



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DEL EFECTO DEL LIPOFOSFOGLICANO DE *Leishmania mexicana* EN LA
ACTIVACIÓN DE LAS CINASAS ERK Y P38 Y LA SECRECIÓN DE CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS EN MACRÓFAGOS HUMANOS A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES
TLR2 Y TLR4**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ARACELI ROJAS BERNABÉ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA
FACULTA DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F. MARZO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DEL EFECTO DEL LIPOFOSFOGLICANO DE *Leishmania mexicana* EN LA
ACTIVACIÓN DE LAS CINASAS ERK Y P38 Y LA SECRECIÓN DE CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS EN MACRÓFAGOS HUMANOS A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES
TLR2 Y TLR4**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ARACELI ROJAS BERNABÉ

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
HOSPITAL FEDERICO GÓMEZ**

**DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

MÉXICO, D.F. MARZO, 2014



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 9 de diciembre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **ROJAS BERNABÉ ARACELI** con número de cuenta **98554469** con la tesis titulada **"ANÁLISIS DEL EFECTO DEL LIPOFOSFOGLICANO DE *Leishmania mexicana* EN LA ACTIVACIÓN DE LAS CINASAS ERK Y MAPp38 Y LA SECRECIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN MACRÓFAGOS HUMANOS A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES TLR2 Y TLR4"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA**:

Presidente: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Vocal: DR. JULIO CESAR CARRERO SÁNCHEZ
Secretario: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
Suplente: DR. ARMANDO PÉREZ TORRES
Suplente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de febrero de 2014

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS:

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo para realizar mis estudios de Doctorado.
- A CONACyT por la beca de Doctorado otorgada con número de registro 165433. Este trabajo fue apoyado por los proyectos: CONACYT:45052-M, 152433; PAPIIT-DGAPA, UNAM IN218412
- A los miembros de mi Comité Tutorial:
Dra. María del Carmen Maldonado Bernal, Dr. Enrique Ortega Soto por su tiempo, aportaciones y ayuda brindada durante la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS:

- Al Departamento de Medicina Experimental. Facultad de Medicina, UNAM.
- A mi directora de Tesis Dra. María Magdalena Aguirre García por el espacio brindado para la realización de este proyecto.
- A los sinodales por la revisión de esta tesis: Dra. Gladis del Carmen Fragoso González, Dra. María del Carmen Maldonado Bernal, Dr. Julio César Carrero Sánchez, Dr. Armando Pérez Torres, Dr. Enrique Ortega Soto.
- Al Ingeniero Omar Agni García Hernández por su dedicación en la edición y digitalización de cada figura de los resultados de esta tesis y artículo publicado, por tu paciencia y optimismo permanente, por no dejarme bajar los brazos ante las adversidades.
- A la M en C Alma Reyna Escalona Montañó por ser un ejemplo de persona y muy profesional, por las enseñanzas en las técnicas de laboratorio y disposición en todos los aspectos. Gracias por tu invaluable ayuda y tu motivación día a día.
- A la Dra. Norma Salaiza Suazo, a la M en C Adriana Ruiz Remigio, al Dr. José Sotero Delgado Domínguez, a la M en C Isabel Cristina Cañedo, al Biólogo Arturo Alfredo Wilkins Rodríguez por enseñarme las técnicas para la realización de este proyecto.
- A los bancos de sangre del Hospital Centro Médico siglo XXI y del Hospital General de México.
- A mis compañeros del Departamento de Medicina Experimental por todas las enseñanzas y consejos durante esta etapa.

Índice

Resumen	I
Abstract.....	II
1.Introducción.....	1
1.1 Formas clínicas	1
1.2 Morfología.....	3
A) Promastigotes	3
1.3 Ciclo de vida.....	4
1.4 Moléculas de la superficie del parásito de <i>Leishmania</i>	6
A) GPI:	6
B) PPG:	6
C) GIPL	6
D) gp63:	7
E) LPG:	7
1.5 Funciones del LPG de <i>Leishmania</i>	9
1.6 Células que participan en la respuesta inmune en la leishmaniasis.....	11
A) Linfocitos T	13
B) Linfocitos T CD4+:	13
C) Linfocitos T CD8+:	14
D) Células cebadas.....	14
E) Células NK.....	15
F) Células dendríticas	16
G) Neutrófilos	16
H) Monocitos/Macrófagos.....	17
1.7 Vías de señalización de los Receptores tipo Toll (TLRs)	18
1.8 Vías de señalización de las MAPquinasas	21
1.9 Factores de transcripción	27
1.10 Modulación de las vías de señalización por <i>Leishmania</i>	29
A) Proteína cinasa C (PKC):.....	29
B) JAK/STAT	30
C) TLRs.....	30
D) MAPquinasas.....	31
2. Justificación.....	32
3. Hipótesis	33
4. Objetivo General	33
4.1. Objetivos particulares	33
5. Métodos.....	35
5.1 Purificación de monocitos de sangre periférica.	35
5.2 Análisis de la pureza de las células	36
5.3 Cultivo de parásitos.....	37
5.4 Purificación de LPG de <i>Leishmania mexicana</i>	37

5.5 Ensayos de citocinas.....	38
5.5.1 Producción de citocinas en macrófagos estimulados con LPG.....	38
5.5.2 Producción de citocinas en macrófagos preincubados con inhibidores de las MAPquinas.....	38
5.5.3 Producción de citocinas en macrófagos preincubados con anticuerpos bloqueadores de TLRs.	39
5.6 Inmunoensayo enzimático estándar sándwich (ELISA)	39
5.7 Expresión del RNAm de TLR2 y TLR4.....	40
5.8 Expresión de TLRs en macrófagos estimulados con LPG de <i>L. mexicana</i> ..	41
5.9 Ensayos de fosforilación.....	42
5.9.1 Análisis de la fosforilación de ERK y p38 MAPquinas.....	42
5.9.2 Análisis del efecto de los inhibidores en la fosforilación de macrófagos estimulados con LPG	42
5.9.3 Análisis del efecto de anticuerpos bloqueadores en la fosforilación de macrófagos estimulados con LPG.	42
5.10 Western-blot	44
5.12 Análisis de la fosforilación mediante el método de Western-blot por (ODYSSEY LI-COR).....	45
5.13 Análisis de la translocación nuclear de los factores de transcripción AP-1 y NF-κB por ensayos de retardamiento (EMSA).....	46
5.14 Análisis estadístico.....	46
6. Resultados	47
6.1 Obtención de monocitos de Sangre Periférica.	47
6.2 Análisis del efecto del LPG de <i>L. mexicana</i> en la producción de citocinas .	47
6.3 Efecto del LPG de <i>L. mexicana</i> en la expresión de TLR2 y TLR4.....	50
6.4 Participación de TLR2 y TLR4 en la producción de citocinas inducida por LPG	52
6.5 El LPG de <i>L. mexicana</i> induce la fosforilación de ERK y p38 MAP cinasas. .	55
6.7 La inhibición de ERK y p38 MAP cinasas disminuye la producción de citocinas inducidas por LPG.....	57
6.8 Activación de ERK y p38 inducida por LPG está mediada por TLR2 y TLR460	
6.9 Análisis de la translocación nuclear de los factores de transcripción AP-1 y NF-κB en macrófagos estimulados con LPG.	61
7. Discusión	63
Resumen de Resultados	72
8. Conclusión	72
9. Bibliografía:.....	73
10. Apéndice	82

Resumen

La leishmaniasis cutánea (LC), localizada o difusa, es causada en México por *Leishmania mexicana*. *Leishmania* es un parásito protozoario intracelular obligado, transmitido por flebótomos en la forma de promastigotes metacíclicos que infecta al hospedero y afecta a los macrófagos. En estas células, la *Leishmania* se transforma y se multiplica como amastigotes. La molécula más abundante en la superficie de este parásito es un lipofosfoglicano (LPG), que regula la respuesta inmune del hospedero. El parásito, a través de mecanismos desconocidos, es capaz de modular la respuesta inmune y crear un entorno favorable para la supervivencia. En este trabajo se analizó el efecto del LPG de *L. mexicana* en macrófagos humanos, para explorar los mecanismos de acción. Los resultados muestran que el LPG activa la producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos humanos, incluyendo TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 así como IL-10. El LPG fue capaz de inducir la fosforilación tanto de ERK como p38, así como TLR2 y TLR4. Cuando los macrófagos fueron preincubados con inhibidores de MAPcinsas y anticuerpos bloqueadores se observó una disminución de la producción de citocinas proinflamatorias cuando los macrófagos fueron estimulados con LPG. Nuestros resultados sugieren que LPG de *L. mexicana* se une al receptor TLR2 y TLR4 y activa ERK y p38 e induce la producción de citocinas proinflamatorias en los macrófagos humanos.

Abstract

Protozoan parasites of genus *Leishmania* are the causative agent of leishmaniasis. *Leishmania* is an obligate intracellular parasite transmitted by sandflies as metacyclic promastigotes that infect the host, primarily affecting macrophages where promastigotes transform to amastigotes and multiply. Lipophosphoglycan (LPG) the most abundant surface molecule of the parasite, is a virulence determinant and regulates the host immune response the whole promastigote is able, through unknown mechanisms, to modulate this effect through LPG and create an environment favorable to parasite survival. In this work we investigated the participation of TLR2 and TLR4 in the production of cytokines and explored the possible phosphorylation of ERK and/or p38 MAP kinase signaling cascades in human macrophages stimulated with *L. mexicana* LPG. The results showed that LPG activated the production the proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 and IL-10. This activation by LPG induced the phosphorylation of ERK and p38 MAP kinase. Specific inhibitors of ERK or p38 MAP kinase and mAbs against TLR2 and TLR4 reduced cytokine production and phosphorylation of both kinases.

1. Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad con diferentes manifestaciones clínicas, producida por distintas especies de un protozooario perteneciente al género *Leishmania*. Esta parasitosis tiene una prevalencia estimada de 12 millones de personas infectadas en el mundo; la población en riesgo es de 350 millones aproximadamente (Desjeux, 2004) y afecta a 88 países (Cox, 2002).

En México, la leishmaniasis se ha reportado en estados como: Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Quintana Roo, Campeche, etc. (Figura 1).



Figura 1. Mapa de la distribución geográfica de la leishmaniasis en México (Secretaría de Salud 2007-2010).

La evolución crónica de esta enfermedad se caracteriza por comprometer piel, mucosas y vísceras. El tropismo depende tanto de la especie de *Leishmania* como la respuesta inmune del hospedero.

1.1 Formas clínicas

La leishmaniasis cutánea es producida por *Leishmania mexicana* y puede presentarse en dos formas clínicas: cutánea localizada (LCL) y cutánea difusa (LCD). La LCL se considera la forma benigna y es conocida en México como úlcera de los chicleros ya

que tradicionalmente afectaba a los hombres que laboraban en regiones selváticas en las cosechas de chicle (Velasco, 1994). Se manifiesta por la presencia de úlceras únicas e indoloras. En algunas ocasiones las lesiones pueden curar espontáneamente en un periodo que comprende de los 6 meses a 2 años; pero también, pueden quedar latentes. Las lesiones de estos pacientes presentan infiltrados de macrófagos vacuolados llenos de amastigotes en la dermis y dan al infiltrado la apariencia de granuloma (Silveira *et al.*, 2004) (Figura 2A). La mayoría de estos pacientes responden a antimoniales pentavalentes, que es el tratamiento de elección.

La LCD se caracteriza por presentar nódulos en toda la piel del cuerpo, con excepción del cuero cabelludo, palmas de las manos y plantas de los pies. En esta forma clínica los parásitos se diseminan por vía linfática o hemática y es la forma más grave y progresiva de la enfermedad. Al parecer, el contraste de los cuadros clínicos radica en diferencias de la respuesta inmunitaria y aun no está claro si las diferencias en las manifestaciones clínicas se deben al hospedero o al parásito. (Murray *et al.*, 2005) (Figura 2B).

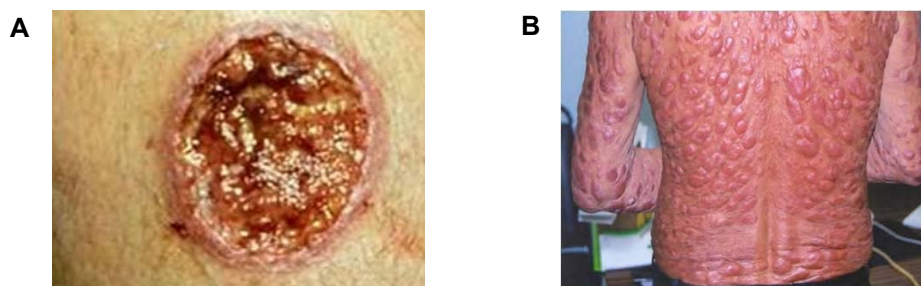


Figura 2. En la imagen (A), se muestra una lesión ulcerosa típica de la leishmaniasis cutánea localizada. En la imagen (B), se muestra una lesión nodular característica de una leishmaniasis cutánea difusa. Fuente: Depto. Medicina. Experimental., Facultad de Medicina, UNAM.

1.2 Morfología

Leishmania presenta principalmente dos formas de desarrollo durante su ciclo de vida: los promastigotes y amastigotes.

A) Promastigotes: Es la forma flagelada y móvil del parásito, durante este estadio existe de forma extracelular replicándose en el tracto digestivo de la mosca transmisora y pasa por dos fases: procíclica (logarítmica o de crecimiento) y una fase metacíclica (estacionaria e infectiva). Su tamaño varía entre los 10 y 30 μm de largo y de 1 a 5 μm de diámetro, mientras que el flagelo posee una longitud aproximada de 15 a 18 μm . Presentan un núcleo ubicado en el centro de cuerpo y un cinetoplasto cercano a la parte anterior del mismo. El flagelo es de tipo anterior y nace de un cuerpo basal, emergiendo de una bolsa o pocket flagelar (Figura 3A).

B) Amastigotes: Es la forma intracelular del parásito y durante este estadio se ubica dentro de la vacuola parasitófora de las células fagocíticas del hospedero. Los amastigotes, son inmóviles, ovoides y con una longitud entre 3 a 5 μm y un diámetro que oscila entre 1.5 a 2.5 μm (Figura 3B).

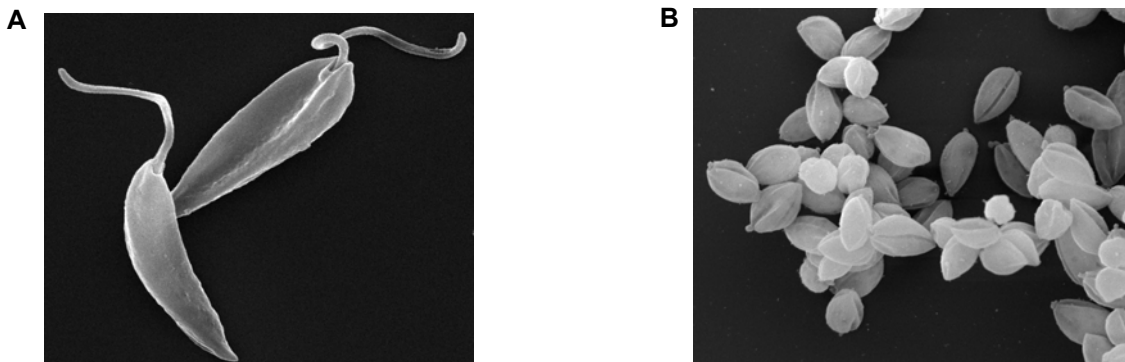


Figura 3. Las imágenes muestran una microscopía de barrido del parásito de *L. mexicana* de la cepa (MNYC/BZ/62/M379 OMS). La imagen (A), muestra la forma de promastigote, en la imagen (B) se observa la forma de amastigote. Fuente: www.cellimagelibrary.org

1.3 Ciclo de vida

En la leishmaniasis el mamífero se infecta cuando es picado por el vector; el cual es una mosca hembra perteneciente a los géneros *Phlebotomus* (en Europa, Asia y África) y *Lutzomyia* (en América) (Figura 4).



Figura 4. Mosca perteneciente al género *Lutzomyia* transmisor de la leishmaniasis. WHO/TDR/Stammers.

Cuando el insecto infectado pica a un hospedero vertebrado, introduce la probóscide en la piel y lacera los vasos sanguíneos causando hemorragias e inoculando los promastigotes metacíclicos, los parásitos son rápidamente fagocitados por las células fagocíticas ya sean residentes o llamadas al sitio de la herida (neutrófilos, macrófagos y células dendríticas). A pesar de que el paso a través de los neutrófilos es transitorio, se sabe que sirven como un refugio seguro y temporal para que los parásitos sean capaces de establecer infecciones en los macrófagos. Una vez dentro de los macrófagos, los promastigotes se diferencian a amastigotes dentro de vacuolas lisosomales en donde posteriormente se dividen por fisión binaria causando ruptura del macrófago y liberando a los parásitos, los cuales infectan a células aledañas, el ciclo se completa cuando los fagocitos infectados son tomados por otra mosca y se transforman en promastigotes en su intestino (Figura 5).

Ciclo de vida de *Leishmania*

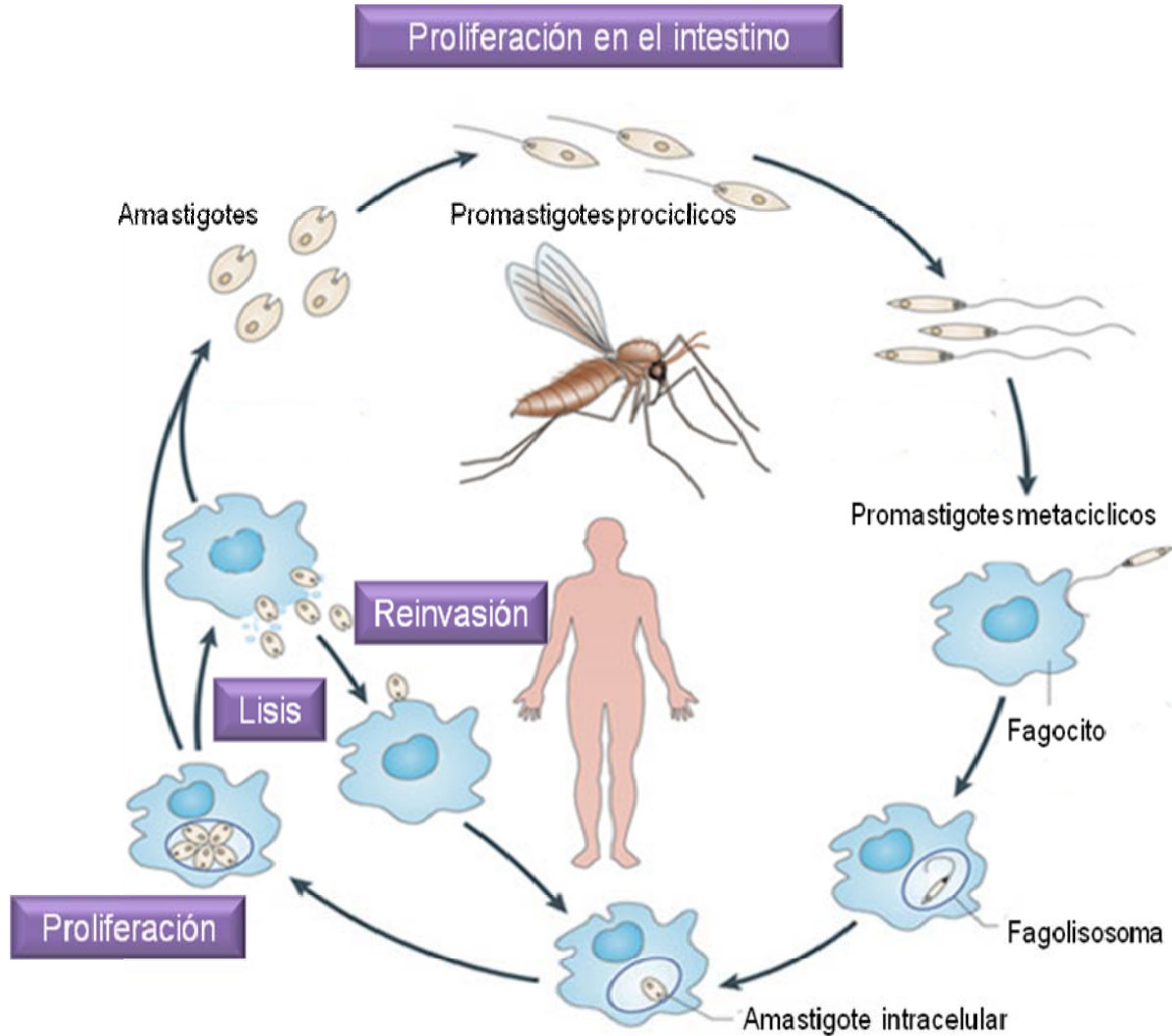


Figura 5. Ciclo de vida de *Leishmania*. Los promastigotes procíclicos de *Leishmania* se diferencian en la mosca a promastigotes metacíclicos, que son la fase infecciosa y se encuentran listos para la transmisión. Los promastigotes son fagocitados por diversos tipos celulares. Una vez dentro de la célula hospedadora comienzan a transformarse y dividirse en amastigotes promoviendo que la célula se rompa y los amastigotes se liberen e infecten a células vecinas. El ciclo de transmisión se completa cuando toman los fagocitos infectados con los amastigotes son tomados por otra mosca transformándose en promastigotes en el intestino medio de la mosca. Ciclo tomado y modificado de Kaye y Scott, 2011.

1.4 Moléculas de la superficie del parásito de *Leishmania*

Cuando ocurre la interacción de *Leishmania spp* con las células del sistema inmune, el parásito debe sobrevivir dentro de la célula hospedera activando diversos mecanismos que le confieren protección. Los promastigotes de *Leishmania* están cubiertos en su superficie por un glicocalix denso, compuesto por varias moléculas ancladas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) como: proteofosfoglicanos (PPG), glicoinositolfosfoglicanos (GIPL), la glicoproteína 63 (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG) (Guha-Niyogi *et al.*, 2001; Sacks y Kamhawi, 2001) (Figura 6).

A) GPI: El glicosilfosfatidilinositol (GPI) puede regular procesos como el tráfico intracelular y la organización espacial de diversas proteínas que se anclan al resto de GPI, se piensa que juega un papel protector en la superficie del promastigotes (Proudfoot *et al.*, 1995).

B) PPG: Los promastigotes de *Leishmania* expresan un proteoglicano de tipo proteofosfoglicano en superficie, denominado mPPG (de membrana), esta proteína está anclada por GPI en su extremo C-terminal, contiene dominios homólogos a repeticiones ricas en leucina (LRR), se especula que esta molécula podría constituir un excelente ligando para el anclaje al hospedero artrópodo y mamífero (Ilg, 2000).

C) GIPL: El glicosilinositol fosfolípido es una clase de glicolípido unido a GPI, esta molécula es en promedio 10 veces más abundantes que el lipofosfoglicano (LPG); sin embargo su tamaño es menor por lo cual está más cerca de la membrana del parásito no obstante aun se desconoce el papel que tiene con la célula hospedera (Olivier *et al.*, 2005).

D) gp63: La gp63 se presenta en promastigotes en una proporción de 5×10^5 moléculas, es una metaloproteasa dependiente de zinc, la cual es activa en un rango de pH de 7-10, y tiene una actividad proteolítica específica, con un amplio rango de sustratos entre los cuales se encuentra la caseína, el fibrinógeno, gelatina, albúmina y fibrinógeno (McMaster *et al.*, 1994). La gp63 es capaz de interactuar con CR3, de esta forma gp63 podría contribuir al anclaje del parásito a macrófagos u otras células.

