, el hecho de que muchos microorganismos confieran esta propiedad a la célula hospedera sugiere un papel importante en la biología de estos organismos. Otro punto se debería analizar es la posibilidad de que las fosfatasa (probablemente del tipo de las PP2C), pudieran interferir con las vías de señalización que participan en la apoptosis, ya sea de las MAPK o la de PI3K/AKT, de acuerdo a lo mencionado por Tamura y colaboradores (2006), con respecto a la participación de las fosfatasa endógenas en la regulación de la vía de las MAPK cinasas involucradas en la apoptosis, ya sea de forma negativa o positiva (Tamura et. al., 2006).

Al inhibir las cinasas JNK y p38 observamos que se inhibe la apoptosis inducida por la CPT, lo que confirma su participación en la apoptosis además de que sustenta la posibilidad de que el parásito inhiba la apoptosis a través de estas vías. Mientras que Ruhland y colaboradores (2007) demostraron que *Leishmania* necesita mantener activa la vía de PI3K/AKT para asegurar la inhibición de la apoptosis de la célula hospedera, en el presente trabajo se demostró que *L. mexicana* inhibe la activación de JNK y p38 inducida por la CPT en las moDC.

La inhibición de la apoptosis de las células dendríticas por *L. mexicana*, resulta sumamente estratégica ya que son precisamente estas células las que se encargan de dirigir la respuesta inmune contra el parásito. Aunado a la inhibición de la maduración de las células dendríticas por parte de *Leishmania*, la inhibición de la apoptosis podría afectar severamente el tipo de respuesta inmune que se va a desarrollar en contra del parásito, ya

que clásicamente se ha mencionado que una vez que las células dendríticas presentan el antígeno a los linfocitos T éstas son eliminadas de los órganos linfoides. Por este motivo, sería sumamente importante realizar estudios para develar lo que sucede con las células dendríticas una vez que presentan los antígenos de *Leishmania* en el contexto de la inhibición de la apoptosis.

VIII. CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que *L. mexicana* inhibe la fosforilación las MAP cinasas JNK1 y p38 inducida por la camptotecina en las células dendríticas derivadas de los monocitos. La participación de JNK y p38 en la apoptosis inducida con camptotecina se corroboró utilizando inhibidores específicos y se demostró que al inhibir JNK se logra inhibir la apoptosis inducida.

IX. BIBLIOGRAFÍA

<http://es.wikipedia.org/wiki/Leishmaniasis>

Aga, E., D. M. Katschinski, et al. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol* 169(2): 898-905.

Akarid, K., D. Arnoult, et al. (1994). *Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *J Leukoc Biol* 76(1): 95-103.

Aladro, L. A. (2006). Las principales clasificaciones de los protozoos. Las Prensas de Ciencias. México. 3-63 pp.

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

Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.

Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673): 245-252.

Becker, I., N. Salaiza, et. al. (2004). Leishmaniosis. En: Becerril y Cabello, R. eds. *Parasitología médica: de las moléculas a la enfermedad*. Mcgraw-Hill/Interamericana. México, D.F. 65-71 pp.

Becker I. (2006). Leishmaniosis. En: Flisser A y Pérez-Tamayo R. eds. *Aprendizaje de la Parasitología Basado en Problemas*. Editores de textos Mexicanos, ETM. México, D. F. 394-409 pp.

Belkaid, Y., B. Butcher, D. L. Sacks (1998). Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single cell level: selective impairment of IL12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol* 28:1389-1400.

Bennett, C. L., A. Misslitz, L. Colledge, T. Aebischer, C. C. Blackburn (2001). Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Immunol* 31:876-883.

Blatt, N. and G. D. Glick (2001). Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorg Med Chem* 9(6):1371-1384.

Brandonisio, O., R. Spinelli, et. al. (2004). Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes Infect* 6(15):1402-1409.

Burz, C., I. Berindan-Neagoe, et al. (2009). Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* 48(6): 811-821.

Carmen, J. and A. P. Sinai (2007). Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Molec Microbiol* 64(4): 904-916.

Clifton, D., R. Goss, et.al. (1998). NF- κ B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*. 95:4646-4651.

Corliss, J. O. (1994). An interim utilitarian (“user-friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozoologica* 33: 1-51

Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116(2): 205-219.

Davison, K., K. K. Mann, et. al. (2004). JNK activation is a mediator of arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 103(9):3496-502.

de Oyarzabal, M. E. (2011). Efecto de los amastigotes de *Leishmania mexicana* en la apoptosis inducida con camptotecina en las células dendríticas derivadas de monocitos humanos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 73 pp.

Dong, C., R. J. Roger, et. al. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20:55-72.

Donovan, M. J., B. Z. Maciuba, et. al. (2009). *Leishmania* infection inhibits Cyclohexamide-induced macrophage apoptosis in a strain dependent manner. *Exp Parasitol* 123(1): 58-64.

Doseff A. I. (2004). Apoptosis: the sculptor of development. *Stem Cells Dev* 13(5):473-483.

Dzionic, A., A. Fuchs, et al. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165(11): 6037-6046.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.

Freire-de-Lima, C. G., D. O. Nascimento, et. al. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403:199-203.