E) LPG: El LPG es la molécula más abundante en la superficie de los promastigotes de *Leishmania* (McConville *et al.*, 1995). Es sintetizado en todas las especies de *Leishmania* y su densidad y características están estrictamente moduladas a lo largo del ciclo de vida del parásito. Los parásitos inmaduros expresan moléculas cortas de LPG, mientras que en la forma madura, el LPG forma un glicocálix más grueso debido al complejo formado por los residuos de β -galactosa con α -arabinosa y un incremento de 2 a 3 veces en el número de sacáridos en la región de fosfosacáridos compuestos de manosa-galactosa (Ilg *et al.*, 1992; Descoteaux y Turco, 2002).

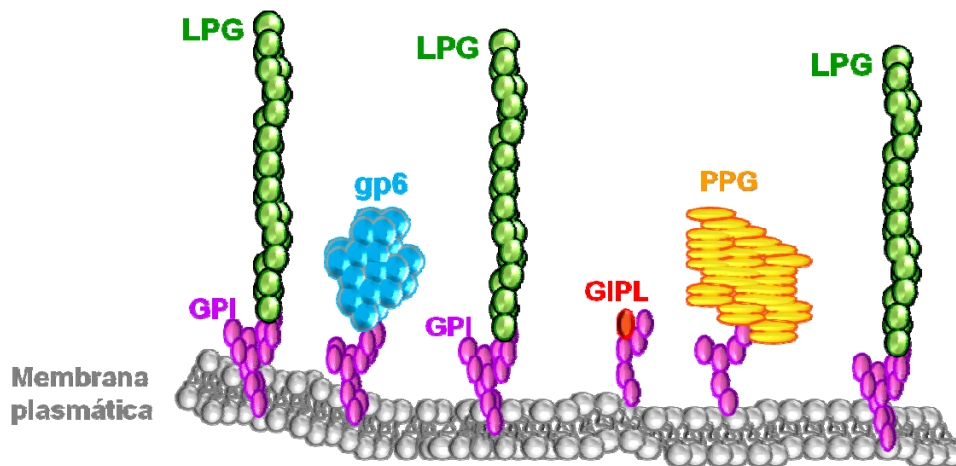


Figura 6. Moléculas en la superficie de *Leishmania* tomado y modificado de Guha-Niyogi *et al.*, 2001.

Estructuralmente el LPG consta de cuatro dominios (Figura 7):

- 1.-Región de anclaje 1-O-alkil-2-lisofosfatidilinositol.
- 2.-Región central de fosfosacáridos constituida por glucosamina desacetilada, dos manosas, galactosa-6-fosfato, galactopiranososa y galactofuranosa.
- 3.-Región de disacáridos fosforilados, esta región está constituida por múltiples unidades repetidas de PO₄-6gal (β1,4) man (α1).
- 4.-Región de oligosacáridos, el casquete terminal de la molécula que puede estar constituido por galactosa o furanosa (Descoteaux *et al.*, 1991).

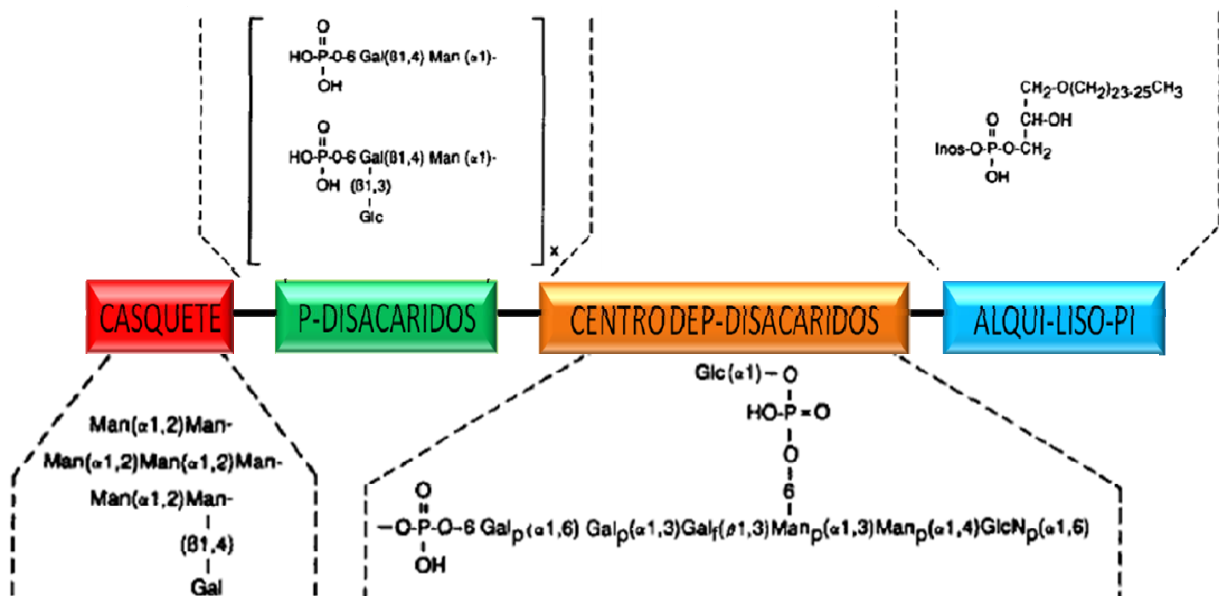


Figura 7. Estructura consenso del LPG de promastigotes de *L. mexicana*. En color azul se observa la región de anclaje, en color naranja la región del casquete de disacáridos, el color verde el centro de sacáridos fosforilados y en rojo la región del casquete. modificada de Ilg *et al.*, 1992.

Las cadenas de fosfoglicanos de los LPGs están cubiertas con pequeñas estructuras de oligosacáridos que contienen manosa, las cuales varían en cantidad y composición en diferentes especies de *Leishmania* (Figura 8). Por ejemplo, en *L. donovani* no cambia la cadena de fosfoglicanos, mientras que en *L. mexicana* el 30 % de estas cadenas se

cambian por glucosa y en *L. major* por galactosa y arabinosa. En todas estas LPGs, las cadenas laterales se unen exclusivamente en la posición C-3 de la galactosa en la columna de disacáridos (McConville *et al.*, 1995).

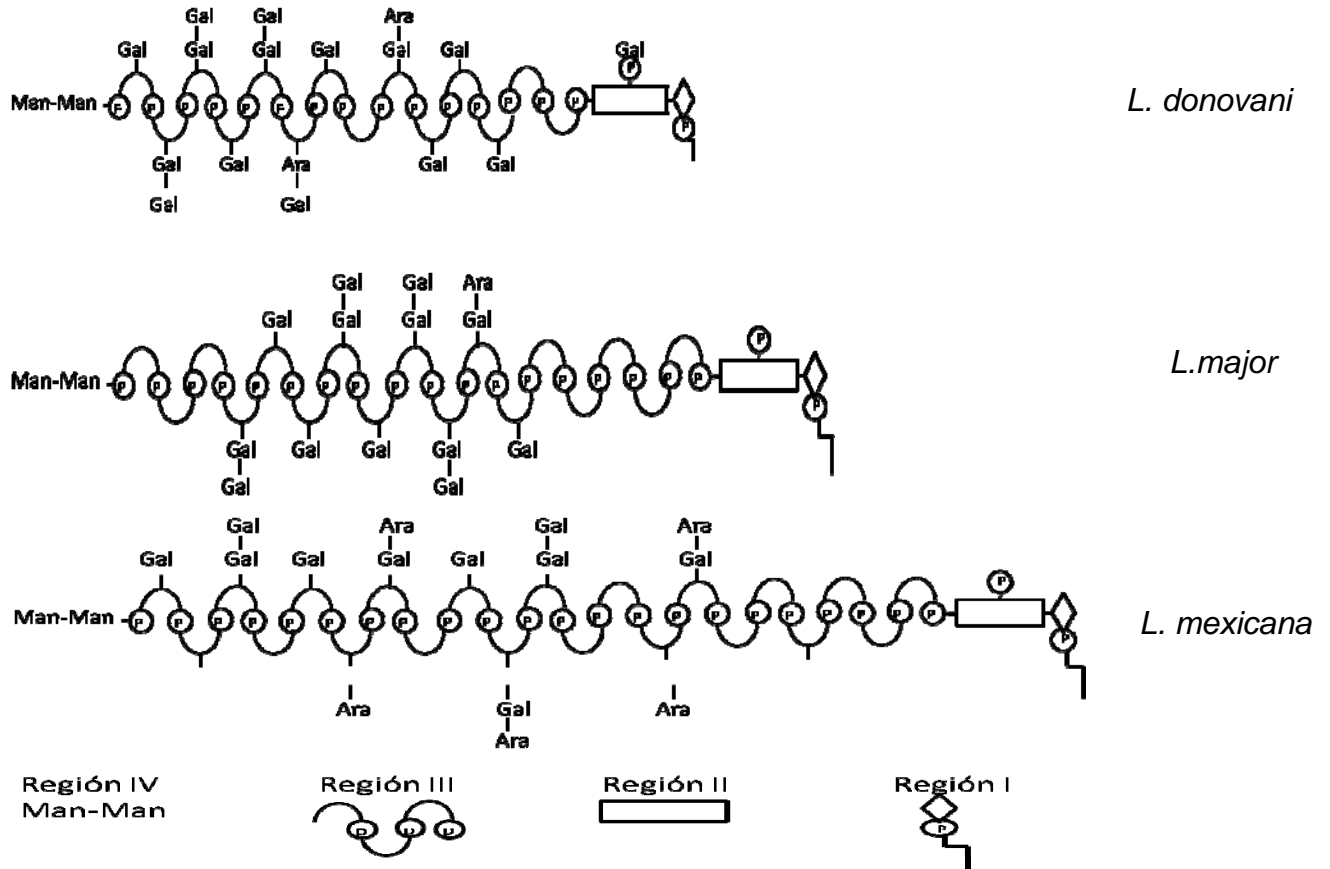


Figura 8. Diferencias en la estructura de LPG de las especies de *Leishmania*. Existen diferencias principalmente entre la Región III (fosfosacaridos) y IV (oligosacaridos), como consecuencia de ello se genera una gran diversidad antigénica.

1.5 Funciones del LPG de *Leishmania*

El LPG es una molécula importante durante el proceso de infección de *Leishmania*. Una vez dentro del hospedero, el parásito deberá evitar los mecanismos microbicidas del organismo infectado.

En el torrente sanguíneo, los promastigotes procíclicos son sensibles a la lisis mediada por complemento de la vía alterna, mientras que la forma metacíclica activa la vía clásica. Al activarse el factor C3 por alguna de estas dos vías y con la acción de la convertasa del C3, dará origen a los factores C3b y C3bi que son reconocidos por el LPG en la membrana extracelular del parásito. Estos componentes del complemento una vez unidos por el parásito son reconocidos por los receptores del macrófago, CR1 para el factor C3b y CR3 para el factor C3bi y de esta forma el parásito es fagocitado por el macrófago (Turco y Sacks, 1991; Descoteaux y Turco, 1999), sin embargo el promastigote probablemente a su grueso glicocalix no es destruido ya que evita que se forme el complejo de ataque a la membrana (MAC).

Los parásitos de *Leishmania* también pueden ser reconocidos por diferentes receptores presentes en monocitos/macrófagos y células dendríticas. Específicamente, el LPG es reconocido por los monocitos/macrófagos a través de la unión a componentes del suero como la proteína que une manosas (Manose-binding lectin: MBL) que actúa como activador de la cascada del complemento para que el parásito sea fagocitado por el macrófago para continuar su replicación (Cunningham, 2002).

Por otro lado existen evidencias de que el LPG modifica diversas propiedades funcionales de los fagosomas donde residen, inhibiendo su capacidad de fusionarse con el lisosoma lo que es muy importante para que el parásito se multiplique (Spath *et al.*, 2003).

En las primeras etapas de la fagocitosis, el reconocimiento de los receptores por el parásito de *Leishmania* conduce a una acumulación localizada de f-actina la cual puede formar una barrera física que torna rígido el fagosoma evitando su maduración. (Dermine *et al.*, 2005).

El efecto del LPG sobre la membrana tiene diversos efectos nocivos en el hospedero como: cambios en los fosfolípidos, modificación del metabolismo así como del tráfico en la membrana, alteración en la transducción de señales, inhibición del estallido oxidativo y modulación de la fosforilación de algunas cinasas (Desjardins y Descoteaux, 1997; Dermine *et al.*, 2000; Spath *et al.*, 2003; Lodge y Descoteaux, 2005).

Estudios previos han demostrado que para que *Leishmania* pueda realizar estas funciones, necesita por lo menos el 20% del total de moléculas de LPG intactas para lograr sobrevivir en el interior del fagolisosoma del macrófago (McNeely y Turco, 1990).

Cuando *Leishmania* se transforma en amastigote dentro del fagolisosoma debe resistir la acción las enzimas hidrolíticas y los productos tóxicos de oxígeno, teniendo así la capacidad de sobrevivir para seguir multiplicándose. Se ha estudiado la acción de LPG sobre cuatro enzimas hidrolíticas de macrófagos murinos y se ha encontrado que el LPG no afecta la actividad de la fosfatasa ácida, β -glucosaoxidasa y N-acetil- β -glucosidasa, pero si se ve afectada la actividad de la enzima β -galactosidasa por acción de las cargas negativas de LPG (Turco y Descoteaux, 1992).

1.6 Células que participan en la respuesta inmune en la leishmaniasis

La infección por *Leishmania* generalmente induce una respuesta inmune muy compleja que varía dependiendo de diferentes factores: la especie de *Leishmania* implicada en el proceso infeccioso, el tipo de respuesta del hospedero así como la cronicidad de la enfermedad (Teixeira *et al.*, 2005). Debido a esto se genera un espectro de respuestas inmunes que incluyen desde mecanismos de inmunidad innata hasta mecanismos de inmunidad específica mediados por células y anticuerpos. Sin embargo, los diferentes

mecanismos de respuesta inmune implicados durante la infección por *Leishmania*, no siempre aparecen ni se desarrollan simultáneamente (Ruiz y Becker, 2007).

El modelo murino ha sido excelente para estudiar la relación hospedero-parásito y activar la respuesta inmune en *Leishmania*. Ratones genéticamente resistentes (C57BL/6 y C3H) desarrollan lesiones cutáneas que pueden resolver de forma espontánea, promoviendo una respuesta linfocitaria Th1, promoviendo la liberación de IFN- γ y la producción de TNF- α e IL-12 así como la estimulación subsecuente del macrófago, teniendo como resultado el control de la enfermedad. En contraste los ratones genéticamente susceptibles (BALB/c), permitirán la diseminación de la infección presentando una respuesta de linfocitos Th2 con la producción de IL-4, IL-10, IL-13 e IL-15 principalmente, lo cual permite la multiplicación incontrolada del parásito y la progresión del padecimiento impidiendo la cicatrización de lesiones cutáneas (Bogdan *et al.*, 1996; Sacks y Noben-Trauth, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que *L. mexicana* produce una infección más severa en ratones susceptibles, mientras que en la cepa C57BL/6 la infección se logra controlar pero no llega a curar (Alexander *et al.*, 1998).

En la leishmaniasis se presenta una respuesta inmune innata (RII) y adaptativa (RIA) las cuales forman un sistema integrado de defensa en el que existe una cooperación funcional de numerosas células y moléculas. La RII comienza por la inoculación de promastigotes del parásito por el vector (díptero). Los promastigotes se propagan a través de la sangre o los fluidos linfáticos hasta que son fagocitados por las células del sistema fagocítico, las cuales inducen una respuesta inflamatoria ocasionando la migración y activación de células cebadas, neutrófilos, monocitos y macrófagos que

participan en la eliminación del agente extraño, reorganizando el tejido dañado e iniciando el proceso de reparación

La fase de la RIA se caracteriza por la infiltración de células dendríticas y linfocitos T en la zona de la lesión. Finalmente, en el estado crónico, la persistencia de parásitos contribuye a la progresión de la enfermedad. Los macrófagos residentes de la piel son los encargados del reclutamiento de células efectoras (neutrófilos, eosinófilos y células cebadas), los cuales están involucradas en la formación del granuloma y la eliminación de microorganismos en el sitio de infección (Agudelo, 2000).

A) Linfocitos T: La respuesta de los linfocitos T se ha evidenciado a través de reacciones de hipersensibilidad tardía y proliferación de linfocitos *in vitro* en presencia de antígenos de *Leishmania* (Ruiz y Becker, 2007).

Luego del contacto con los antígenos del parásito expresados en la membrana del macrófago infectado y según sea el tipo de célula presentadora de antígeno (CPA), los niveles de citocinas endógenas y la naturaleza del antígeno reconocido, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ proliferan y secretan un patrón de citocinas definidas con funciones efectoras diferentes (Scott, 1991; Rossi-Bergmann *et al.*, 1993). En lesiones de pacientes con LCL se ha observado una respuesta de citocinas tipo Th1, con predominio de IFN- γ e IL-1 β sobre IL-4 y bajos niveles o ausencia de IL-5 e IL-10, mientras que en lesiones de pacientes con LCD predominan citocinas de una respuesta tipo Th2, con predominio de IL-4, ligera expresión de TNF- α y bajos niveles de IL-1 β (Caceres-Dittmar *et al.*, 1993; Tapia *et al.*, 1993).

B) Linfocitos T CD4⁺: Se ha demostrado que juegan un papel importante en la evolución de la enfermedad, con base en el patrón de citocinas que secretan. Estas

células se pueden diferenciar en CD4⁺ tipo 1 (Th1) y CD4⁺ tipo 2 (Th2). Las citocinas de tipo Th1, como IFN- γ y TNF- α , participan en la regulación del granuloma y la activación de macrófagos para aumentar su capacidad microbicida, además de inducir una respuesta humoral con los isotipos IgG1 e IgG3 en seres humanos (IgG2a en ratones). Por otro lado las citocinas de tipo Th2 incluyen IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-10. Entre otras acciones la IL-4 regula la producción de IgE por los linfocitos B que participan en la activación de reacciones de hipersensibilidad inmediata (Cox y Liew, 1992). La presencia de IL-4 antagoniza la acción de IFN- γ sobre el macrófago. Aunque se desconoce mucho acerca de los factores responsables de la inducción hacia la respuesta Th1 o Th2, se sabe actualmente que los niveles de IL-12 presentes en etapas tempranas del padecimiento son decisivos para definir una polarización hacia Th1/Th2 y así influir en el desenlace de la enfermedad.

C) Linfocitos T CD8⁺: son células efectoras importantes en el marco de la infección parasitaria intracelular. Se ha visto que los linfocitos CD8⁺ juegan un papel esencial en la curación de reinfecciones por *L. major*. Los mecanismos de protección de los linfocitos T CD8⁺ pueden ser mediados por la producción de IFN- γ o bien por su actividad como célula citotóxica, con la propiedad de lisar macrófagos infectados (Muller *et al.*, 1994; Awasthi *et al.*, 2004). Un estudio demostró que los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con LCD están funcionalmente disminuidos en sus funciones efectoras específicas contra *Leishmania*, como la actividad citotóxica y la producción de IFN- γ , en comparación con linfocitos CD8 de pacientes con LCL (Hernandez-Ruiz *et al.*, 2010).

D) Células cebadas: Recientemente se ha demostrado que las células cebadas secretan TNF- α , que promueven el flujo de neutrófilos, mientras que las quimiocinas

atraen a los macrófagos al sitio de infección. Este hecho se basa en estudios que demuestran que las células cebadas desgranulan intensamente en el sitio de inoculación de *Leishmania* (Von Stebut, 2007). En el modelo murino se observó que los ratones resistentes C57BL/6 tienen una respuesta inmune más eficaz contra *L. mexicana*, debido al aumento de receptores TLR2 que ayudan al reconocimiento de *Leishmania* y la activación de las células cebadas, con el subsecuente incremento en la secreción de citocinas y quimiocinas, además de poder controlar la inflamación mediante producción de citocinas reguladoras como IL-10. Por otro lado en los ratones BALB/c, la degranulación en estados tempranos de la infección, en ausencia de IL-10, lleva a un proceso inflamatorio agudo, el cual permite la diseminación del parásito ya que durante esta etapa únicamente se reclutan células de la respuesta inmune innata, que no cuentan con el apoyo de linfocitos específicos para incrementar su actividad leishmanicida (Villasenor-Cardoso *et al.*, 2008).

E) Células NK: La activación de las células NK incrementa la síntesis de quimiocinas y citocinas, modulan la hematopoyésis, controlan el crecimiento de monocitos y granulocitos e influyen en el tipo de respuesta adaptativa subsecuente (Moretta *et al.*, 2002). En la leishmaniasis se ha visto que las células NK son un suministro temprano 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 induce la activación de células NK. Se sabe que *Leishmania* es capaz de inhibir la síntesis de IL-12 en macrófagos, lo que limita la activación de las células NK (Nylen *et al.*, 2003).

F) Células dendríticas: Las células dendríticas (CD) tienen la habilidad de transportar antígenos desde el sitio del primer encuentro con la *Leishmania* en la piel hasta los ganglios linfáticos para su presentación a los linfocitos T. Se ha descrito que las CD pueden producir IL-12 tras el contacto con el parásito, contrario a lo que sucede con el macrófago infectado en donde *Leishmania* puede inhibir la producción de IL-12 (Moll, 1993). En contraste con lo que sucede con los macrófagos, se ha demostrado que las CD aumentan la expresión de MHCII y CD86 tras la estimulación con LPG de *L. mexicana* (Argueta-Donohue *et al.*, 2008). De manera interesante, mediante microarreglos, se demostró la activación de genes que codifican para citocinas proinflamatorias como IL-12 y TNF- α , entre otras (Aebischer *et al.*, 2005).

G) Neutrófilos: Son células fagocíticas que pueden destruir a *Leishmania* por medio de gránulos y metabolitos reactivos del oxígeno, tan eficientemente como los macrófagos, ya que el estallido respiratorio en estas células es muy potente. Los neutrófilos son las primeras células en migrar al sitio de la infección, incluso dos o tres días antes que los monocitos, lo cual describe su importancia en las fases tempranas de la infección (Stafford *et al.*, 2002). Los neutrófilos que han fagocitado leishmanias pueden secretar quimiocinas como MIP-1, que permite el reclutamiento de monocitos y también es quimiotáctica para otros neutrófilos. Estas células tienen una vida corta y entran en apoptosis espontánea 6-10 horas después de entrar en contacto con el parásito. Se ha demostrado que *Leishmania* usa una estrategia de guerra similar a la "Troyana", mediante la cual el parásito modula a los neutrófilos como un medio de camuflaje para protegerse del medio extracelular tóxico. Los neutrófilos fagocitan al parásito pero no son la célula hospedera definitiva del mismo. De esta manera, los

neutrófilos son utilizados por el parásito como un refugio contra la lisis mediada por complemento (Awasthi *et al.*, 2004).

H) Monocitos/Macrófagos: Los macrófagos son células del sistema inmune que tienen un papel primordial en la eliminación de microorganismos patógenos. Algunos protozoarios pueden parasitar macrófagos y utilizar los recursos de esta célula hospedera para su crecimiento y replicación. Sin embargo, *Leishmania* es el único protozoario que necesita predominantemente al macrófago para completar su ciclo de vida (Stafford *et al.*, 2002). Cuando los monocitos/macrófagos son infectados por el parásito, los mecanismos de interacción con los linfocitos T se alteran. Por ejemplo, los amastigotes pueden suprimir la síntesis de antígenos en las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHCII); además, existe una expresión deficiente en las moléculas coestimuladoras como CD80 (Kaye *et al.*, 1994). Entre los mecanismos efectores más importantes del macrófago se encuentra la generación de intermediarios reactivos de oxígeno y de óxido nítrico durante el estallido respiratorio. La alteración de la membrana del macrófago durante la fagocitosis induce al incremento de consumo de oxígeno, llamándose a este proceso estallido oxidativo. Durante este proceso la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) generará compuestos de oxígeno como son el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno y radicales hidroxilo ($-OH$) que son compuestos altamente microbicidas. Otros estudios han demostrado que *Leishmania* disminuye la producción de IL-12 y aunado a esto, los macrófagos infectados y posteriormente estimulados con IFN- γ y TNF- α son incapaces de producir IL-12 (Belkaid *et al.*, 1998).

La forma en la cual los promastigotes de *Leishmania* interactúan con las células de la respuesta inmune no es clara pero se propone que pueden ser a través de los receptores que reconocen estructuras de carbohidratos que presentan los receptores tipo-Toll (TLRs).

1.7 Vías de señalización de los Receptores tipo Toll (TLRs)

En mamíferos, los miembros de la familia de TLRs descritos hasta el momento son 13. Son glicoproteínas integrales de membrana tipo 1 con peso molecular de 87-115 kDa. Algunos de ellos son localizados principalmente sobre la superficie celular como el TLR 1, 2, 4, 5 y 6, mientras que otros como el TLR3, 7, 8 y 9 se encuentran principalmente en compartimentos intracelulares. Estos se caracterizan estructuralmente por la presencia de un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina (LRR) y un dominio TIR intracelular similar al dominio del receptor de IL-1 (IL-1 R) (Akira, 2003). Estas regiones son llamadas Toll/IL-1R. La unión de IL-1R con su ligando induce la dimerización del receptor y el reclutamiento de varias moléculas adaptadoras que activan la vía de señalización (Kawai y Akira, 2011).

La unión de los TLRs con sus ligandos específicos lleva al reclutamiento de varias proteínas adaptadoras que contienen un dominio TIR como MyD88, TIRAP, TRIF o TRAM. El entrecruzamiento de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 y TLR11 con sus respectivos ligandos recluta a la molécula MyD88. Además de MyD88, TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6 reclutan a TIRAP, que sirve como adaptador entre los dominios TIR de los TLRs y MyD88. La unión de TLR3 y TLR4 con su ligando reclutan a TRIF. Asimismo, TLR4 recluta a TRIF a través de TRAM, que hace de adaptador entre

el dominio TIR de TLR4 y TRIF (Kumar *et al.*, 2009). El reclutamiento de proteínas adaptadoras dispara una cascada de señalización con activación de la cinasa IRAK, seguida por la fosforilación y activación de TRAF6. La disociación del complejo IRAK-1, TRAF-6 provoca que TRAF-6 active proteínas involucradas río abajo en esta vía de señalización. IKK fosforila a I κ B, esta ubiquitinación favorece su degradación liberando al factor de transcripción NF- κ B, permitiendo así su translocación al núcleo donde interacciona con promotores y elementos mediadores de los genes de citocinas inflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-12. Este reclutamiento también activa a diversas MAPquinasas (mitogen activated protein kinases) tales como p38, JNKs (c-Jun N-terminal kinases) y ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases), que a su vez activan al factor de transcripción AP-1 y NF- κ B (Figura 9). Distintos TLRs reconocen ligandos que comparten múltiples patógenos. La unión del TLR con su ligando desencadena una cascada de señalización por lo que son considerados importantes reguladores de la inmunidad innata al modular la producción de citocinas proinflamatorias.

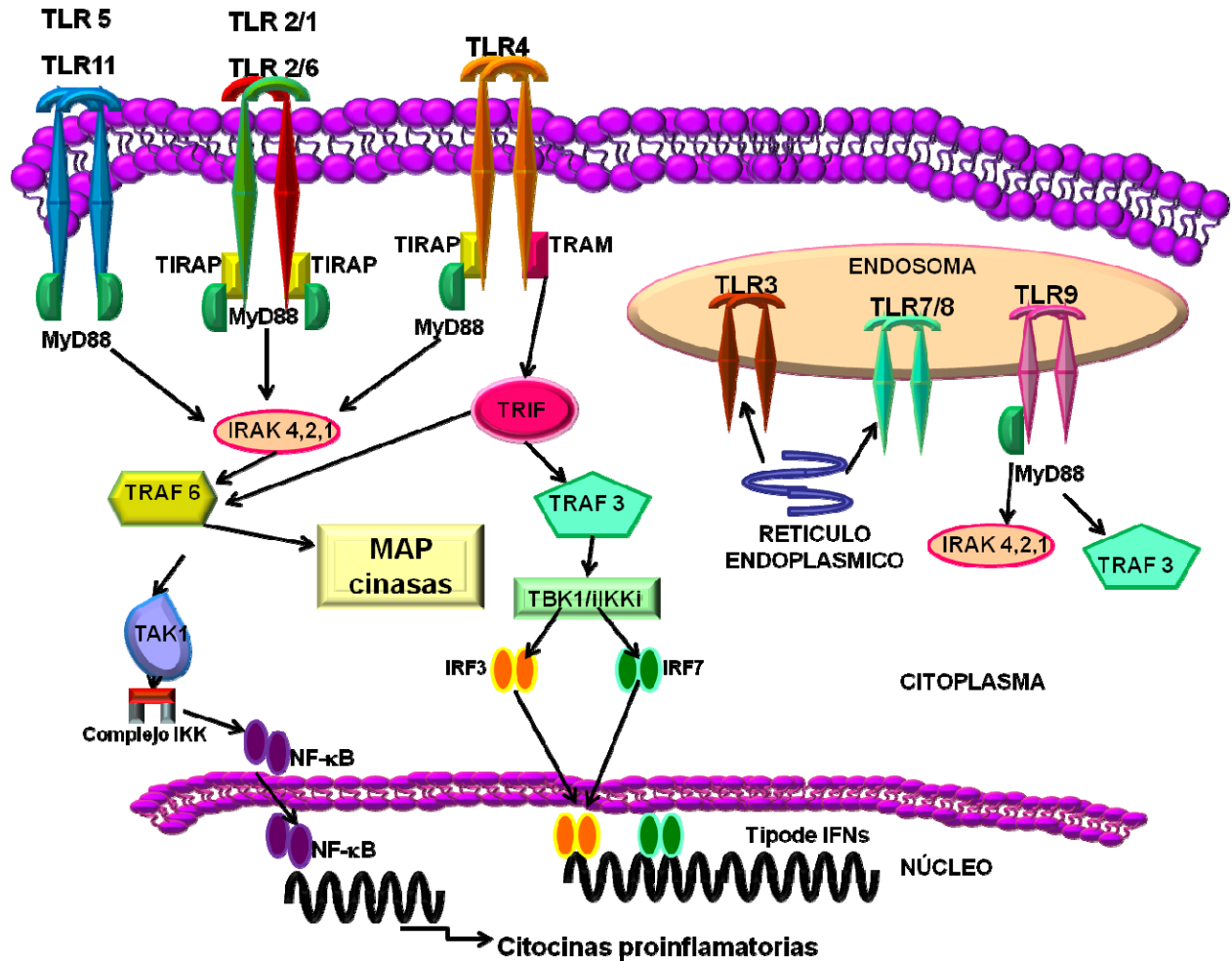


Figura 9. Localización y señalización de los TLRs en células dendríticas y macrófagos. TLR2, TLR4 , TLR5 y TLR11 se localizan principalmente en la superficie celular para el reconocimiento de ligando. TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se localizan principalmente en los endosomas. Las células dendríticas o macrófagos estimulados inician la vía dependiente de MyD88 que recluta a la familia de las proteínas de IRAK y TRAF6. A su vez, TRAF6 activa TAK1. El TAK1 activa al complejo IKK, que activa subunidades NF-κB. El TAK1 activado también induce la activación de las MAPKs. Modificada de (Kumar *et al.*, 2009).

1.8 Vías de señalización de las MAPquinasas

Las MAPquinasas son una familia de proteínas cuya función y regulación se ha conservado durante la evolución desde organismos unicelulares, como la levadura de la cerveza, hasta organismos más complejos, como el ser humano (Widmann *et al.*, 1999).

Como principio general, varias rutas de señalización pueden utilizar mecanismos análogos para amplificar sus señales biológicas y mediar diversos efectos en la función celular. Las MAPquinasas constituyen redes de transducción de señales que permiten a las células recibir estímulos externos y responder a las señales de una manera apropiada (Cobb, 1999). Su activación depende de una señal que puede originarse por condiciones de estrés en el entorno, como por ejemplo el choque osmótico, irradiación, daños en el DNA o por productos bacterianos. Estas cinasas modulan muchos eventos celulares, incluyendo: la progresión del ciclo celular inducida por mitógenos, la regulación del desarrollo embrionario, el movimiento celular y la apoptosis, así como la diferenciación neuronal. En organismos multicelulares están organizadas en tres módulos paralelos, que actúan en cascada y son las encargadas de transmitir al núcleo de las células la información necesaria para iniciar el proceso de división celular (Cuadrado y Nebreda, 2010)(Figura 10).

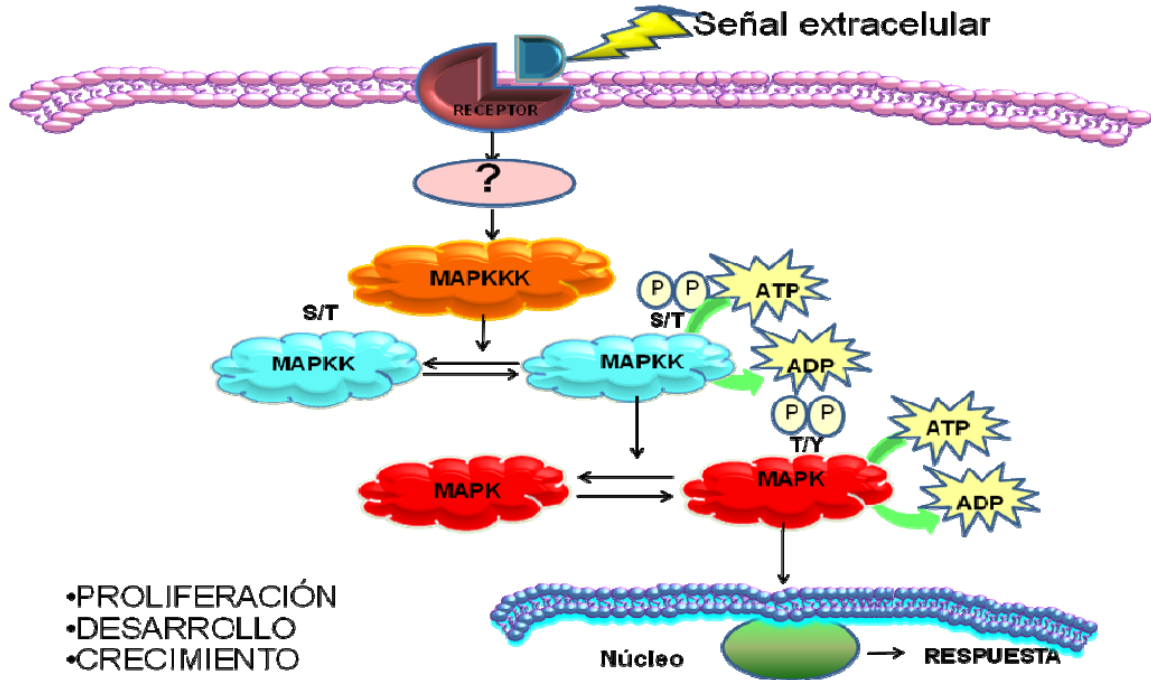


Figura 10. Secuencia de activación de las MAPCinasas. La activación de las cinasas inicia con una señal extracelular que induce la activación de las cinasas MAPKKK (MAP kinasa, kinasa, kinasa) mediante la fosforilación de residuos serina/treonina; mediante la utilización de Adenosin trifosfato (ATP) y Adenosin difosfato (ADP) esta señal puede terminar ahí o activar a las cinasas subsecuentes MKK (MAP kinasa, kinasa) que son fosforiladas en residuos tirosina/treonina. Una vez activadas las cinasas inician la señal para la translocación nuclear y producir un tipo de respuesta. Modificada de www.cellsignaling.mx

Existen por lo menos tres distintas familias de MAPCinasas clasificadas como: ERK, p38 y JNK.

ERK: (*extracellular signal-regulated kinase*) se activa por estímulos mitogénicos, citocinas y algunos factores de crecimiento.

p38: MAPkinase (*stress-activated MAP kinase*), puede activarse por factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias.

JNK/SAPK :(*c-jun NH2-terminal kinase*) se pueden activar por luz ultravioleta. (Vitale *et al.*, 2000) (Figura 11).

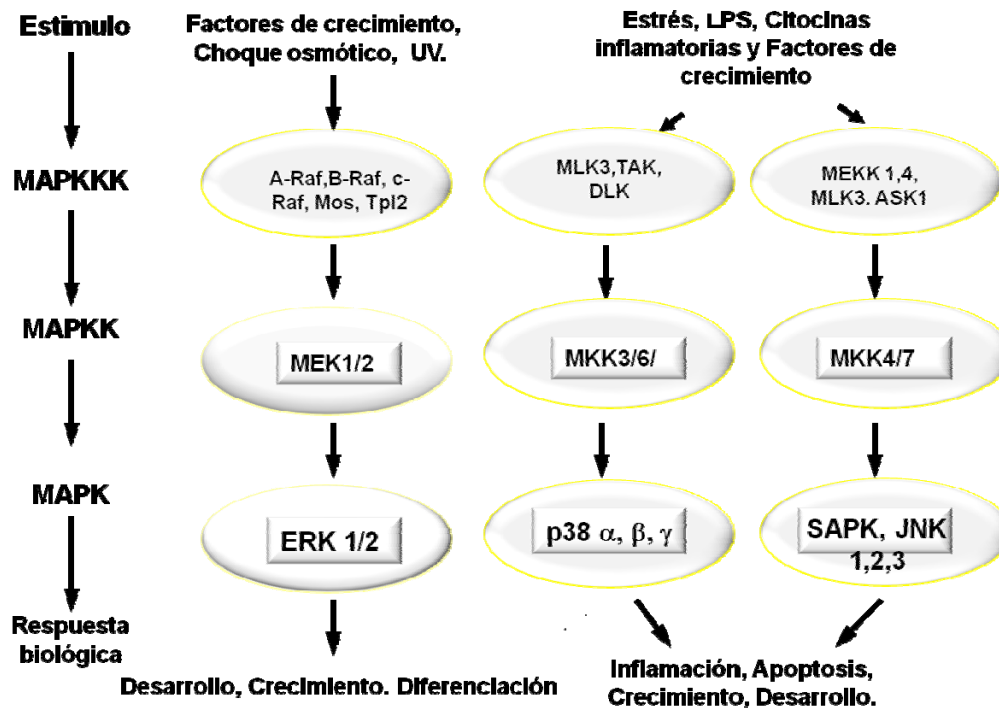


Figura 11. Cascada de activación de las MAPKinasas. La activación de cada familia de MAPK se produce en forma de cascada. Dichas cascadas están formadas por tres módulos con actividad cinasa, donde los miembros del módulo superior fosforilan y activan a los miembros del módulo inferior. La especificidad de la respuesta de la MAPK viene dada por la activación específica de determinados miembros de cada uno de estos módulos. Modificada de www.cellsignaling.com

Las MAPKinasas son estructuras proteínicas pequeñas que se encuentran en el citoplasma de distintas células, fosforilan específicamente residuos serina y treonina de proteínas sustrato. Son activadas por fosforilación de dos sitios específicos entre los subdominios VII y VIII del núcleo cerca del centro catalítico de la enzima. La eliminación de los grupos fosfatos se realiza mediante la acción de las MAPKinasas fosfatasas (MKPs), que devuelven las MAPKinasas a su estado inactivo; la duración y el grado de activación dependen del balance entre señales. Estas cinasas están formadas por 7 alfa hélices, 7 láminas tipo beta y un solo loop de activación, tal y como se muestra en

la figura 12. A pesar de que existen diversos tipos de proteínas cinasas, la estructura básica no difiere mucho de un tipo a otro (Wang *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2006).

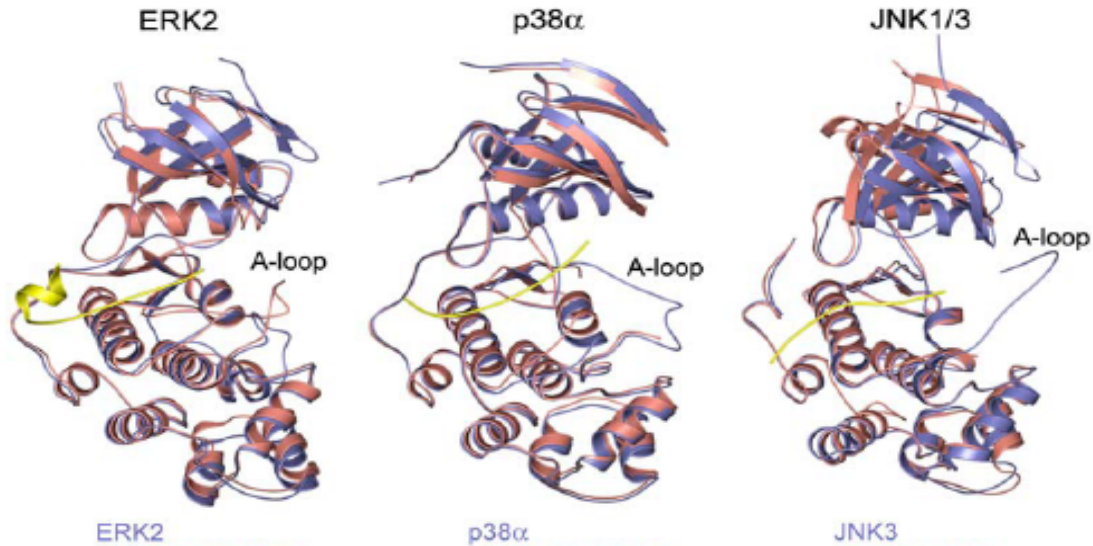


Figura 12. Estructura de las MAPquinasas. Se muestran las superposiciones que se basan en la forma activa (color azul) e inactiva de las cinasas (color salmón), los péptidos unidos se muestran en amarillo. En ERK2 y p38, las superposiciones son muy similares. El "loop" muestra el sitio de activación. Tomada de Zhou *et al.*, 2006.

Las cinasas ERKs principalmente son fosforiladas por proteínas como: Raf1, B-Raf y A-Raf. Cuando una de estas proteínas es activada, promueve la fosforilación río abajo de MEK1 y MEK2 y posteriormente éstas fosforilan a, ERK1 y ERK2 respectivamente como se muestra en la figura 13. Una vez activadas estas cinasas inducen la expresión de diversos factores de transcripción (c-Myc, c-Fos, Elk1, CREB y AP-1, NF- κ B y ATF2). Para entender mejor el mecanismo de acción de las ERK se han utilizado bloqueadores farmacológicos como los inhibidores U0126 o PD98059. La activación de MEK1 y MEK2 se produce a través de la fosforilación de dos residuos de serina en las posiciones 217 y 221, situados en el bucle de activación de subdominio VIII. MEK activa p44 y p42. PD98059 ha demostrado actuar como un inhibidor no competitivo altamente

selectivo de la activación de MEK1. PD98059 se une a las formas inactivas de MEK1 y evita la fosforilación por activadores río arriba tales como c-Raf, dependiendo del tipo celular la concentración puede variar de 2–50µM (Alessi *et al.*, 1995) Figura 13.

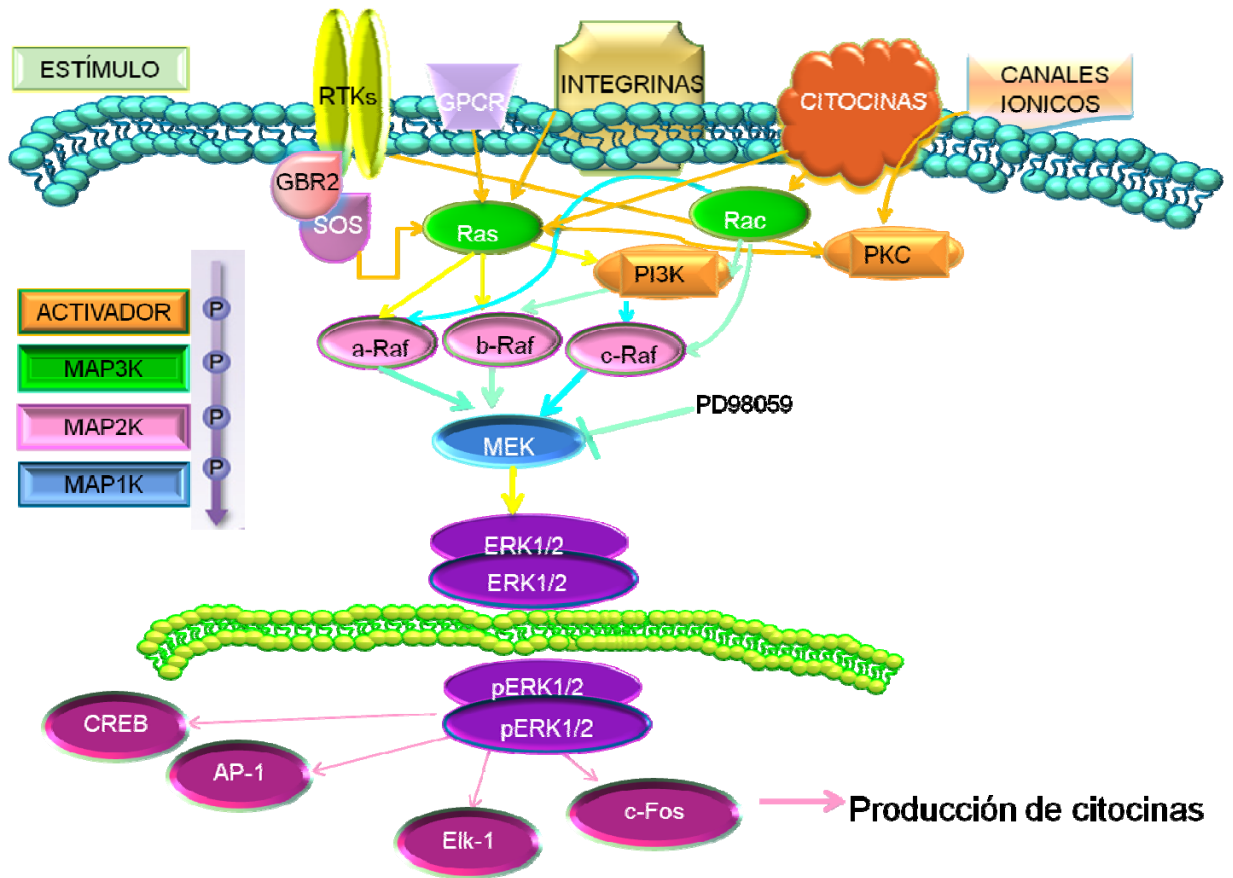


Figura 13. Vía de activación de ERK. Se puede activar por citocinas, canales iónicos u otras proteínas cinasas que se encuentran río arriba y se van fosforilando, como resultado permiten que ERK se transloque al núcleo e inicie la transcripción de genes como AP-1 (Proteína activadora 1), CREB (response elemental binding), Elk-1 (Ets LiKe gene 1) para la producción de citocinas . Modificada de www.cellsignaling.com

Existen cuatro isoformas de MAPp38: α , β , γ , δ (Cobb, 1999). Fue aislada como una proteína de bajo peso molecular de 38kDa, fue purificada y clonada como una molécula que unía a los derivados de pirimidazol, sustancias que inhiben la producción de citocinas proinflamatorias (Cuadrado y Nebreda, 2010). Las proteínas p38 α y p38 β , se localizan de manera general en la mayoría de las células. La p38 γ se expresa de

manera diferencial en otros tejidos como músculo esquelético (Pearson *et al.*, 2001) y la p38 δ en testículo, páncreas e intestino delgado (Crews *et al.*, 1992). Las isoformas conservan el 60% de identidad con su grupo y entre el 40 y 45% con la familia de las MAPK. La activación de p38 se presenta por la fosforilación dual de dos residuos de aminoácidos treonina-glicina-tirosina (Thr-Gly-Tyr), activada por MKK3 y MKK6 (Nick *et al.*, 1996). La activación de la cinasa p38 puede ocasionar la secreción de las citocinas proinflamatorias IL1 α , IL6, IL12, TNF- α o IFN- γ , (Johnson *et al.*, 1996) (Figura 14).