Gao, L. and Y. Abu Kwaik. (2000). Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. *Microbes Infect* 2(14): 1705-1719.

Geissmann, F., M. G. Manz, et. al. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327(5966):656-61.

Geske, F. J. and L. E. Gerschenson (2001). The biology of apoptosis. *Hum Pathol* 32(10): 1029-1038.

Gogolak, P., B. Reth, et. al. (2007). Differentiation of CD1a⁻ and CD1a⁺ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR γ . *Blood* 109(2): 32-51

Haupt, S., M. Berger, et. al. (2003). Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 15;116(Pt 20):4077-85.

Hart, D.T., K. Vickerman, G.H. Coombs (1981). A quick simple method for purifying *Leishmania mexicana* amastigotes.

- Heussler, V. T., J. Machado, et. al. (1999). The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 96:7312-7317.
- Heussler, V. T., P. Kuenzi, et. al. (2001). Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol.* 31(11): 1166-1176.
- Jin, Z. and W. S. El-Deiry (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4(2):139-63.
- Kang, Y. and S. Lee (2008). The role of p38 MAPK and JNK in arsenic trioxide-induced mitochondrial cell death in human cervical cancer cells. *J Cell Physiol* 217: 23-33.
- Kiechle, F. L. and X. Zhang (2002). Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta* 326(1-2): 27-45.
- Kim, B., S. Ryu, et. al. (2006). JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 281(30):21256-65.
- Lee, S., H. Lee, et. al. (2002). MAPK signaling is involved in camptothecin-induced cell death. *Mol Cells* 14(3):348-54.
- Leon, B., M. Lopez-Bravo, et al. (2005). Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* 17(4): 313-318.
- Lisi, S., M. Sisto, et. al. (2005). Infection with *Leishmania infantum* inhibits Actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *J Eukaryot Microbiol* 52(3): 211-217.
- Marovich, M. A., M. A. McDowell, E. K. Thomas, T. B. Nutman (2000). Il-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. *J Immunol* 164:5858-5865.
- Medzhitov R, Janeway C Jr. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med* 343(5):338-344.

Mellman, I., S. J. Turley, et al. (1998). Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol* 8(6): 231-237.

Momoi, T. (2004) Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat* 28:101-105.

Morris, E. J., y H. M. Geller (1996). Induction of neuronal apoptosis by 18 camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle independent toxicity. *J Cell Biol* 134:757-770.

Moore, K.J. and G. Matlashewski (1994). Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol* 152:2930-2937.

Murray, H. W., J. D. Berman, et. al. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366(9496):1561-77.

Nylén, S. and S. Gautam (2010). Immunological perspectives of leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2(2): 135-146.

Payne, T. M., R. E. Molestina, y A. P. Sinai. 2003. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF- κ B function in the *Toxoplasma gondii*-blockade of host apoptosis. *J Cell Sci* 116:4345-4358.

Perfettini, J., T. Darville, et. al. (2002). Inhibition of apoptosis by γ interferon in cells and mice infected with *Chlamydia muridarum* (the mouse pneumonitis strain of *Chlamydia trachomatis*). *Infect Immun* 70:2559-2565.

Peters, N. C., J. G. Egen, et. al. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321:970-974.

Reed, J. C. (2008). Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 111(7): 3322-3330.

Rossi, M. and J. W. Young (2005). Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 175; 1373-1381.

Roulston, A., R. Marcellus and P. Branton (1999). Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 53:577-628.

Roux, P. P. and J. Blenis (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2):320-344.

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

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

Secretaría de Salud. 2008. Programa de acción específico 2007-2010, Otras enfermedades transmitidas por vector. 70 p. México, D. F.

Serbina, N. V., T. Jia, et al. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26: 421-452.

Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2(3):151-61.

Simon, H. U., A. H. Yehia, et. al. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415-418.

Soong, L. (2008). Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J Immunol* 180(7):4355-60.

Tacke, F. and G. J. Randolph (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211(6-8): 609-618.

Takekawa, M, and H. Saito (1998). A Family of Stress-Inducible GADD45-like Proteins Mediate Activation of the Stress-Responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 95:521-530

Tamura, S., S. Toriumi, et. al. (2006). PP2C family members play key roles in regulation of cell survival and apoptosis. *Cancer Sci* 97(7):563-7.

Terrazas, C. A., L. I. Terrazas, et. al. (2010). Modulation of dendritic cell responses by parasites: a common strategy to survive. *J Biomed Biotechnol* 2010:357106.

Valdés-Reyes L., J. Argueta, et. al. (2009) *Leishmania mexicana*: Inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Exp Parasitol* 121:199-207.

von Herbay, A. and J. Rudi (2000). Role of apoptosis in gastric epithelial turnover. *Microsc Res Tech* 48(5): 303-311.

Wang, Z. B., Y. Q. Liu, et. al. (2005). Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* 29(7):489-96.

Wei, Y., S. Sinha, et. al. (2008). Dual role of JNK-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* 4:7 949-951.

Wyllie, A. H. (2010). "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol* 42(1):4-9.

Zhang, Y. and C. Dong (2005). MAP kinases in immune responses. *Cell Mol Immunol* 2(1):20-7.