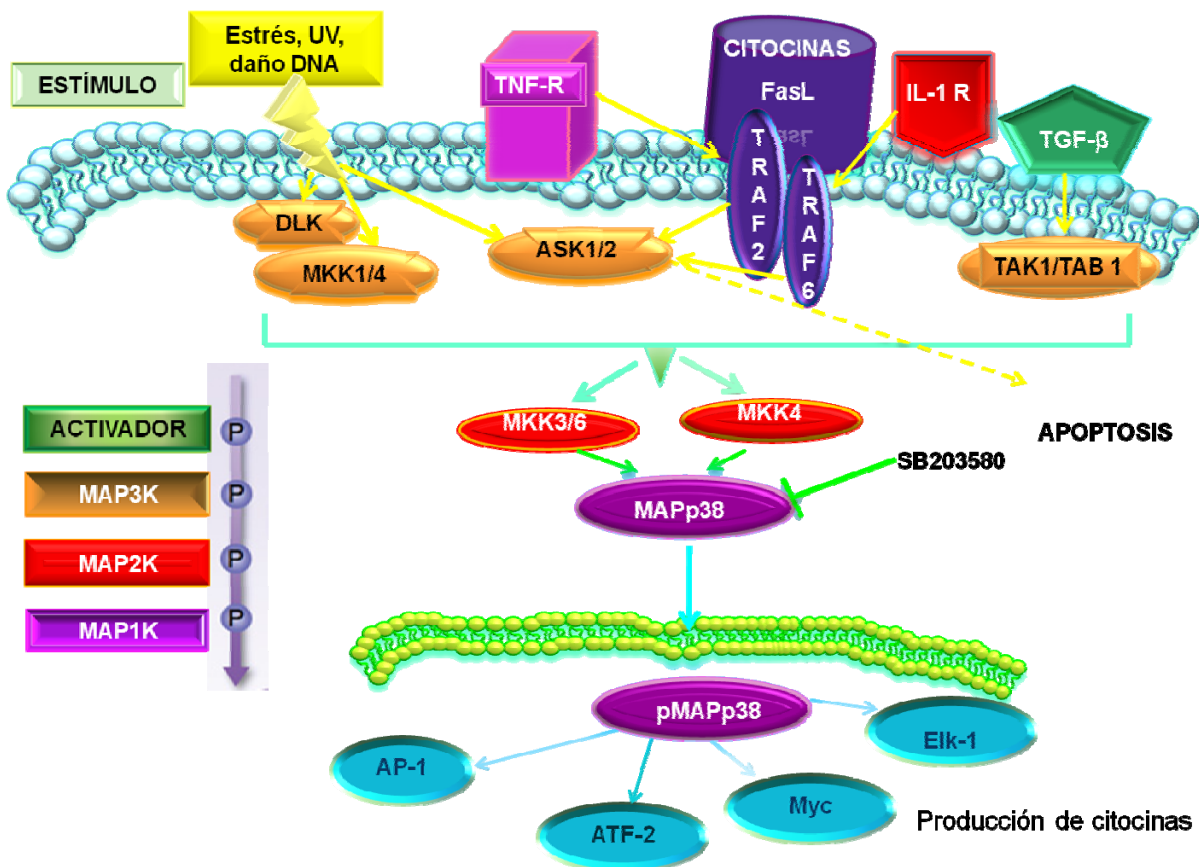


Figura 14. Vía de la activación de p38 MAPcinasa. La activación de p38 ocurre en proteínas cinasas que se encuentran río arriba y se van fosforilando, como resultado permiten que p38 se transloque al núcleo e inicie la transcripción de genes como AP-1 (Proteína activadora 1), ATF- (Factor de transcripción activador 2) para la producción de citocinas. Modificada de www.cell.signaling.com

El uso de células mutantes para MKK3 y 6, permite entender las funciones de esta proteína en la regulación de genes, el rango de uso de estos de los inhibidores SB202190, SB202474 y SB203580 depende del tipo celular.

La vía de las MAPcinasas ERK y p38 permiten la activación de factores de transcripción como AP-1 y NF-kB.

1.9 Factores de transcripción

La fosforilación parece ser una señal para que los factores de transcripción viajen al núcleo de la célula en donde reconocen secuencias específicas localizadas en el ADN. La interacción del factor con una secuencia consenso correspondiente puede tener un efecto positivo o negativo sobre la frecuencia de transcripción del gen que regula e induce su expresión (Karin *et al.*, 1997). Todos los factores tienen un dominio de unión al ADN rico en residuos de lisina, arginina e histidina, razón por la cual se le llama dominio básico.

Hace más de 20 años fue identificado un nuevo factor transcripcional denominado AP-1, el cual participa tanto en la expresión basal de genes, así como en la expresión de genes inducibles. Regulando procesos en la diferenciación, proliferación, apoptosis celular y transformación oncogénica. AP-1 no es una proteína sencilla; está formada por un complejo dimérico integrado por familias y subfamilias de Fos y Jun. La composición de AP-1 puede variar en relación con el estímulo aplicado y al patrón de transducción de señales utilizado por la célula (Shaulian y Karin, 2002). Así pues, la activación de AP-1 en respuesta a citocinas y estrés está mediado principalmente por cinasas activadas por mitogénos. Las consecuencias fisiológicas de la activación de

AP-1 incluyen inflamación, respuesta a estrés celular y producción de citocinas (Yang *et al.*, 1997).

Otro factor de transcripción importante es NF- κ B, se encuentra en el citoplasma en un estado inactivo y tras un estímulo puede translocarse al núcleo principalmente activado por la vía de los TLRs. La variedad de señales que puede activar a NF- κ B depende de la señal que haya recibido en la superficie celular; entre los factores que pueden activarlo encontramos por ejemplo a citocinas como TNF- α , estímulos mitogénicos o componentes infecciosos como el LPS bacteriano. NF- κ B está involucrado en distintos eventos de la inmunidad como en la expresión génica de receptores de la respuesta inmune, regulación de citocinas y factores de crecimiento así como el control de la proliferación celular (Angel *et al.*, 1987; Silverman y Maniatis, 2001). NF- κ B es un homodímero o heterodímero constituido por diferentes subunidades de la familia Rel, cada una de estas proteínas tiene una región conservada de 300 aminoácidos en el extremo N-terminal llamado dominio Rel que es el responsable de la dimerización, la unión al ADN y la interacción con las IKBs. En mamíferos, la familia de NF- κ B está compuesta por cinco miembros que son NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB y c-Rel. NF- κ B1 y NF- κ B2 son sintetizados como precursores p105 y p100, los cuales son procesados a las subunidades p50 y p52, respectivamente y son las que tienen la capacidad de unirse al ADN (Silverman y Maniatis, 2001).

Estudios previos han demostrado en macrófagos murinos que la activación de AP-1 y NF- κ B es inhibida por la infección con promastigotes de *L.* cuando ocurre un aumento en la concentración intracelular de ceramida, lo que tiene como consecuencia una mala regulación en la actividad de la PKC, así como de la fosforilación de la cinasa ERK (Ghosh *et al.*, 2001; Zingarelli, 2005).

1.10 Modulación de las vías de señalización por *Leishmania*

Leishmania ha desarrollado varias estrategias de manipulación intracelular de la célula hospedera, lo que favorece su supervivencia. Una de estas estrategias es la alteración de las diversas vías de señalización.

A) Proteína cinasa C (PKC): Uno de los mecanismos que ha desarrollado *Leishmania* para poder tener éxito en la sobrevivencia intracelular es la inhibición de PKC. Reportes previos han demostrado que el LPG de *L. donovani* no inhibe significativamente la unión de PKC α a la membrana celular, pero si disminuye su actividad enzimática en un 70% (McNeely y Turco, 1987). Otro estudio demostró que *L. donovani* evita el desencadenamiento del estallido oxidativo mediante la inhibición de la PKC en macrófagos (Olivier *et al.*, 1992). La inhibición de la fosforilación de la proteína PKC se observó con LPG purificada, que podría actuar ya sea como inhibidor competitivo de la PKC o activador de diacilglicerol (DAG) y reducir así su actividad y/o alterando la propiedades físicas de la bicapa lipídica, lo que dificulta la translocación de la PKC hacia la membrana, disminuyendo así su actividad y evitando el consumo de oxígeno (Descoteaux *et al.*, 1991). Por otro lado, se analizó el efecto que ejerce LPG de *L. mexicana* sobre la expresión y actividad enzimática de PKC en macrófagos de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6), encontrando que el LPG ejerce efectos opuestos sobre la actividad de PKC α : en los macrófagos de la cepa susceptible BALB/c el LPG ejerce un efecto de inhibición en la actividad de PKC α , mientras que en los macrófagos de ratones resistentes C57BL/6 el LPG ejerce un efecto de activación sobre PKC α (Delgado-Dominguez *et al.*, 2010).

B) JAK/STAT: Otra vía de señalización que ha sido estudiada en la infección por *Leishmania* es la de JAK/STAT. En células infectadas con *L. donovani* se observó una inhibición de la fosforilación de JAK2 y STAT1 mediante la activación de la fosfatasa celular SHP-1; como consecuencia disminuyó la producción de IL-12 (Nandan y Reiner, 1995). También se ha demostrado que la regulación negativa de IFN- γ contribuye a la inactivación de JAK2/STAT en células infectadas por *L. donovani* (Ray *et al.*, 2000). Por otro lado, se encontró que tanto *L. major* como *L. mexicana* atenúan la señalización de IFN- γ e IFN- β y reducen la expresión de la fosforilación de JAK1/2 (Bhardwaj *et al.*, 2005).

C) TLRs: Los macrófagos en la infección por *Leishmania* juegan un papel crítico debido a su capacidad para reconocer patógenos. Estas células expresan en su superficie una variedad de TLRs (Olivier *et al.*, 2005). Uno de los receptores que participa en el reconocimiento del LPG de *Leishmania* es el TLR2. Este reconocimiento provoca el incremento de la expresión del TLR2 en la membrana de células NK e induce la secreción de IFN- γ , TNF- α y la translocación de NF- κ B (Becker *et al.*, 2003; Nylen *et al.*, 2003; Takeda y Akira, 2004). También el LPG de *L. major* induce la secreción de IL-12 y TNF- α mediante el la activación del TLR2 (de Veer *et al.*, 2003). Otro estudio realizado con LPG de *L. major* en monocitos humanas mostró un reconocimiento parcial a través de TLR2, lo que conlleva a una secreción de citocinas así como la generación de especies reactivas de oxígeno (Kavoosi *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha demostrado que la activación de TLR4 durante la inmunoterapia contra la leishmaniasis se asocia con un aumento en la tasa de curación en el modelo murino (Kropf *et al.*, 2004). Su importancia se confirma al observar una mutación en el gen de

TLR4 mostró que estos ratones fueron incapaces de lograr sanar sus lesiones provocadas por *L. major*.

D) MAPcinastas: Existen diversos reportes donde se ha demostrado que el parásito de *Leishmania* ha desarrollado estrategias para modular la activación de las diversas MAPcinastas ya sea positiva o negativamente. Carrera y col en 1996 demostraron que macrófagos murinos al ser infectados con promastigotes de *L. major* reducían por completo la capacidad de producir IL-12, mientras el TNF- α e IL-1 β así como el óxido nítrico fueron parcialmente reducidas (Carrera *et al.*, 1996). En un estudio realizado en macrófagos murinos infectados con *L. donovani* se observó que disminuye la activación de las MAPcinastas y se inhibe la señalización de c-FOS y la producción del óxido nítrico (Nandan *et al.*, 1999). También se sabe que los promastigotes de *L. donovani* evaden mecanismos de la respuesta inmune para resistir la destrucción y modular funciones de defensa como la activación de MAPp38, c-JUN y ERK 1/2 durante la infección en macrófagos derivados de médula ósea (**Prive y Descoteaux**, 2000). Por otro lado, el LPG de *Leishmania* modula la activación de MAPp38 y ERK suprimiendo la producción de IL-12 y NO en macrófagos J774A1 (Feng *et al.*, 1999). Otro estudio demostró la activación de ERK en macrófagos murinos después de la infección con *L. amazonensis*, si se inhibe ERK aumenta la producción de IL-10 (Yang *et al.*, 2007).

2. Justificación

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria de gran importancia, cada año se presentan aproximadamente 2 millones de casos nuevos en todo el mundo, de los cuales 1.5 millones son por leishmaniasis cutánea (Von Stebut, 2007). *L. mexicana* produce la leishmaniasis cutánea localizada que es la forma benigna y leishmaniasis cutánea difusa, para la cual, aun no existe una cura efectiva.

Sin embargo, hasta el momento se desconocen muchos de los mecanismos por los cuales el parásito es capaz de generar estos cuadros clínicos, debido a que puede depender de las moléculas que tiene en su estructura el parásito o a la respuesta inmune que monta el hospedero. *Leishmania* ha desarrollado estrategias para resistir la acción lítica del sistema del complemento, teniendo un refugio seguro en el interior del macrófago. Además es conocido que el LPG juega un papel importante en la interacción de *Leishmania* con la célula hospedera. *Leishmania* evita la activación del macrófago modulando diversas vías de señalización contribuyendo al establecimiento exitoso de la infección. La vía de las MAPquinasas se activa mediante reacciones de fosforilación en cinasas como ERK y p38 que una vez fosforiladas promueven la translocación al núcleo de factores de transcripción como AP-1 y NF- κ B, generando la producción de citocinas que son fundamentales en la respuesta inmune frente a este patógeno. De igual manera algunos receptores de membrana como TLR2 y TLR4 participan en la activación de estas cinasas. Por lo que resulta fundamental comprender la interacción del parásito con las células hospederas implicadas para el control efectivo de la enfermedad.

3. Hipótesis

El Lipofosfoglicano de *L.mexicana* activa las cinasas MAPp38 y ERK y modula la secreción de citocinas proinflamatorias en macrófagos humanos a través de los receptores TLR2 y TLR4.

4. Objetivo General

Analizar del efecto que ejerce el LPG de *Leishmania mexicana* en la fosforilación de las cinasas MAP38 y ERK y en la secreción de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 e IL-10 en macrófagos humanos a través de los receptores TLR2 y TLR4.

4.1. Objetivos particulares

- 1.- Analizar la secreción de las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 e IL-10, en macrófagos estimulados con LPG.
- 2.- Analizar el efecto del LPG de *Leishmania* en la expresión del RNAm y las proteínas de TLR2 y TLR4 en macrófagos estimulados con LPG.
- 3.- Determinar la participación de TLR2 y TLR4 en la producción de citocinas en macrófagos estimulados con LPG.

4.- Observar la cinética de fosforilación de las cinasas ERK y p38 en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de inhibidores específicos en macrófagos humanos estimulados con LPG de *L. mexicana*.

5.- Evaluar la participación de TLR2 y TLR4 en la fosforilación de ERK y p38 en macrófagos estimulados con LPG.

6.-Determinar la translocación nuclear de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B en macrófagos estimulados con LPG de *L. mexicana*.

5. Métodos

5.1 Purificación de monocitos de sangre periférica.

A partir de sangre periférica humana de sujetos sanos, se obtuvieron paquetes celulares o “buffy coats” del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS y del Banco de sangre del Hospital General de México. De la sangre total se separaron células mononucleares utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque centrifugando a 2000 rpm por 20 minutos a 20° C. De las fases obtenidas se separó la interfase densa (mononucleares) por aspiración y se colocó en un tubo limpio. Las células se lavaron una vez con PBS 1X y se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos a 4° C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en solución lítica (NH_4Cl .1M, KHCO_3 1M, Na_2EDTA .1M), para romper los eritrocitos. Posteriormente se agregó PBS frío para lavar. Se centrifugó a 1200 rpm a 4° C durante 10 minutos. El paquete celular fue resuspendido en plasma y se centrifugado a 800 rpm por 10 minutos a 20 ° C para eliminar las plaquetas. Se. Se retiró el sobrenadante y para lavar las células se resuspendió el paquete celular en PBS 1X. Se tomó una alícuota de la suspensión para contar las células y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min a 4° C.

Para separar los monocitos se utilizó un KIT MACS. Se resuspendió el paquete celular en 80 μl de regulador MACS (EDTA 2mM, PBS pH 7.2, BSA al 0.5%), por cada 10^7 células totales y se agregaron 20 μl de CD14 Microbeads MACS. Se mezcló y se incubó durante 15 minutos de 4 a 8 °C. Una vez transcurrido este tiempo se adicionó 1 o 2 ml de amortiguador MACS y se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos a 4° C. Después se resuspendió en 500 μl de amortiguador MACS y se procedió a la separación magnética por selección positiva. Se colocó la columna (LS) en el separador MACS, se lavó con

3X3 ml de PBS, y se colocó la suspensión. Una vez realizado esto, se colectaron las células y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos a 4° C. Simultáneamente se tomó una alícuota y se contaron las células. La pastilla que se obtuvo se resuspendió en medio RPMI-1640 (GIBCO) estéril y se colocó un millón de células/ ml en cajas de baja adherencia (Costar No. catalogo 3523) y se dejó para que los monocitos maduraran a macrófagos en una incubadora a 37° C con 5% CO₂ durante 5 días. La viabilidad celular se evaluó mediante exclusión con azul tripán.

5.2 Análisis de la pureza de las células

Los macrófagos se resuspendieron en 200 µl de PBS y se marcaron en una proporción 1:4 con los anticuerpos monoclonales anti-CD14 (MACS), CD80/CD86/CD40 (BD, Bioscience, San José, California, USA.). Después de agregar los anticuerpos, las muestras se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y se centrifugaron a 850 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 400 µl de regulador (fluorescent-activated cell sorting).

Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSort con el programa Cell Quest (Beckton Dickinson, CA). Los resultados se obtuvieron en porcentajes y la distribución de los macrófagos en gráficas.

5.3 Cultivo de parásitos

Se utilizaron promastigotes de la cepa de *L. mexicana* MHOM/MX84/ISETGS, que fue obtenida a partir de un paciente con LCD. Fueron cultivados en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS inactivado por calor a 26 ° C (Life Technologies Laboratorios, Gaithersburg, MA, USA.).

#

5.4 Purificación de LPG de *Leishmania mexicana*

El LPG se purificó a partir de los promastigotes mencionados anteriormente mediante el método descrito por (Delgado-Dominguez *et al.*, 2010). Los promastigotes metacíclicos fueron cosechados en la fase estacionaria del cultivo. Se obtuvieron 1×10^9 parásitos por centrifugación a 3,200 x g por 10 min a 4°C y fueron lavados tres veces con PBS pH 7.4 frío. El paquete celular fue deslipidado con 80 ml de cloroformo-metanol-agua (4:8:3 v/v) por 30 min; el material insoluble se resuspendió en agua saturada con 1-butanol y liofilizado (2x50 ml). El LPG se purificó por HPLC en una columna de octil-Sepharose (Pharmacia) mediante un gradiente lineal del 5 al 70 % de 1-propanol y acetato de amonio 0.1 M. Las fracciones que fueron desprendidas por el gradiente (fracción 15-30) se colectaron y se liofilizaron, posteriormente se resuspendieron en 20 ml de acetato de amonio y se pasaron por una segunda columna de octil-Sepharose bajo las mismas condiciones. Nuevamente se colectaron las fracciones desprendidas por el gradiente (fracción 15 a 30), se concentraron a 3 ml y se dializaron 4 veces contra 5 litros de PBS pH 7.4. La pureza del LPG fue analizada en un gel SDS al 10 % con tinción de plata para carbohidratos. Por último, se determinó la concentración de carbohidratos en el LPG purificado por el método de Antrona (método para determinar el grado de pureza

después de la purificación). Como control de calidad, se analizó en el LPG la presencia de lipopolisacárido (LPS) mediante la prueba de aglutinación de amebocitos de *Limulus*. Mediante tinción de plata para proteínas se analizaron posibles contaminantes protéicos.

5.5 Ensayos de citocinas.

5.5.1 Producción de citocinas en macrófagos estimulados con LPG

Un total de 1×10^6 macrófagos obtenidos de la purificación se estimularon con 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPG de *L. mexicana*. Como control positivo las células se incubaron con 100 ng/ml de lipopolisacárido (LPS) durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se cuantificó la producción de las siguientes citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 e IL-10.

5.5.2 Producción de citocinas en macrófagos preincubados con inhibidores de las MAPquinasas.

Los macrófagos obtenidos se preincubaron con los inhibidores PD98059 (40 μM) (sc-3532) inhibidor de ERK y SB203580 a una concentración de 20 μM (sc-3533) un inhibidor de p38 MAPquina, (ambos inhibidores de Santa Cruz, CA, USA) durante 2 horas. Después de la preincubación con los inhibidores los macrófagos fueron estimulados con LPG de *L. mexicana* y los sobrenadantes fueron colectados después de 24 horas.

5.5.3 Producción de citocinas en macrófagos preincubados con anticuerpos bloqueadores de TLRs.

Los macrófagos fueron pretratados con anticuerpo IgG anti-humano (500 µg/ml) (Aventis Behering GmbH, Marburgo, Alemania) durante 1 hora a 37°C, para saturar los receptores Fc y evitar una unión inespecífica de anticuerpos monoclonales anti-TLR. Posteriormente los macrófagos fueron tratados con anticuerpos monoclonales anti-TLR2 (clona TL2.1) 5µg/ml o anti-TLR4 (clona HTA125) 5 µg/ml durante 1 hora a 37°C, (ambos anticuerpos de Imgenex, Biocarta, San Diego, CA, USA). Una vez transcurrido este tiempo, los macrófagos fueron estimulados con 10 µg/ml de LPG de *L. mexicana* durante 24 horas. Los sobrenadantes de los cultivos fueron cosechados. Como control positivo se utilizó LPS de *E. coli* 0111B4 a 100 ng/ml y LTA (ácido lipoteicoico) de *Streptococcus faecalis* a una concentración de 1 mg/ml.

5.6 Inmunoensayo enzimático estándar sándwich (ELISA)

Para todos los experimentos descritos anteriormente se determinaron las concentraciones de las siguientes citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 e IL-10 de acuerdo a BD-Pharmingen.

Para este tipo de ensayo se utilizaron placas de la marca Costar de 96 pozos de fondo plano tratadas para ELISA. El anticuerpo de captura se colocó en una placa de 96 pozos de fondo plano. Previamente se diluyó cada citocina en un regulador de unión (regulador de fosfato dibásico de sodio 0.1 M a pH 9.0 (Na₂HPO₄) o PBS pH 7.4 según sea el caso para la citocina. El volumen se calculó de acuerdo a la citocina a determinar. Para TNF- α fue de 4 µl/ml, y para IL-12 (p40 y p70 humano) 2 µl/ml, IL-10 1µl/ml e IL- 1 β 1µl/ml. Se colocaron 50 µl de cada stock de citocinas por pozo, la caja se

tapó y se dejó a 4° C por un mínimo de 10 horas. Posteriormente se lavó la placa en un lavador de ELISA EL_x50 con una solución compuesta por PBS y 0.01% de Tween 80. Se bloqueó la placa con solución bloqueadora (NaOH 0.1 N, caseína y PBS pH 7.4), se agregaron 200 µl por pozo y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavó la placa y se colocaron 100 µl de cada una de las concentraciones de la curva estándar y de las muestras y se dejó 2 horas a 4° C. Se lavó la placa y se colocaron 100 µl por pozo del anticuerpo de detección y se incubó durante 1 hora. Se lavó la placa y se agregó Estreptavidina fosfatasa alcalina (GIBCO BRL No. catalogo 19542-018), se incubó durante 30 minutos. Después se lavó la placa y se colocó la solución reveladora compuesta por regulador de sustrato y pNPP (p-Nitro phenylphosphato), se agregaron 100 µl por pozo y se dejó interaccionar a temperatura ambiente y en la obscuridad de 15 a 60 minutos. La placa se leyó por 1h en intervalos de 5 minutos aproximadamente en un lector de ELISA para microplacas (EL 312e BIO TEK INSTRUMENTS a 405 nm), con la ayuda de un programa KC4 para analizar los datos que proporciona las concentraciones de las citocinas de las muestras. Finalmente las concentraciones de cada citocina se expresaron en pg/ml y se graficaron en barras. Los resultados se expresan como la media del error estándar al menos tres experimentos realizados en diferentes días.

5.7 Expresión del RNAm de TLR2 y TLR4

Los macrófagos humanos (1×10^6) fueron estimulados con diferentes concentraciones de LPG de *L.mexicana* (2, 4, 6, 8 y 10 µg/ml) durante 18 horas a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente se lisaron las células con TRIzol y se extrajo el RNA.

A las muestras de macrófagos estimulados se le añadió: Master mix de la QRT-PCR, la enzima RT (Retrotranscriptasa), responsable de la transcripción de ARNm a en las cantidades indicadas por el fabricante.

A continuación los productos de ARNm se amplificaron mediante PCR con cebadores específicos seleccionado sobre la secuencia humana publicada de TLR2 y TLR4. Los primers para TLR2 fueron sentido 5-GCC AAA GTC TTG GAT ATT TGG-3 y antisentido 5-TTG AAG TTC TCC AGC TCC TG-3.

Para TLR4, los cebadores fueron sentido 5 AAG TGG TTG AAC GAA TGG AAT GTG-3 y antisentido 5-ACC AGA ACT GCT ACA ACA GAT ACT-3 (Becker *et al.*, 2003; Chandra y Naik, 2008). La amplificación se realizó usando el kit Super One-Step RT-PCR con Taq Platinum (Life Technologies). Una vez realizado esto se corrieron las muestras obtenidas en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X. Finalmente el análisis densitométrico fue realizado mediante el registro de la intensidad de las bandas con un Analizador de multi-Imagen. Como control interno se utilizó la β -actina.

5.8 Expresión de TLRs en macrófagos estimulados con LPG de *L. mexicana*

La expresión extracelular de TLR2 o TLR4 se determinó por citometría de flujo. 1×10^6 macrófagos fueron estimulados previamente por LPG de *L. mexicana* durante 18 h se resuspendieron en amortiguador de bloqueo (PBS, 5 mM de EDTA y 0,1% de azida de sodio) y se incubaron en hielo durante 30 min. La suspensión celular se centrifugó y se marco con anticuerpo anti-TLR2 humano (sc-21759, Santa Cruz de Biotecnología) y anti-TLR4 humano (sc-13593, Santa Cruz de Biotecnología). Las células se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad, se lavaron dos veces con buffer de lavado. Las células fueron analizadas por citometría de flujo (FACSCanto II, Becton-Dickinson, San

José, CA) y se analizaron con el software DIVA (BD). Los resultados se presentan como intensidad media de fluorescencia (MIF).

5.9 Ensayos de fosforilación

5.9.1 Análisis de la fosforilación de ERK y p38 MAPquinasas

Los macrófagos de sujetos sanos fueron incubados con 10 µg/ml de LPG de *L. mexicana* a diferentes tiempos para realizar una cinética de fosforilación (5, 10, 15 y 30 min) y posteriormente realizar el Western-blot.

5.9.2 Análisis del efecto de los inhibidores en la fosforilación de macrófagos estimulados con LPG

Los macrófagos fueron preincubados con inhibidores específicos PD98059 (40 µM) (sc-3532), inhibidor de ERK, y SB203580 un inhibidor de p38 MAPcinasa, a una concentración de 20 µM (sc-3533) durante 2 horas. Posteriormente, las células fueron estimuladas con 10µg/ml de LPG de *L. mexicana* a 10 y 15 minutos respectivamente. Después se realizaron los ensayos de Western-blot.

5.9.3 Análisis del efecto de anticuerpos bloqueadores en la fosforilación de macrófagos estimulados con LPG.

Para analizar si el LPG de *L. mexicana* activa TLR2 y TLR4 se realizaron ensayos de fosforilación donde los macrófagos fueron preincubados con anticuerpos bloqueadores anti-TLR2 (clon TL2.1) 5 µg/ml o anti-TLR4 (clona HTA125) 5 µg/ml (Alvarez-Arellano *et al.*, 2007), durante 1 hora a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, los macrófagos

fueron estimulados con 10 µg/ml de LPG de *L. mexicana* durante 10 y 15 min, después del tiempo de interacción los sobrenadantes del cultivo fueron cosechados.

Para todos los ensayos descritos previamente la cantidad de macrófagos utilizados fue 1×10^6 . Después del tiempo de interacción las células se lavaron con PBS y se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 rpm. Posteriormente se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en amortiguador de lisis RIPA modificado que es una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas que contiene Tris-HCl, pH 7.4 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaF 10 mM, NP-40 1%. Para lisar las células se colocaron 30 µl de amortiguador por 1 millón de células, durante 15 o 20 minutos en vortex-hielo. Se observó la lisis de los monocitos al microscopio usando azul de tripano y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm a 4° C durante 10 minutos. El paquete celular se desechó y del sobrenadante se hicieron alícuotas que se guardaron a -70° para posteriormente determinar la proteína.

Para la determinación de proteína de sobrenadantes se utilizó el método de DC reacción colorimétrica compatible con detergente (Biorad) y los datos fueron extrapolados en una curva estándar de albumina sérica bovina (BSA). Como blanco se utilizó el amortiguador de lisis RIPA modificado y se determinó la concentración de proteína con 5 µl de muestra. Cada una de las condiciones se realizó por duplicado. La placa se dejó reposar por 15 minutos y se leyó a 650 nm en el lector de ELISA (BIO-TEK Instruments), los datos se analizaron en el programa KC4 v 2 para obtener las concentraciones de proteína en pg/ml.

5.10 Western-blot

Para todos los experimentos mencionados anteriormente las muestras obtenidas de los extractos de los macrófagos se ajustaron a la misma concentración de proteína y posteriormente se les agregó amortiguador 2 x (Glicerol, amortiguador 6.8, azul de bromofenol, pironina y β -mercaptoetanol), se hirvieron por 3 minutos a 95° C y posteriormente las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% para separar las proteínas y se corrieron a voltaje constante (120 V).

Para la electro transferencia de los geles de acrilamida se utilizaron membranas de PVDF-immobilón (millipore), activadas previamente con metanol durante 3 minutos. La transferencia se realizó en un equipo transblot semi-seco durante 35 minutos a un amperaje constante (0.3 mA/cm²). Una vez transferidas las proteínas la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para verificar que las proteínas se hubieran transferido en su totalidad.

La membrana transferida se bloqueó con 3% de BSA en TBST durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó 4 veces con TBST. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: ERK1/2 (K-23) y p-ERK 1/2 (E-4), MAPp38 (C-20), p-MAPp38 (D-8) todos de la marca Santa Cruz Biotechnology, SA, dilución 1:5000 con 1% de BSA en TBST y se dejaron toda la noche a 4° C en agitación constante. Al día siguiente se retiró el anticuerpo y se lavó la membrana con TBST. Se agregó un segundo anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano a una dilución 1:5000 con 1% de BSA en TBST durante 2 horas a temperatura ambiente. Se desechó el anticuerpo y se lavó durante 2 horas con TBST. Finalmente, a la membrana se le colocó en una solución de sustrato + luminol por 3 minutos y se

reveló por quimioluminiscencia utilizando placas de revelado de la marca Kodak. Posteriormente, las placas fueron analizadas en un analizador de imágenes (Multimage AlphaNotech). Las bandas fueron analizadas por densitometría.

5.12 Análisis de la fosforilación mediante el método de Western-blot por (ODYSSEY LI-COR).

Los extractos de macrófagos fueron estimulados con diferentes concentraciones de LPG de *L. mexicana* (2, 4, 6, 8 y 10 µg/ml). Posteriormente Las proteínas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 15%. Una vez transcurrido este proceso se transfirieron las membranas PVDF-immobilón. Después las membranas se bloquearon con buffer de bloqueo LI-Cor (Lincoln, NE) durante 1 h a temperatura ambiente, se incubaron con anticuerpos específicos para TLR2 (sc-10739) y para TLR4 (sc-30002) y actina (sc-1616) todos de Santa Cruz Biotechnology, CA diluidos en 0,1% de Tween LiCor regulador de bloqueo durante toda la noche a 4 ° C. Posteriormente las membranas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-conejo colorante IR-700 durante 1 h. Las proteínas se analizaron mediante el sistema de imágenes de infrarrojos Odyssey (LI-COR, Lincoln, NE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.13 Análisis de la translocación nuclear de los factores de transcripción AP-1 y NF-κB por ensayos de retardamiento (EMSA).

Los macrófagos (1×10^6) fueron preincubados con inhibidores de ERK y MAP p38 durante 2 horas y posteriormente fueron estimulados con LPG de *L. mexicana* durante 30 min. Una vez transcurrido este tiempo se extrajeron los núcleos mediante la utilización de un kit (Fermentas-life science. cat: K0311). A las muestras obtenidas se les determinó proteína y se corrieron en un gel de acrilamida al 10%, después mediante ensayos de Western-blot las muestras se preincubaron con anticuerpo NF-κB (H-119) sc-7178 para verificar que sólo se tenían extractos nucleares.

Las muestras fueron preincubadas con el kit Odyssey y los oligonucleótidos específicos diseñados para AP-1 y NF-κB durante 20 minutos; después se corrieron las muestras en un gel de poliacrilamida al 4% sin detergentes a temperatura ambiente en oscuridad total a 60 Volts durante 1 hora 40 minutos. Finalmente los geles se analizaron mediante el sistema de imágenes de infrarrojos Odyssey (LI-COR, Lincoln, NE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.14 Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media \pm SEM (error estándar de la media). La evaluación estadística de los valores entre los grupos se realizó mediante la prueba de U Mann-Whitney. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

6. Resultados

6.1 Obtención de monocitos de Sangre Periférica.

El porcentaje de pureza de las células fue analizado por citometría de flujo. En la figura 15 se puede observar el porcentaje de pureza de los monocitos que equivale a un 84.3%. Este experimento representa uno de 4 experimentos que se realizaron a las células purificadas.

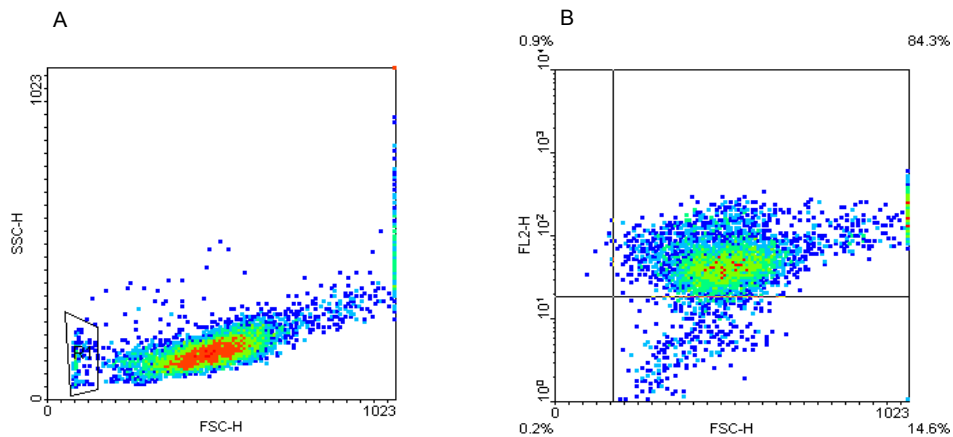


Figura 15. Determinación de la pureza de monocitos de sangre periférica por citometría de flujo. En el panel A se observa la población total obtenida de la purificación marcada con (PE). En el panel B los monocitos se marcaron en una relación 1:4 con el anticuerpo monoclonal anti-CD14 (MACS) humano.

6.2 Análisis del efecto del LPG de *L. mexicana* en la producción de citocinas

Para determinar si el LPG de *L. mexicana* puede inducir la producción de citocinas los macrófagos fueron estimulados con LPG.

Como se observa en la figura 15, los resultados mostraron que el LPG de *L. mexicana* indujo la producción de las citocinas analizadas: TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 e IL-10.

Para el caso de TNF- α los valores obtenidos fueron de 511 ± 53.87 pg/ml (Fig. 16 A); mientras que para IL-1 β se generaron 278 ± 23.24 pg/ml (Fig. 16 B); con respecto a IL-12p40 los valores obtenidos fueron 1067 ± 134.4 pg/ml (Fig. 16 C); de IL-12p70 se produjeron 84 ± 9.2 pg/ml (Fig. 16 D), finalmente para IL-10 fue de 421 ± 56.21 pg/ml (Figura 16 E). Los datos analizados revelan que los macrófagos incrementan considerablemente la producción de TNF- α e IL-12p40 después de ser estimulados con LPG de *L. mexicana* (barras negras) con respecto a los niveles basales (barras blancas). Para todos los casos se observan diferencias significativas entre estas dos condiciones ($P < 0.05$). Como podemos observar los niveles de IL-1 β como de IL-12p70 fueron menores al compararlos con TNF- α , IL-12p40 e IL-10. El control positivo de LPS fue un buen inductor de la producción de las citocinas analizadas siendo mayor el efecto en TNF- α e IL-12p40.

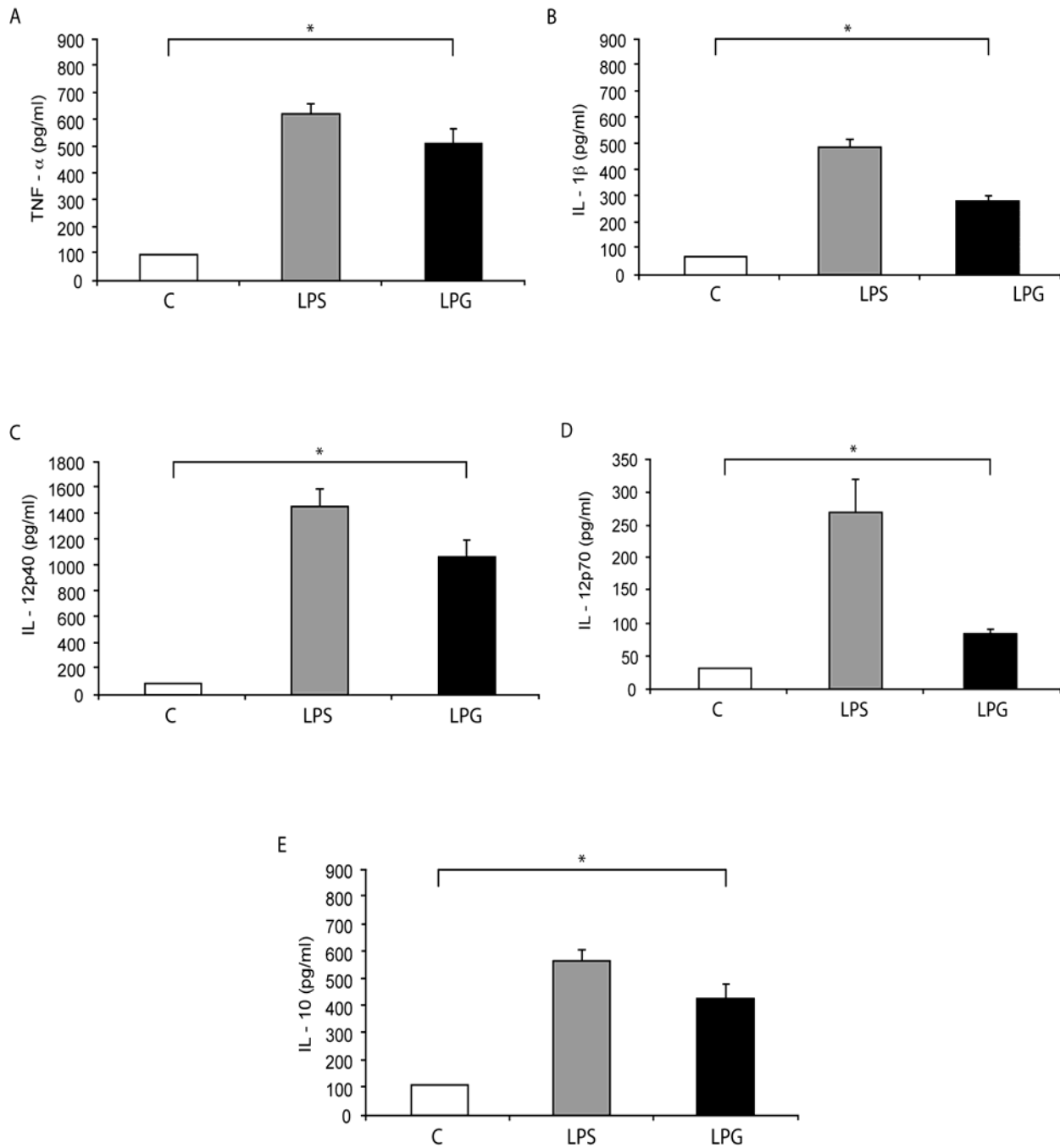


Figura 16. Producción de citocinas inducidas por LPG de *L. mexicana*. 1×10^6 macrófagos se cultivaron en medio RPMI en presencia de LPS (100 ng/ml) y LPG (10 μ g/ml). Después de 24 horas se cuantificó la producción de citocinas mediante ELISA, (A) TNF- α , (B), IL-1 β , (C) IL-12p40, (D) IL-12p70, (E) IL-10. Las barras representan la media \pm SEM de cinco experimentos diferentes. Los asteriscos indican una diferencia significativa con $p < 0,05$. Como se muestra el LPG incrementa la producción de las citocinas.

6.3 Efecto del LPG de *L. mexicana* en la expresión de TLR2 y TLR4

En el presente estudio se analizó el efecto del LPG de *L. mexicana* en la expresión de TLR2 y TLR4 a nivel de RNAm y de la expresión de proteínas. Los macrófagos se incubaron con diferentes concentraciones de LPG (2 a 10 µg / ml). En este trabajo se demostró que todos los tratamientos resultaron en un aumento significativo del RNAm para TLR2 y TLR4 en comparación con las células control sin estímulo (Fig. 17 A). Observamos que la máxima expresión del ARNm para TLR2 y TLR4 así como la presencia de la proteína determinada por Western-blot fue a 10 µg/ml de LPG, que era la concentración máxima probada en nuestro ensayo (Fig. 17 B). La presencia de la proteína de TLR2 y TLR4 se detectó mediante ensayos de citometría de flujo en presencia de proteínas de superficie de los receptores TLR2 y TLR4 donde se observó una expresión máxima a los 4 y 6 µg de LPG para TLR2 y de 6 y 8 para TLR4 (Fig. 17 C).

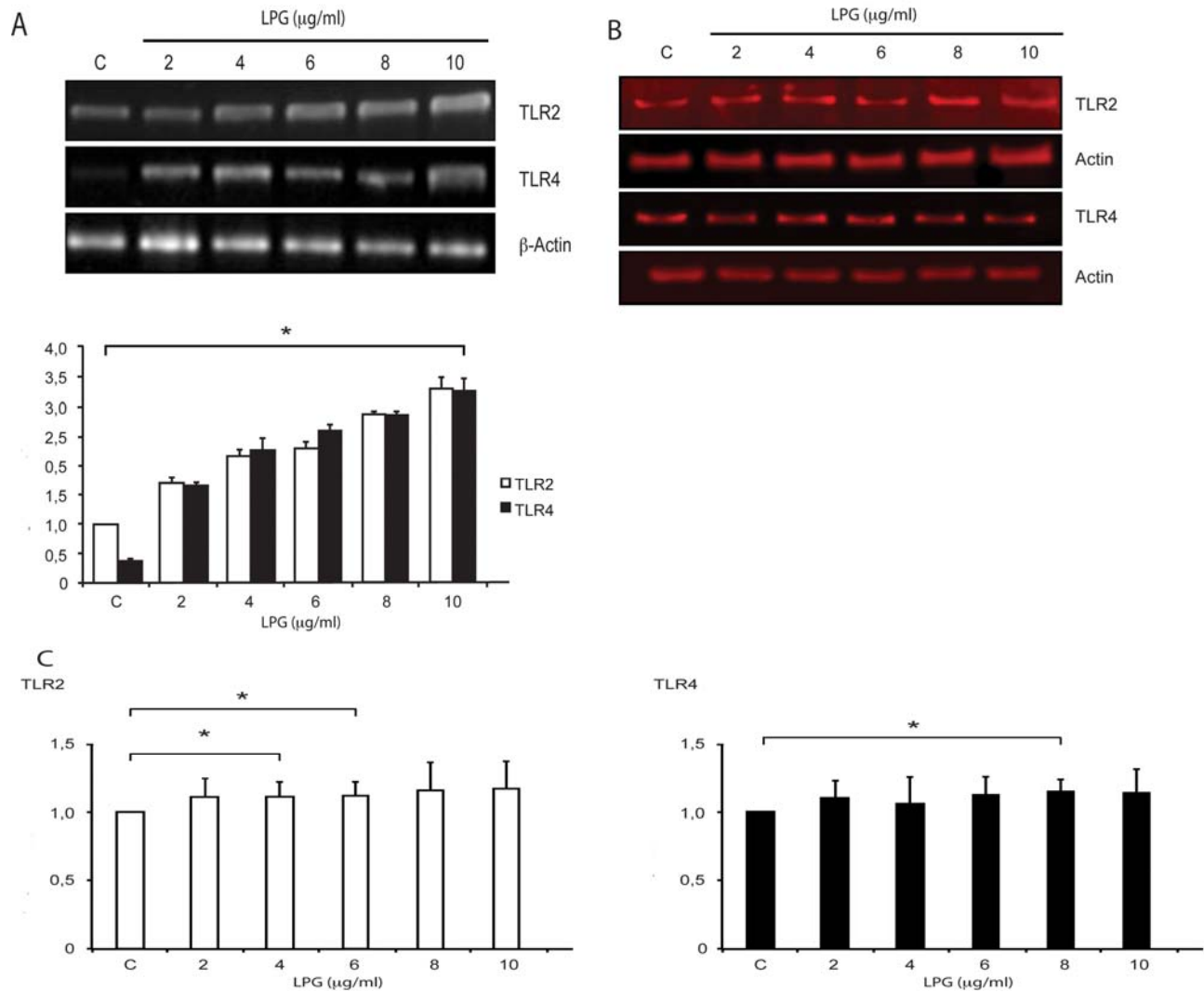


Figura 17. Efecto del LPG de *L. mexicana* en la expresión de RNAm de TLR2 y TLR4. Los macrófagos fueron estimulados con LPG a diferentes concentraciones. Esta imagen es representativa de tres experimentos independientes. El gráfico muestra el análisis de la densitometría del gel y los valores expresan el incremento relativo en SEM en comparación con los macrófagos. (A). Las proteínas se analizaron mediante el sistema Odyssey de imágenes infrarrojas, esta imagen del gel es representativa de tres experimentos independientes (B). Análisis de citometría de flujo de TLR2 y TLR4 (C), la expresión extracelular muestra el aumento relativo que se calculó dividiendo la media de la fluorescencia de las células estimuladas con las macrófagos sin estimular. Los valores se expresan en \pm SEM.

6.4 Participación de TLR2 y TLR4 en la producción de citocinas inducida por LPG

Los resultados previos muestran que el LPG de *L. mexicana* indujo la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70) e IL-10 y la expresión de TLR2 y TLR4. Para correlacionar si esta inducción de citocinas es dependiente de la activación de TLR2 o TLR4, los macrófagos se preincubaron con anticuerpos bloqueadores anti-TLR2 o anti-TLR4 antes de ser estimulados con LPG de *L. mexicana*. Posteriormente, la producción de citocinas fue cuantificada.

En los macrófagos pretratados con anti-TLR2 y anti-TLR4 y estimulados con LPG se observó una disminución en la producción de todas las citocinas analizadas con respecto a los macrófagos incubados sólo con LPG de *L. mexicana*, observandose diferencias significativas entre el control y las condiciones con anticuerpos ($P < 0,05$). Todos los porcentajes de inhibición están calculados considerando como 100% los macrófagos estimulados con LPG y se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis de la producción de citocinas en macrófagos pretratados con anticuerpos bloqueadores TLR2 y TLR4 y estimulados por LPG

Citocinas	Media de la producción en pg/ml	Porcentaje de bloqueo con anticuerpos		
		anti-TLR2	anti-TLR4	anti-TLR2 anti-TLR4
TNF- α	419 \pm 68.19	319/24	223/50	125/70
IL-1 β	250 \pm 10.01	202/19	130/48	87/65
IL-12p40	820 \pm 64.85	564/31	502/38	330/59
IL-12p70	93 \pm 5.85	69/26	64/32	44/52
IL-10	376 \pm 19.60	197/48	163/55	121/68

Promedio de 4 experimentos independientes

La producción de TNF- α disminuyó de 419 a 319 pg/ml lo que corresponde a un 24% de porcentaje de bloqueo con anti-TLR2 y en un 46% con anti-TLR4, con ambos anticuerpos la reducción corresponde al 70% (Fig 18 A). En IL-1 β se observó una disminución de 250 a 202 pg/ml que corresponde al 19% con anti-TLR2, un porcentaje de bloqueo del 48% con anti-TLR4 y del 65% con anti-TLR2 y TLR4 (Fig 18 B). Con respecto a IL-12p40 e IL-12p70 los porcentajes fueron menores al 50% al utilizar los anticuerpos bloqueadores para TLR2 y TLR4 respectivamente, sin embargo cuando se utilizaron ambos anticuerpos bloqueadores la producción de IL-12p40 disminuyó un 59% y para IL-12p70 un 52% (Fig 18 C y 18 D). Finalmente, los valores de IL-10 fueron de 376 a 197 pg/ml proporcional a un 48% para anti-TLR2, de un 55% con anti-TLR4 y para anti-TLR2/TLR4 una reducción del 68% (Fig 18 E).

En todas las condiciones la disminución en la producción de citocinas fue más evidente en los macrófagos que se incubaron con anti-TLR4 seguida de la condición con ambos anticuerpos.

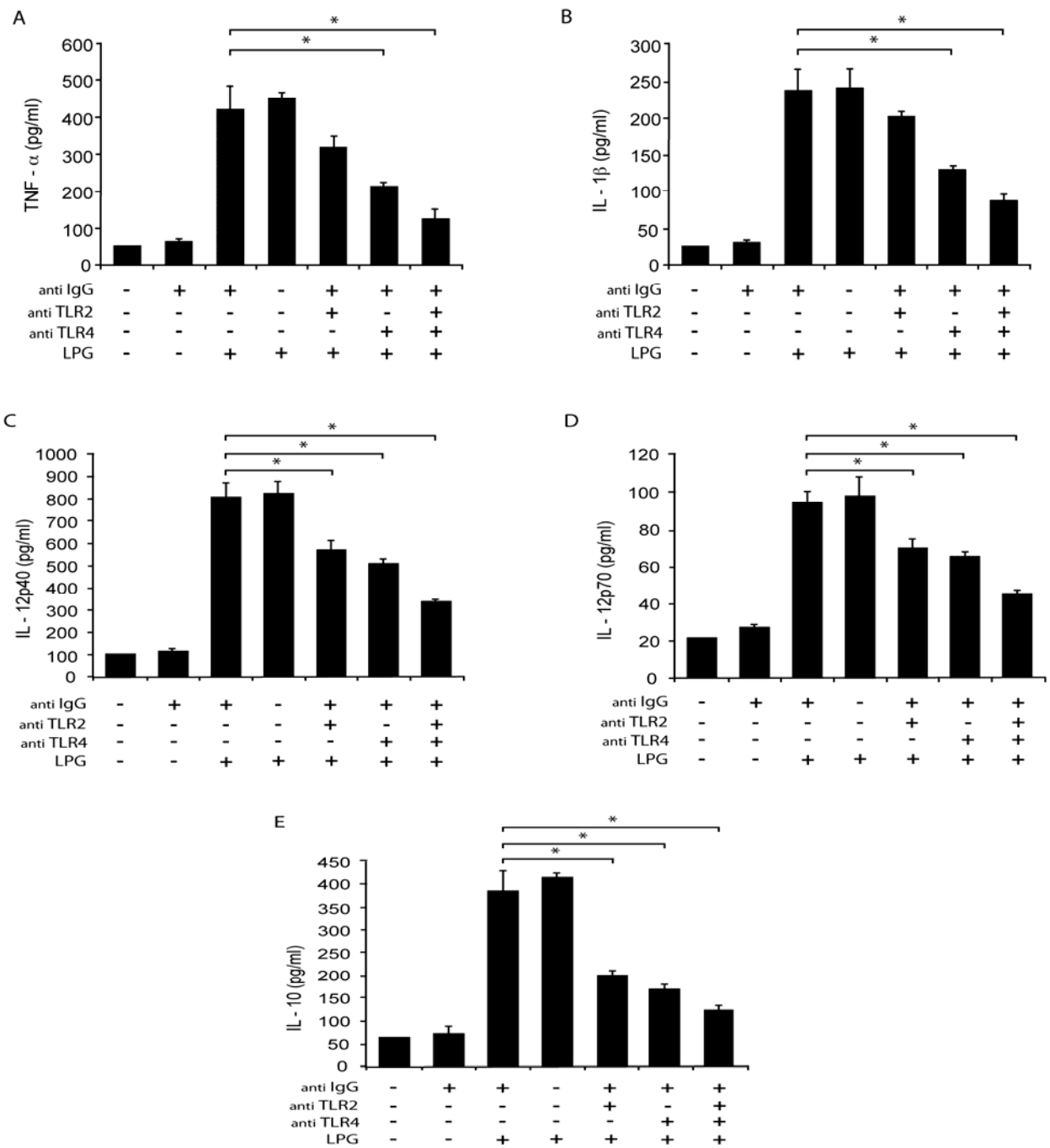


Figura 18. Participación de TLR2 y TLR4 en la producción de citocinas inducida por LPG de *L. mexicana*. Los macrófagos se cultivaron en medio RPMI en presencia de LPG (10 μ g/ml) con o sin pre-tratamiento con anti-IgG, anti-TLR2 (5 μ g/ml), anti-TLR4 (5 μ g/ml). Después de 24 horas se analizó la producción de citocinas por ELISA: TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-12p40 (C), IL-12p70 (D) e IL-10 (E). Las barras representan la media \pm SEM de seis experimentos diferentes. Los asteriscos indican una diferencia significativa de $p < 0,05$, en comparación con las células tratadas con anti-IgG + LPG.

6.5 El LPG de *L. mexicana* induce la fosforilación de ERK y p38 MAP cinasas

Examinamos la activación de ERK y p38 MAP cinasa en macrófagos estimulados con LPG de *L. mexicana*. Los macrófagos se incubaron con 10 µg/ml de LPG a diferentes tiempos (5, 10 y 15 min para ERK y 5, 10, 15 y 30 min para la p38 MAP cinasa). El análisis de Western-blot fue empleado para detectar los niveles de fosforilación. Como se muestra en la figura 19 (A y B), la incubación de los macrófagos con LPG indujo la fosforilación de p-ERK y p-p38 MAP cinasa. Los niveles de fosforilación fueron detectados después de 5 min para ERK y alcanzó un pico máximo de fosforilación a los 10 min (Fig. 19 A). El pico de fosforilación de p38 MAP cinasa se detectó a los 15 min de incubación (Fig. 19 B).

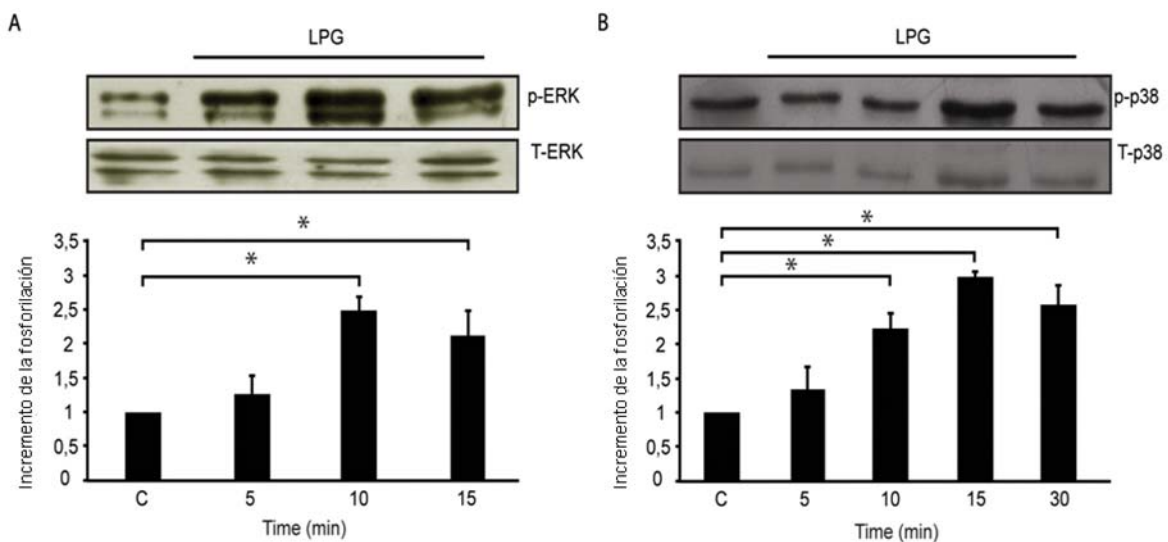


Figura 19. Efecto del LPG de *L. mexicana* en la fosforilación de ERK y p38 MAP. Los macrófagos se cultivaron en medio RPMI en presencia o ausencia de 10 µg/ml de LPG a 5, 10 y 15 min para p-ERK y 5, 10, 15 y 30 min para p38. Los extractos celulares se prepararon y los niveles de fosforilación de ERK y p38 MAP cinasa fueron detectados por ensayos de Western-blot utilizando anticuerpos específicos para (A) p-ERK y T-ERK y (B) p-p38 MAP cinasa y T-p38 MAP cinasa. Los asteriscos indican una diferencia significativa con $p < 0,05$, en comparación con las células no tratados con LPG.

Posteriormente se quería evaluar si la fosforilación de ambas cinasas era dependiente del LPG de *L. mexicana*, para lo cual se utilizaron inhibidores específicos de estas cinasas. Los macrófagos fueron preincubados durante 2 horas, ya sea con el inhibidor de ERK (PD98059) o el inhibidor de p38 MAP cinasa (SB203580) o ambos inhibidores, e inmediatamente después se estimularon con 10 µg/ml de LPG de *L. mexicana* durante 10 minutos para la detección de p-ERK y 15 minutos para la detección de p38 MAP cinasa (Fig. 20 A-B). Se muestran las proteínas totales así como el análisis densitométrico de la fosforilación de ERK y p38 MAP cinasa. Los resultados mostraron que el inhibidor de ERK fue capaz de reducir considerablemente la fosforilación en macrófagos estimulados con LPG + PD98059; sin embargo, en la condición de macrófagos incubados con LPG+ SB203580 se incrementa considerablemente la fosforilación (Fig. 20 A).

Del mismo modo, la fosforilación de p38 MAP cinasa inducida por LPG fue disminuida por el inhibidor de la de p38, pero con el inhibidor de ERK aumenta la fosforilación (Fig 20 B). También se observó el efecto de ambos inhibidores en macrófagos estimulados con LPG, lo que resultó en una disminución de la fosforilación de ERK con respecto a los macrófagos estimulados con el LPG. Para p38 MAP cinasa se observó que esta fosforilación disminuye al utilizar ambos inhibidores en comparación con los macrófagos estimulados con LPG + SB203580 (Fig. 20 B carril 5). En la figura 20 A y B en el primer carril se muestran los macrófagos sin estímulo. Como control los macrófagos fueron estimulados solo con los inhibidores. El vehículo en el que ambos inhibidores se disolvieron fue dimetilformamida (DMF).

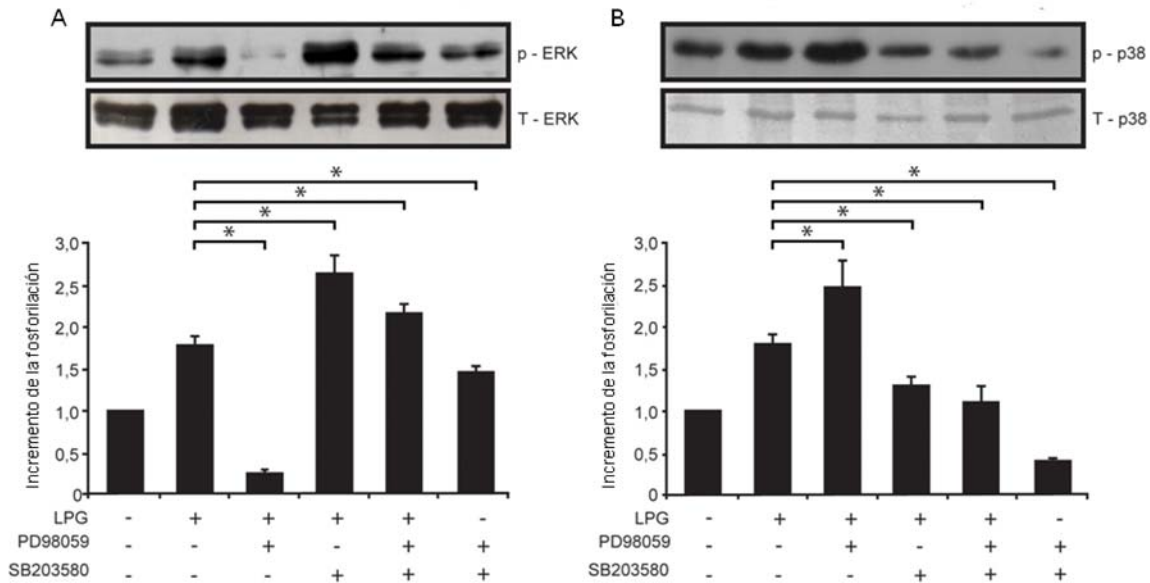


Figura 20. Inhibición de la activación de ERK y p38 MAP cinasa. Los macrófagos fueron pretratados con PD98059 40 μ M (un inhibidor de ERK) o SB203580 20 μ M (un inhibidor de la p38) durante 2 horas (las células control no se trataron previamente) y se incubaron con 10 μ g/ml de LPG 10 min para p-ERK (A) y 15 de min para p-p38 MAP cinasa (B). Los niveles relativos de fosforilación de ERK y la p38 se midieron por análisis densitométrico, y los valores representan la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. Los asteriscos indican una diferencia significativa con $p < 0,05$, en comparación con las células tratados con LPG.

6.7 La inhibición de ERK y p38 MAP cinasas disminuye la producción de citocinas inducidas por LPG

ERK y p38 MAP cinasa son vías importantes para la producción de citocinas. Se evaluó si la inhibición de la ERK o p38 MAP cinasas afectaba la producción de estas citocinas en respuesta a la estimulación de los macrófagos con LPG de *L. mexicana*. El LPG fue capaz de inducir la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, 1L-12p70 e IL-10 (Fig. 21, A - E, barra de color negro). Los macrófagos se preincubaron durante 2 horas con PD98059 (un inhibidor de ERK) o con SB203580 (inhibidor de MAPp38) y posteriormente se estimularon con LPG. Los macrófagos preincubados tanto con

PD98059 como con SB203580 mostraron una disminución en la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-12p40 e IL-10. Sin embargo aunque se presento una disminución en la producción de IL-12p70 esta no fue significativa. No obstante el efecto de inhibición fue mayor en los macrófagos preincubados con PD98059, en relación con los macrófagos preincubados con SB203580. Los porcentajes de inhibición para ambos inhibidores se muestran en la tabla 2 considerando como 100% la condición de macrófagos estimulados solo con LPG. Los valores de inhibición en cada citocina se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Efecto de los inhibidores de ERK / p38 MAP cinasas en la producción de citocinas en macrófagos estimulados con LPG

Citocina	Media de la producción(pg/ml)	Porcentaje de inhibición (%)	
		PD98059 (40 μ M)	SB203580 (20 μ M)
TNF- α	389 \pm 53.87	211/ 45	318/ 18
IL-1 β	278 \pm 32.61	140/ 50	172/ 38
IL-12p40	898 \pm 69.01	599/ 33	801/ 10
IL-12p70	155 \pm 31.51	119/ 23	130/ 16
IL-10	631 \pm 41.50	307/ 51	490/ 22

Media de seis experimentos diferentes

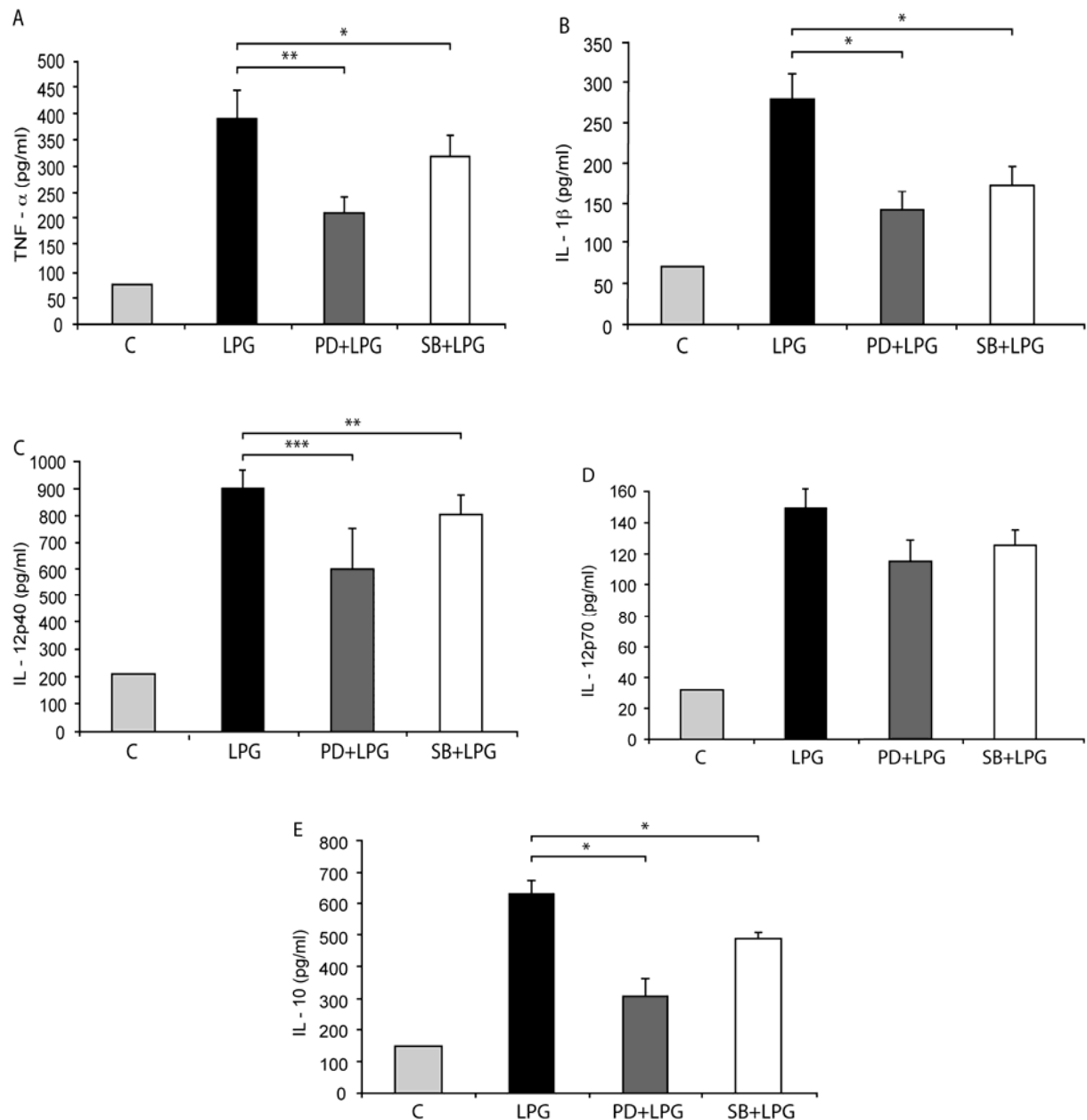


Figura 21. Inhibición de ERK y p38 MAP cinasa. Los macrófagos se cultivaron en medio RPMI en presencia de 40 μ M PD98059 o 20 μ M SB203580 y LPG (10 μ g/ml). Las células control se trataron sólo con LPG. Después de 24 horas. La producción de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-12p40 (C), IL-12p70 (D) e IL-10 (E) se analizó por ELISA. Las barras representan la media \pm SEM de seis experimentos diferentes. Los asteriscos indican una diferencia significativa. Un asterisco p < 0,05, dos asteriscos p < 0,01 tres asteriscos p < 0,001 en comparación con las células tratadas sólo con LPG.

6.8 Activación de ERK y p38 inducida por LPG está mediada por TLR2 y TLR4

Estudiamos el posible papel de TLR2 y TLR4 en la fosforilación de ERK y p38 en macrófagos después de la estimulación con LPG de *L. mexicana*. Los macrófagos se pre-incubaron con anticuerpos anti-TLR2 o anti-TLR4 y se estimularon con LPG de *L. mexicana*. A continuación la fosforilación de ERK y p38 se detectó por Western-blot.

Observamos una disminución en la fosforilación de ERK cuando los macrófagos se pre-incubaron con los anticuerpos anti-TLR2, anti-TLR4, o ambos anticuerpos en comparación con los macrófagos estimulados sólo con LPG (Fig. 22 A y B). De manera similar cuando los macrófagos se pre-incubaron con los anticuerpos anti-TLR2 o anti-TLR4 se observó una disminución significativa en la fosforilación de p38. Al utilizar ambos anticuerpos anti-TLR2 y anti-TLR4, la fosforilación de p38 cinasa fue completamente inhibida (Fig. 22 C y D carril 6).

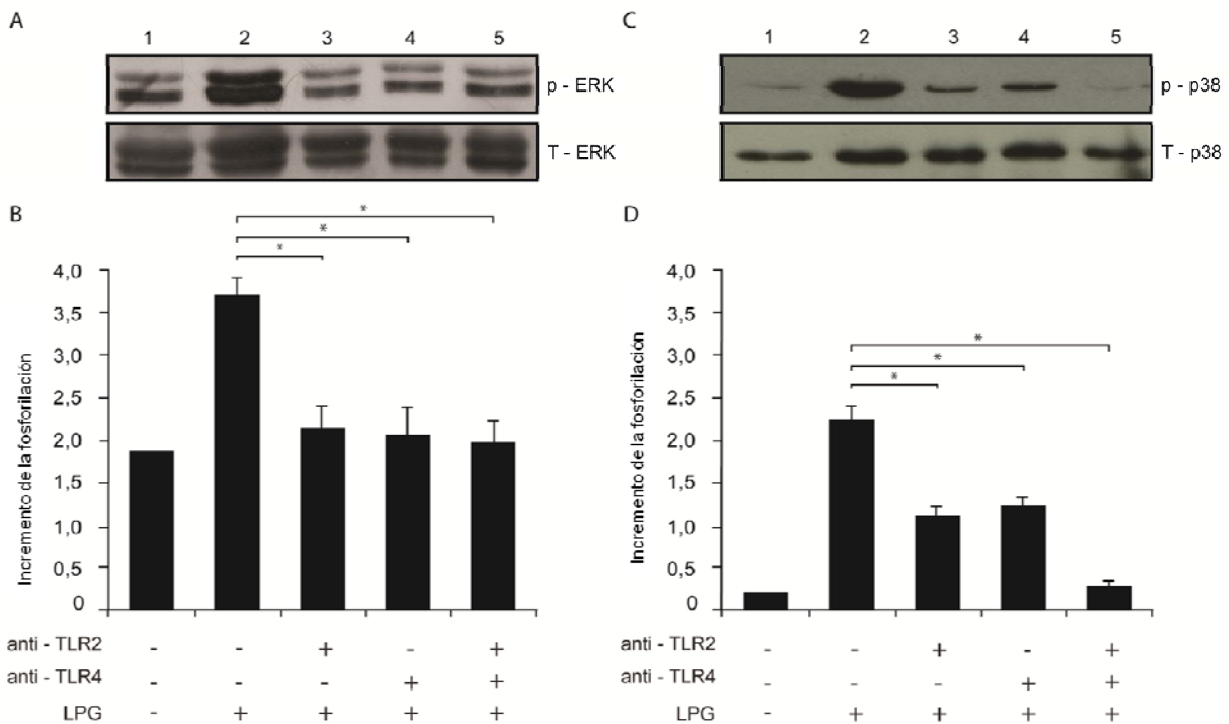


Figura 22. La activación de la ERK y p38 inducida por LPG está mediada por TLR2 y TLR4. Los macrófagos se cultivaron en medio RPMI en presencia de LPG (10 µg/ml) con o sin pre-tratamiento con anti-TLR2 (5 µg/ml) o anti-TLR4 (5 µg/ml). Se evaluaron los niveles de fosforilación mediante Western-blot para (A) p-ERK y T-ERK y (B) p-p38 y T-p38. Los niveles de fosforilación de ERK y p38 MAP cinasa se midieron por análisis densitométrico y los valores representan la media ± SEM de cuatro experimentos independientes. Los asteriscos indican una diferencia significativa con $p < 0.05$, en comparación con las células tratados con LPG.

6.9 Análisis de la translocación nuclear de los factores de transcripción AP-1 y NF-κB en macrófagos estimulados con LPG.

Existe evidencia de que en enfermedades como la leishmaniasis la inhibición en la secreción de las citocinas puede estar regulada por la baja o nula translocación de NF-κB y AP-1 al núcleo. Partiendo de estos antecedentes queríamos analizar los posibles factores de transcripción involucrados en las vías de señalización de los TLRs y MAPcinasas; debido a que los factores son fundamentales para la producción de algunas citocinas proinflamatorias analizadas durante este estudio. Los macrófagos

fueron preincubados con los inhibidores específicos de las MAPcinasas ERK y p38 y estimulados durante 30 min con LPG y LPS (control positivo) (Fig 23). La proteína obtenida de los extractos nucleares se utilizó para realizar los ensayos de Western-blot y ensayos de EMSA para los factores de transcripción AP-1 y NF-κB.

Primero se realizó la técnica de Western blot para detectar la presencia de NF-κB p65 (Fig 23) en las fracciones nucleares de los macrófagos. En la condición sin estímulo no se observaron la translocación nuclear de NF-κB proteínas, sin embargo, en macrófagos estimulados con LPS y LPG se detectó la presencia de NF-κB.

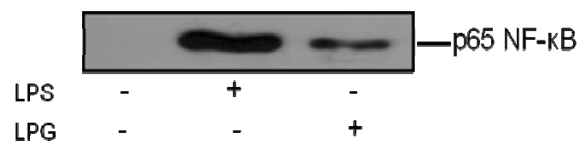


Figura 23. Identificación de NF-κB p65 de las fracciones nucleares de macrófagos estimulados con LPG durante 30 minutos. Como control positivo se utilizó LPS 100 ng/ml. Posteriormente las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10%.

Para los ensayos de retardo de movilidad electroforética los extractos nucleares de macrófagos preincubados con inhibidores de las cinasas ERK y p38 estimulados con LPG fueron incubados con el kit EMSA Odyssey durante 10 minutos con los oligonucleótidos específicos para AP-1 y NF-κB. Una vez transcurrido este tiempo las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 5% sin SDS (Figura 24 A y B). Como se observa en la figura 24, los estímulos de LPS y LPG fueron capaces de inducir una translocación nuclear de AP-1; sin embargo en las condiciones de los macrófagos preincubados con inhibidores PD98059 y SB203580 estimulados con LPG no se observa la presencia de proteínas en el núcleo para el caso de AP-1. Para el

caso de NF- κ B observamos que existe una presencia de proteínas nucleares para todas las condiciones siendo más evidente en macrófagos estimulados con LPG.

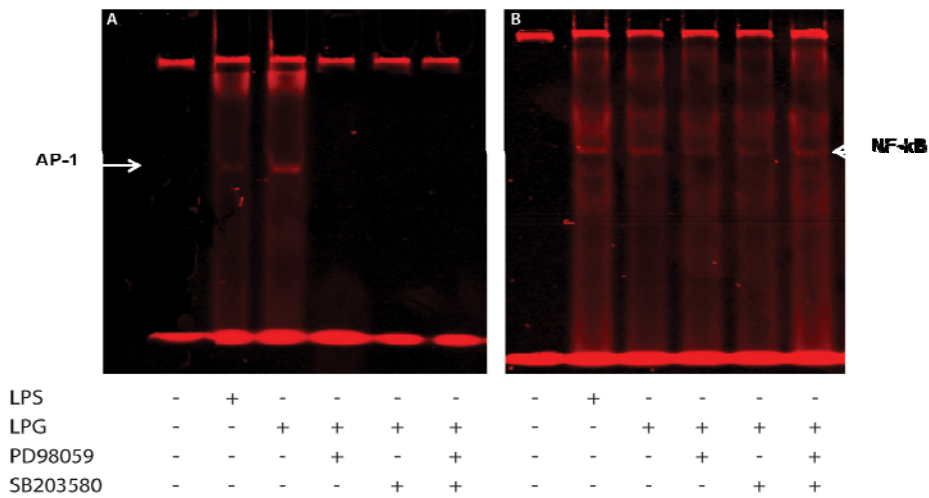


Figura 24. Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA). Se estimularon los macrófagos durante 30 min con 10 μ g/ml de LPG y 100 ng/ml de LPS. La imagen muestra la translocación nuclear. Sólo se observa la imagen de la proteína nuclear de AP-1 (A) con LPS y LPG, los macrófagos con los inhibidores de ERK y p38 y estimulados con LPG no presentan este efecto. Para el caso de NF- κ B (B) se observa una translocación nuclear en las cinco condiciones.

7. Discusión

Leishmania es un parásito protozoario intracelular que reside principalmente en fagocitos mononucleares. La infección en los macrófagos se inicia en la fase de promastigote. Estudios previos realizados en la última década han demostrado que la composición de la superficie del glicocalix del promastigote está constituido por distintas moléculas como glicoproteínas (GPI), glicolípidos, proteofosfoglicanos y lipofosfoglicanos (LPG), (Naderer *et al.*, 2004). Se sabe que la interacción de los parásitos de *Leishmania* con los macrófagos puede afectar las señales intracelulares y modular distintas vías de señalización, como consecuencia de ello el parásito puede sobrevivir dentro de los macrófagos infectados. Los diferentes mecanismos

inmunológicos que monta el hospedero contra el parásito de *Leishmania* (Sacks y Noben-Trauth, 2002), así como una variedad de receptores implicados en las interacciones macrófago/parásito de las diversas especies de *Leishmania* aun siguen siendo investigados (Mosser y Edwards, 2008).

En este trabajo se demuestra que el LPG de *L. mexicana* tiene efectos sobre la activación de macrófagos humanos.

La activación de ERK y p38 MAP cinasa es consecuencia de la interacción de diversos receptores de superficie con sus respectivos ligandos. Estas cinasas juegan un papel importante en la modulación de diversos procesos biológicos, como el inicio de una respuesta inflamatoria a través de la regulación de las citocinas proinflamatorias (Cobb, 1999). *Leishmania* puede modular diversas citocinas que son fundamentales para la patogénesis y la supervivencia del parásito (Olivier et al., 2005).

En el presente estudio determinamos la secreción de citocinas proinflamatorias en macrófagos estimulados con LPG de *L. mexicana*. El LPG indujo la secreción de TNF- α , así como de IL-12p40. Esto concuerda con los valores reportados en pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y difusa (LCD) donde se demuestra que monocitos de pacientes con LCL y LCD aumentan significativamente la producción de TNF- α e IL-12p40 cuando son estimulados con LPG (Carrada et al., 2007), este mismo fenómeno se presenta en monocitos y células dendríticas de sujetos sanos (Argueta-Donohue et al., 2008). Por otro lado, promastigotes de *L. panamensis* también promueven la secreción de TNF- α (Gallego et al., 2011).

El TNF- α se ha estudiado ampliamente en el modelo murino de la leishmaniasis, donde se ha demostrado que participa en la inducción de intermediarios reactivos de oxígeno y óxido nítrico (NO), que conduce a la activación de los macrófagos y como consecuencia un control limitado de la replicación del parásito de *Leishmania* (Wilhelm *et al.*, 2001). Otra de las citocinas analizadas fue IL-12 que es muy importante porque es capaz de activar a los linfocitos T vírgenes y favorecer una respuesta tipo Th1.

La IL-12 es una proteína formada por una cadena ligera de 35 kDa (conocida como p35 o IL-12a) y una cadena pesada de 40 kDa (conocida como p40 o IL-12b) unidas por un puente disulfuro. La subunidad p40 puede encontrarse extracelularmente como monómero (IL-12p40) o formando homodímeros (IL-12(p40)₂). La subunidad p35 no es secretada en forma de monómero. Las dos subunidades forman el heterodímero IL-12p70. La subunidad p40 es producida por macrófagos y CD, los cuales producen la IL-12p70, que es la molécula con actividad biológica (Abdi, 2002; Klinke, 2006).

En el modelo murino de leishmaniasis, se ha demostrado que los ratones C57BL/6 son resistentes a la infección por *L. major* y los ratones BALB/c son susceptibles (Sacks y Noben-Trauth, 2002) se sabe que la respuesta dada por la IL-12 favorece la resistencia a esta enfermedad. Otros autores reportaron que macrófagos murinos RAW264.7 infectados con promastigotes de *L. donovani* suprimen por completo la producción de IL-12p70, sin embargo cuando se utiliza el LPG de *L. donovani* esta molécula es capaz de inducir la producción de dicha citocina (Srivastav *et al.*, 2012).

Nuestros resultados muestran que la secreción de IL-12p40 en macrófagos humanos estimulados con LPG de *L. mexicana* es considerablemente mayor con respecto a la producción de IL-12p70. Esto concuerda con lo reportado en ratones infectados con *L. major* donde se observa que los niveles de IL-12p70 son mínimos (Guler *et al.*, 2011).

La producción IL-12p40/p70 óptima es necesaria para conducir un predominio Th1 que produzca IFN- γ que genere NO, para erradicar al parásito. De alguna manera *Leishmania* logra inhibir este equilibrio entre citocinas.

Nuestros resultados también señalan que el LPG de *L. mexicana* es capaz de inducir la secreción de IL-1 β . Se ha correlacionado la secreción de IL-1 β con actividades antimicrobianas contra bacterias y parásitos *in vitro* e *in vivo* (Shio *et al.*, 2012). También se ha demostrado que la secreción adecuada IL-1 β reduce la leishmaniasis mediante la generación de una respuesta inflamatoria mediada por células T en los tejidos afectados. IL-1 β inicia y propaga la inflamación mediante la inducción de la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y leucocitos (Kostka *et al.*, 2006). Otro estudio señala que ratones knockout que carecen de IL-1 β generan mayor infección de *Leishmania*. En nuestro trabajo también observamos que la secreción de IL-10 es elevada. La secreción de esta citocina se correlaciona con la progresión de la enfermedad en pacientes con leishmaniasis cutánea (Louzir *et al.*, 1998). Se ha descrito que *Leishmania* modifica la respuesta del hospedero mediante la exacerbación de efectos antiinflamatorios por la producción de IL-10 (Kane y Mosser, 2001), también suprime las funciones de los macrófagos así como la producción de IL-1 β (Karam *et al.*, 2007). Es importante destacar que en nuestro trabajo solo analizamos la actividad de una sola molécula y no del parásito completo, ya que como lo reportan en otro estudio los promastigotes de *L. donovani* suprimen con éxito la producción de IL-12p40 e IL-10 en la línea celular monocítica THP-1, a pesar de que los promastigotes llevan en su superficie moléculas de LPG (Chandra y Naik, 2008). Esto es relevante ya que una adecuada secreción de IL-12 favorece la secreción de IFN- γ por células NK

que son importantes para la activación de macrófagos. Estos y otros estudios apuntan a que existen otros factores en la regulación de la respuesta inmune contra el parásito, como la secreción de IL-10 a favor de este patógeno intracelular. La secreción adecuada de citocinas proinflamatorias es fundamental en la infección por *Leishmania*, así como los receptores que pueden inducir la producción de estas. En los últimos años se ha tenido un especial interés sobre el papel que pueden jugar los receptores TLRs en la infección por *Leishmania*, debido a que la superficie de los macrófagos presenta una variedad de estos receptores que, después de la interacción contra este patógeno, podrían desencadenar diversas señales que activan varias cascadas de proteínas relacionados con la expresión de genes (Tuon *et al.*, 2008). Varios estudios han señalado el reconocimiento de moléculas derivadas de *Leishmania* por diferentes TLRs (Becker *et al.*, 2003; de Veer *et al.*, 2003; Flandin *et al.*, 2006). La expresión de TLR2 en células NK estimuladas con LPG de *L. major* ya ha sido reportado. Sin embargo esta es la primera descripción en macrófagos humanos estimulados con LPG de *L. mexicana* donde observamos la expresión tanto TLR2 como TLR4 a nivel de ARNm, así como la expresión de proteína y TLRs en membrana. Existen evidencias que en *L. chagasi* y *L. major* existe una expresión de estos receptores lo que indica que podrían estar potencialmente involucrados con el reconocimiento del parásito de *Leishmania* (Becker *et al.*, 2003; Flandin *et al.*, 2006) Además hemos correlacionado la expresión de TLR2 y TLR4 con la producción de citocinas. El LPG de *L. mexicana* indujo la producción de citocinas proinflamatorias, sin embargo cuando se utilizan previamente anticuerpos bloqueadores de los receptores TLR2 y TLR4 esta secreción disminuye de manera parcial en todos los casos para TLR2 y de manera significativa para TLR4, no obstante este efecto es más evidente

cuando se preincubaban las células con ambos anticuerpos, ya que la secreción de citocinas disminuye considerablemente. Esto se confirma con estudios similares donde LPG de *L. major* induce la secreción de las citocinas IL-12 y TNF- α a través de la activación de TLR2 (de Veer *et al.*, 2003). Sin embargo, el papel desempeñado por estos receptores en las distintas especies de *Leishmania* sigue siendo poco claro. Por ejemplo Cezario y cols encontraron una correlación positiva, en la fase inicial de la infección, y los niveles de NO así como en la expresión de TLR2 y TLR4 en ratones infectados con *L. chagasi* (Cezario *et al.*, 2011). Así mismo, estudios similares reportan que el mLPG (LPG de membrana) de *L. major* es un potente inductor de citocinas, y que al utilizar un anticuerpo bloqueador para TLR2 la producción de IL-12 se inhibe parcialmente (Kavoosi *et al.*, 2009). Como consecuencia de la activación de TLRs se ha demostrado que *Leishmania* puede modular algunas proteínas cinasas de la cascada de las MAPquinasas. Estudios previos realizados en macrófagos murinos mostraron que promastigotes de *L. donovani* inducen la fosforilación temporal de ERK y p38 (Prive y Descoteaux, 2000). Otros autores reportan que el LPG de *L. donovani* indujo activación de ERK, p38 y JNK en una línea celular de macrófagos (Balaraman *et al.*, 2005). Por otro lado se compararon los efectos de promastigotes de *L. donovani* y *L. major* en la fosforilación de MAP cinasas en macrófagos RAW264.7 y se encontró que las dos especies de *Leishmania* tuvieron efectos similares induciendo una rápida fosforilación de ERK y p38 (Ben-Othman *et al.*, 2008). En nuestro trabajo confirmamos que el LPG de *L. mexicana* indujo la activación de ERK y p38 en tiempos muy cortos. La adecuada activación ERK y p38 puede representar un punto clave en el desarrollo de la enfermedad y la posible eliminación del parásito. Para demostrar la importancia de la activación o inhibición de las cinasas, el uso de inhibidores farmacológicos ha resultado

ser una herramienta muy útil, trabajos previos que utilizan inhibidores selectivos de ERK (PD98059) y p38 (SB203580) demuestran que mientras que p38 juega un papel esencial en la inducción de NO, ERK parece estar más involucrado en suprimir la producción de IL-12, en respuesta a LPS (Feng *et al.*, 1999). Se ha demostrado que PD98059 se une a formas inactivas MEK1 y evita la posterior activación de las cinasas. El inhibidor SB203580 es un pirimidazol que se une con una alta afinidad a p38 cerca del sitio de unión a ATP, haciendo así que la cinasa p38 este inactiva. Nuestro trabajo reporto el efecto de estos inhibidores. El LPG induce una fosforilación temprana, el uso de estos inhibidores disminuye de manera significativa esta activación y hay una disminución parcial en la producción de todas las citocinas analizadas en este trabajo siendo más significativa al usar el inhibidor de ERK, esto concuerda con nuestros datos obtenidos previamente en los experimentos de fosforilación de las cinasas, con lo que comprobamos que el LPG activa estas cinasas y además regula la secreción de citocinas proinflamatorias. Por otro lado, para poder entender cómo se inicia esta cascada de activación nos planteamos la posibilidad de que LPG estuviera activando a TLR2 y TLR4. Mediante el uso de anticuerpos bloqueadores específicos de TLRs demostramos que el LPG disminuye la activación de ERK y p38 cuando se utilizo anti-TLR2, sin embargo esta disminución fue mucho más evidente al utilizar anticuerpos anti-TLR4. Nuestros datos concuerdan con lo reportado por Shweash y cols donde señalaron que promastigotes de *L. mexicana* en macrófagos deficientes de TLR2 y TLR4, o ambos disminuían ligeramente la fosforilación de p38 en macrófagos deficientes de TLR2^{-/-}. Sin embargo, en macrófagos deficientes de TLR4^{-/-} la fosforilación de las tres MAP cinasas se observa afectada considerablemente, para el caso de ERK y JNK la fosforilación fue abolida (Shweash *et al.*, 2011). Lo que confirma

nuestras observaciones previas. Con estos datos comprobamos que TLR2 /TLR4 pueden intervenir en la señalización de ERK y p38. Sin embargo existen evidencias de que el TLR2 puede jugar un papel regulador durante la infección con *L. braziliensis* (Vargas-Inchaustegui *et al.*, 2009). Nosotros concluimos en este trabajo que el LPG tiene un efecto sobre la fosforilación de ERK y p38 que influye en la secreción de citocinas y que pueden estarse activando los receptores TLR2 y TLR4. La producción diferencial de citocinas proinflamatorias ejercida por el parásito de *Leishmania* juega un papel fundamental en el desarrollo de la curación o cronicidad de la enfermedad (Del Vecchio *et al.*, 2007; Sharma y Singh, 2009).

Finalmente para poder determinar los factores de transcripción que activan como consecuencia de las señales provenientes de las vías de MAP cinasas o TLRs en macrófagos estimulados con LPG de *L. mexicana* se analizó la participación de AP-1 y NF- κ B. Está bien establecido que la activación de AP-1 y NF- κ B, se origina como resultado de la participación de varios receptores de superficie activados por diferentes ligandos extracelulares; esta activación por lo general implica la participación de las MAPcinasas (Karin *et al.*, 1997; Adams y Sweatt, 2002). El factor de transcripción NF- κ B está implicado en la regulación de la iNOS y la producción de IL-12. Las MAP cinasas proporcionan nuevos blancos potenciales de la inmunomodulación terapéutica.

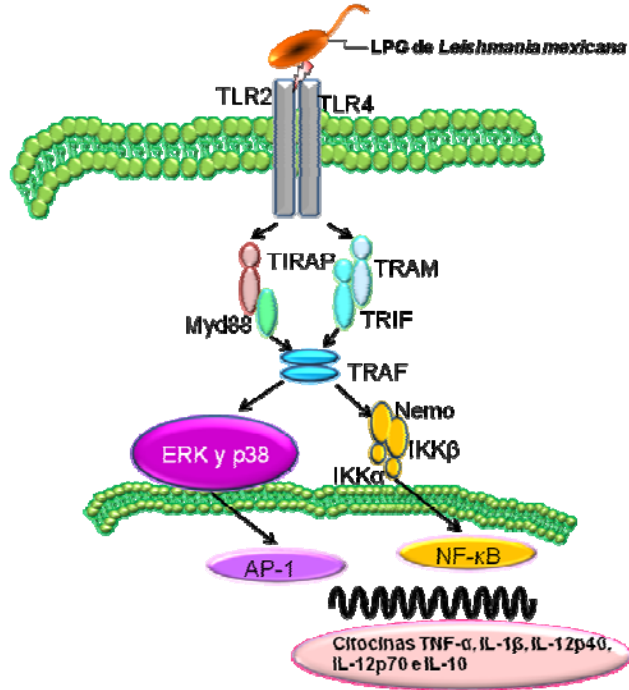


Figura 25. Posible mecanismo por el cual el LPG modifica la respuesta inmune en el macrófago. En el esquema se muestra como el LPG de *L. mexicana* activa a TLR2 y TLR4 lo cual puede inducir una activación de cinasas que originen la producción de citocinas. Por otro lado el LPG también activo las cinasas de ERK y p38. El LPG fue capaz de modular la secreción de estas citocinas al ponerlas en contacto previo con inhibidores específicos de estas cinasas. Finalmente el LPG indujo la translocación nuclear de los factores de transcripción AP-1 y NF-κB.

Resumen de Resultados

El LPG de *L. mexicana*:

- 1.-Indujo la secreción de citocinas en macrófagos humanos.
- 2.-Promovió la expresión del RNAm y proteínas de TLR2 y TLR4 en macrófagos.
- 3.-Reguló la producción de citocinas a través de TLR2 y TLR4 en macrófagos.
- 4.-Indujo la fosforilación de las cinasas ERK y p38 en macrófagos.
- 5.-Reguló la participación de TLR2 y TLR4 en la fosforilación de ERK y p38 en macrófagos.
- 6.-Promovió la translocación nuclear de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B en macrófagos.

8. Conclusión

El LPG de *L. mexicana* activa la secreción de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 e IL-10 y fosforila las cinasas ERK y p38 a través de TLR2 y TLR4.

Este estudio amplió la investigación hacía diversas vías de señalización así como a los factores de transcripción que pueden estar involucrados en el proceso de la infección por *L. mexicana* y ayuda a dilucidar nuevos mecanismos por los cuales este parasito regula los efectos proinflamatorios en el hospedero, principalmente en los pacientes con LCL y LCD

9. Bibliografía:

- Abdi, K. (2002). IL-12: the role of p40 versus p75. *Scand J Immunol*, 56(1).
- Adams, J. P. and Sweatt, J. D. (2002). Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annual Review Pharmacology Toxicology*, 42
- Aebischer, T., Bennett, C. L., Pelizzola, M., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Urbano, M., Capozzoli, M., Luchini, A., Ilg, T., Granucci, F., Blackburn, C. C. and Ricciardi-Castagnoli, P. (2005). A critical role for lipophosphoglycan in proinflammatory responses of dendritic cells to *Leishmania mexicana*. *Eur J Immunol*, 35(2).
- Akira, S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Current Opinion Immunology*, 15(1).
- Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T. and Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal Biology Chemical*, 270(46).
- Alexander, J., Coombs, G. H. and Mottram, J. C. (1998). *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol*, 161(12).
- Alvarez-Arellano, L., Camorlinga-Ponce, M., Maldonado-Bernal, C. and Torres, J. (2007). Activation of human neutrophils with *Helicobacter pylori* and the role of Toll-like receptors 2 and 4 in the response. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51(3).
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, 49(6).
- Argueta-Donohue, J., Carrillo, N., Valdes-Reyes, L., Zentella, A., Aguirre-Garcia, M., Becker, I. and Gutierrez-Kobeh, L. (2008). *Leishmania mexicana*: participation of NF-kappaB in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Experimental Parasitology*, 120(1).
- Awasthi, A., Mathur, R. K. and Saha, B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*, 119(6).
- Balaraman, S., Singh, V. K., Tewary, P. and Madhubala, R. (2005). *Leishmania* lipophosphoglycan activates the transcription factor activating protein 1 in J774A.1 macrophages through the extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Biochem Parasitol*, 139(1).
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L. G., Ruiz, A., Cervantes, R., Pérez T, A., Cabrera, N., Gonzalez, A., Maldonado,

- C. and Isibasi, A. (2003). Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular Biochemical Parasitology* 130(2).
- Belkaid, Y., Butcher, B. and Sacks, D. L. (1998). Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in Leishmania-infected cells. *Eur J Immunol*, 28(4).
- Ben-Othman, R., Guizani-Tabbane, L. and Dellagi, K. (2008). Leishmania initially activates but subsequently down-regulates intracellular mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB signaling in macrophages. *Molecular Immunology*, 45(11).
- Bhardwaj, N., Rosas, L. E., Lafuse, W. P. and Satoskar, A. R. (2005). Leishmania inhibits STAT1-mediated IFN-gamma signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1beta by Leishmania mexicana. *International Journal Parasitology*, 35(1).
- Bogdan, C., Gessner, A., Solbach, W. and Rollinghoff, M. (1996). Invasion, control and persistence of Leishmania parasites. *Curr Opin Immunol*, 8(4).
- Caceres-Dittmar, G., Tapia, F. J., Sanchez, M. A., Yamamura, M., Uyemura, K., Modlin, R. L., Bloom, B. R. and Convit, J. (1993). Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol*, 91(3).
- Carrada, G., Caneda, C., Salaiza, N., Delgado, J., Ruiz, A., Sanchez, B., Gutierrez-Kobeh, L., Aguirre, M. and Becker, I. (2007). Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with Leishmania mexicana. *Parasite Immunology*, 29(3).
- Carrera, L., Gazzinelli, R. T., Badolato, R., Hieny, S., Muller, W., Kuhn, R. and Sacks, D. L. (1996). Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med*, 183(2).
- Cezario, G. A., de Oliveira, L. R., Peresi, E., Nicolete, V. C., Poletini, J., de Lima, C. R., Gatto, M. and Calvi, S. A. (2011). Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental Leishmania chagasi infection. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 106(5).
- Cobb, M. H. (1999). MAP kinase pathways. *Progress Biophysics Molecular Biology*, 71(3-4).
- Cox, F. E. (2002). History of human parasitology. *Clinical Microbiology Review*, 15(4).
- Cox, F. E. and Liew, F. Y. (1992). T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol Today*, 13(11).

- Crews, C. M., Alessandrini, A. and Erikson, R. L. (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*, 258(5081).
- Cuadrado, A. and Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*, 429(3).
- Cunningham, A. C. (2002). Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Experimental Molecular Pathology*, 72(2).
- Chandra, D. and Naik, S. (2008). Leishmania donovani infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clinical Experimental Immunology*, 154(2).
- de Veer, M. J., Curtis, J. M., Baldwin, T. M., DiDonato, J. A., Sexton, A., McConville, M. J., Handman, E. and Schofield, L. (2003). MyD88 is essential for clearance of Leishmania major: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *European Journal Immunology*, 33(10).
- Del Vecchio, M., Bajetta, E., Canova, S., Lotze, M. T., Wesa, A., Parmiani, G. and Anichini, A. (2007). Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clinical Cancer Res*, 13(16).
- Delgado-Dominguez, J., Gonzalez-Aguilar, H., Aguirre-Garcia, M., Gutierrez-Kobeh, L., Berzunza-Cruz, M., Ruiz-Remigio, A., Robles-Flores, M. and Becker, I. (2010). Leishmania mexicana lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasite Immunol*, 32(6).
- Dermine, J. F., Goyette, G., Houde, M., Turco, S. J. and Desjardins, M. (2005). Leishmania donovani lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol*, 7(9).
- Dermine, J. F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A. and Desjardins, M. (2000). Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cellular Microbiology*, 2(2).
- Descoteaux, A. and Turco, S. J. (1999). Glycoconjugates in Leishmania infectivity. *Biochim Biophys Acta*, 1455(2-3).
- Descoteaux, A. and Turco, S. J. (2002). Functional aspects of the Leishmania donovani lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect*, 4(9).
- Descoteaux, A., Turco, S. J., Sacks, D. L. and Matlashewski, G. (1991). Leishmania donovani lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *Journal Immunology*, 146(8).
- Desjardins, M. and Descoteaux, A. (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. *Journal Experimental Medicine*, 185(12).

- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27(5).
- Feng, G. J., Goodridge, H. S., Harnett, M. M., Wei, X. Q., Nikolaev, A. V., Higson, A. P. and Liew, F. Y. (1999). Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania phosphoglycans* subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *Journal Immunology*, 163(12).
- Flandin, J. F., Chano, F. and Descoteaux, A. (2006). RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *European Journal Immunology*, 36(2).
- Gallego, C., Golenbock, D., Gomez, M. A. and Saravia, N. G. (2011). Toll-like receptors participate in macrophage activation and intracellular control of *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Infect Immun*, 79(7).
- Ghosh, S., Bhattacharyya, S., Das, S., Raha, S., Maulik, N., Das, D. K., Roy, S. and Majumdar, S. (2001). Generation of ceramide in murine macrophages infected with *Leishmania donovani* alters macrophage signaling events and aids intracellular parasitic survival. *Mol Cell Biochem*, 223(1-2).
- Guha-Niyogi, A., Sullivan, D. R. and Turco, S. J. (2001). Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology*, 11(4).
- Guler, R., Afshar, M., Arendse, B., Parihar, S. P., Revaz-Breton, M., Leitges, M., Schwegmann, A. and Brombacher, F. (2011). PKCdelta regulates IL-12p40/p70 production by macrophages and dendritic cells, driving a type 1 healer phenotype in cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol*, 41(3).
- Hernandez-Ruiz, J., Salaiza-Suazo, N., Carrada, G., Escoto, S., Ruiz-Remigio, A., Rosenstein, Y., Zentella, A. and Becker, I. (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).
- Ilg, T. (2000). Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitol Today*, 16(11).
- Ilg, T., Etges, R., Overath, P., McConville, M. J., Thomas-Oates, J., Thomas, J., Homans, S. W. and Ferguson, M. A. (1992). Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. *J Biol Chem*, 267(10).
- Johnson, N. L., Gardner, A. M., Diener, K. M., Lange-Carter, C. A., Gleavy, J., Jarpe, M. B., Minden, A., Karin, M., Zon, L. I. and Johnson, G. L. (1996). Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase kinase induce cell death. *J Biol Chem*, 271(6).
- Kane, M. M. and Mosser, D. M. (2001). The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*, 166(2).

- Karam, M. C., Hamdan, H. G., Abi Chedid, N. A., Bodman-Smith, K. B. and Baroody, G. M. (2007). Interleukin-10 reduces hyperalgesia and the level of Interleukin-1beta in BALB/c mice infected with *Leishmania major* with no major effect on the level of Interleukin-6. *J Neuroimmunol*, 183(1-2).
- Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 9(2).
- Kavoosi, G., Ardestani, S. K. and Kariminia, A. (2009). The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology*, 136(10).
- Kawai, T. and Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5).
- Kaye, P. M., Rogers, N. J., Curry, A. J. and Scott, J. C. (1994). Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *Eur J Immunol*, 24(11).
- Klinke, D. J., 2nd (2006). The ratio of P40 monomer to dimer is an important determinant of IL-12 bioactivity. *J Theor Biol*, 240(2).
- Kostka, S. L., Knop, J., Konur, A., Udey, M. C. and von Stebut, E. (2006). Distinct roles for IL-1 receptor type I signaling in early versus established *Leishmania major* infections. *J Invest Dermatol*, 126(7).
- Kropf, P., Freudenberg, M. A., Modolell, M., Price, H. P., Herath, S., Antoniazzi, S., Galanos, C., Smith, D. F. and Muller, I. (2004). Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection Immunology*, 72(4).
- Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*, 388(4).
- Lodge, R. and Descoteaux, A. (2005). *Leishmania donovani* promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc42. *Cell Microbiol*, 7(11).
- Louzir, H., Melby, P. C., Ben Salah, A., Marrakchi, H., Aoun, K., Ben Ismail, R. and Dellagi, K. (1998). Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Journal Infection Disase*, 177(6).
- McConville, M. J., Schnur, L. F., Jaffe, C. and Schneider, P. (1995). Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J*, 310 (Pt 3)
- McMaster, W. R., Morrison, C. J., MacDonald, M. H. and Joshi, P. B. (1994). Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology*, 108 Suppl

- McNeely, T. B. and Turco, S. J. (1987). Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem Biophys Res Commun*, 148(2).
- McNeely, T. B. and Turco, S. J. (1990). Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol*, 144(7).
- Moll, H. (1993). Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today*, 14(8).
- Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C. and Moretta, A. (2002). Natural killer cells: a mystery no more. *Scand J Immunol*, 55(3).
- Mosser, D. M. and Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Review Immunology*, 8(12).
- Muller, I., Kropf, P., Louis, J. A. and Milon, G. (1994). Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infect Immun*, 62(6).
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R. and Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366(9496).
- Naderer, T., Vince, J. E. and McConville, M. J. (2004). Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr Mol Med*, 4(6).
- Nandan, D., Lo, R. and Reiner, N. E. (1999). Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun*, 67(8).
- Nandan, D. and Reiner, N. E. (1995). Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infect Immun*, 63(11).
- Nick, J. A., Avdi, N. J., Gerwins, P., Johnson, G. L. and Worthen, G. S. (1996). Activation of a p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. *J Immunol*, 156(12).
- Nylen, S., Maasho, K., Soderstrom, K., Ilg, T. and Akuffo, H. (2003). Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol*, 131(3).
- Olivier, M., Brownsey, R. W. and Reiner, N. E. (1992). Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(16).
- Olivier, M., Gregory, D. J. and Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology Review*, 18(2).

- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22(2).
- Prive, C. and Descoteaux, A. (2000). Leishmania donovani promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *European Journal of Immunology*, 30(8).
- Proudfoot, L., O'Donnell, C. A. and Liew, F. Y. (1995). Glycoinositolphospholipids of Leishmania major inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*, 25(3).
- Ray, M., Gam, A. A., Boykins, R. A. and Kenney, R. T. (2000). Inhibition of interferon-gamma signaling by Leishmania donovani. *J Infect Dis*, 181(3).
- Rossi-Bergmann, B., Muller, I. and Godinho, E. B. (1993). TH1 and TH2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cells in murine leishmaniasis. *Infect Immun*, 61(5).
- Ruiz, J. H. and Becker, I. (2007). CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 29(12).
- Sacks, D. and Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*, 55
- Sacks, D. and Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. *Nature Review Immunology*, 2(11).
- Scott, P. (1991). IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*, 147(9).
- Sharma, U. and Singh, S. (2009). Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol*, 47(6).
- Shaulian, E. and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, 4(5).
- Shio, M. T., Hassani, K., Isnard, A., Ralph, B., Contreras, I., Gomez, M. A., Abu-Dayyeh, I. and Olivier, M. (2012). Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *J Trop Med*, 2012
- Shweash, M., Adrienne McGachy, H., Schroeder, J., Neamatallah, T., Bryant, C. E., Millington, O., Mottram, J. C., Alexander, J. and Plevin, R. (2011). Leishmania mexicana promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. *Molecular Immunology*, 48(15-16).
- Silveira, F. T., Lainson, R. and Corbett, C. E. (2004). Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memories Instituto Oswaldo Cruz*, 99(3).

- Silverman, N. and Maniatis, T. (2001). NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*, 15(18).
- Spath, G. F., Garraway, L. A., Turco, S. J. and Beverley, S. M. (2003). The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proceedings National Academy Sciences*, 100(16).
- Srivastav, S., Kar, S., Chande, A. G., Mukhopadhyaya, R. and Das, P. K. (2012). *Leishmania donovani* exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response. *Journal Immunology*, 189(2).
- Stafford, J. L., Neumann, N. F. and Belosevic, M. (2002). Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol*, 28(3).
- Takeda, K. and Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminario Immunology*, 16(1).
- Tapia, F. J., Caceres-Dittmar, G., Sanchez, M. A., Fernandez, A. E. and Convit, J. (1993). The cutaneous lesion in American leishmaniasis: leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. *Biol Res*, 26(1-2).
- Teixeira, M. J., Fernandes, J. D., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Pompeu, M. L., Santana da Silva, J., Brodskyn, C. I., Barral-Netto, M. and Barral, A. (2005). Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect Immun*, 73(2).
- Tuon, F. F., Amato, V. S., Bacha, H. A., Almusawi, T., Duarte, M. I. and Amato Neto, V. (2008). Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infection Immunology*, 76(3).
- Turco, S. J. and Descoteaux, A. (1992). The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*, 46
- Turco, S. J. and Sacks, D. L. (1991). Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, 45(1).
- Vargas-Inchaustegui, D. A., Tai, W., Xin, L., Hogg, A. E., Corry, D. B. and Soong, L. (2009). Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infect Immun*, 77(7).
- Villasenor-Cardoso, M. I., Salaiza, N., Delgado, J., Gutierrez-Kobeh, L., Perez-Torres, A. and Becker, I. (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(8).
- Vitale, G., Bernardi, L., Napolitani, G., Mock, M. and Montecucco, C. (2000). Susceptibility of mitogen-activated protein kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochem J*, 352 Pt 3

- Von Stebut, E. (2007). Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*, 17(2).
- Wang, Z., Harkins, P. C., Ulevitch, R. J., Han, J., Cobb, M. H. and Goldsmith, E. J. (1997). The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(6).
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. and Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79(1).
- Wilhelm, P., Ritter, U., Labbow, S., Donhauser, N., Rollinghoff, M., Bogdan, C. and Korner, H. (2001). Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol*, 166(6).
- Yang, D., Tournier, C., Wysk, M., Lu, H. T., Xu, J., Davis, R. J. and Flavell, R. A. (1997). Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7).
- Yang, Z., Mosser, D. M. and Zhang, X. (2007). Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. *Journal Immunology*, 178(2).
- Zhou, T., Sun, L., Humphreys, J. and Goldsmith, E. J. (2006). Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinase ERK2. *Structure*, 14(6).
- Zingarelli, B. (2005). Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med*, 33(12 Suppl).

10. Apéndice

Leishmania mexicana lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4

A. ROJAS-BERNABÉ¹, O. GARCIA-HERNÁNDEZ¹, C. MALDONADO-BERNAL², J. DELEGADO-DOMINGUEZ¹, E. ORTEGA³, L. GUTIÉRREZ-KOBEH¹, I. BECKER¹ and M. AGUIRRE-GARCIA^{1*}

¹Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

²Unidad de Investigación de Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México, D.F., México

³Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

(Received 2 July 2013; revised 29 October 2013; accepted 23 November 2013)

SUMMARY

Protozoan parasites of genus *Leishmania* are the causative agents of leishmaniasis. *Leishmania* promastigotes primarily infect macrophages in the host, where they transform into amastigotes and multiply. Lipophosphoglycan (LPG), the most abundant surface molecule of the parasite, is a virulence determinant that regulates the host immune response. Promastigotes are able to modulate this effect through LPG, creating a favourable environment for parasite survival, although the mechanisms underlying this modulation remain unknown. We analysed the participation of TLR2 and TLR4 in the production of cytokines and explored the possible phosphorylation of ERK and/or p38 MAP kinase signalling cascades in human macrophages stimulated with *Leishmania mexicana* LPG. The results show that LPG induced the production of TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 and IL-10 and led to phosphorylation of ERK and p38 MAP kinase. Specific inhibitors of ERK or p38 MAP kinases and mAbs against TLR2 and TLR4 reduced cytokine production and phosphorylation of both kinases. Our results suggest that *L. mexicana* LPG binds TLR2 and TLR4 receptors in human macrophages, leading to ERK and MAP kinase phosphorylation and production of pro-inflammatory cytokines.

Key words: ERK, p38 MAP kinase, *Leishmania mexicana*, lipophosphoglycan, human macrophages.

INTRODUCTION

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, which are transmitted to humans by the bite of sandflies. In Mexico this disease is caused by *Leishmania mexicana*, resulting in either localized cutaneous leishmaniasis (LCL) or diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). *Leishmania* infects the vertebrate host, principally affecting phagocytic cells of the immune system such as macrophages and dendritic cells. *Leishmania* presents two phenotypically distinct stages during the life cycle: the promastigotes and the amastigote. The promastigote is the extracellular stage and responsible for infection of host cells. Within host cells promastigotes transform into amastigotes and initiate their replication, most importantly within macrophages (Liese *et al.* 2008). During invasion, promastigotes tend to resist and modulate the host immune functions, due in part to a dense surface glycocalyx largely composed of

glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored molecules. The most abundant glycoconjugate on the parasite surface is a virulence factor known as lipophosphoglycan (LPG). It has been shown that LPG is recognized as a PAMP (pathogen-associated molecular patterns) by Toll-like receptors, triggering signal transduction pathways that upregulate the production of pro-inflammatory cytokines (de Veer *et al.* 2003; Kavooosi *et al.* 2009). Also, it has been reported that LPG from *Leishmania major* activates NK cells through TLR2 (Becker *et al.* 2003).

Early studies have shown that the control of infection of some *Leishmania* species requires different TLRs that recruit and activate signalling molecules of the innate immune response. TLR2 recognition has been shown for *L. major* (de Veer *et al.* 2003; Kavooosi *et al.* 2009) as well as for *Leishmania braziliensis*, where TLR2-deficiency had an impact on disease outcome in mice infected with this parasite (Vargas-Inchaustegui *et al.* 2009). TLR4 has also been shown to have a role in controlling *L. major* growth (Kropf *et al.* 2004). Additionally, in *Leishmania pifanoi*-infected TLR4-deficient mice, an increase in parasite burdens was observed (Whitaker *et al.* 2008). TLR9 was found to

* Corresponding author. Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Dr. Balmis 148, Colonia Doctores, México, D.F., 06726, México. E-mail: maguirre@unam.mx

be essential in the control of infection with *L. major*, *L. braziliensis* and *Leishmania infantum* (Liese *et al.* 2008; Tuon *et al.* 2008).

TLRs activate several signalling cascades, which include mitogen-activated protein kinases (MAPK) (Means *et al.* 2000; Jung *et al.* 2006) that constitute a superfamily of serine/threonine kinases. Three major subgroups of MAP kinases are known in mammalian cells including extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK), *c-Jun* amino-terminal kinases (JNK) and the p38 MAP kinase. ERK is activated by mitogens and growth factors, while cellular stress stimuli, such as UV light, osmotic changes, thermal shock and inflammatory cytokines induce the activation of JNK and p38 MAP kinases. MAPK modulate many cellular events, including cell cycle progression, regulation of embryonic development, cell movement and apoptosis (Vitale *et al.* 2000; Kyriakis and Avruch, 2001; Ben-Othman *et al.* 2008). It is known that differential signalling triggered by ERK or p38 MAP kinase can play an important role in the type of response after stimulation (Feng *et al.* 1999). For example, the activation of p38 MAP kinase is associated with the production of IL-12 and IL-10 can inhibit the activation of ERK (Lu *et al.* 1999; Suttles *et al.* 1999). These kinases are essential for the control of *Leishmania* infections (Junghae and Raynes, 2002) and a reciprocal regulation of ERK and p38 MAP kinase favours a better response of pro-inflammatory cytokines during early stages of infection (Mathur *et al.* 2004). It has been shown that *Leishmania donovani* promastigotes successfully suppress the production of pro-inflammatory cytokines in order to create a favourable environment in host cells for parasite survival (Chandra and Naik, 2008).

Our group previously reported that *L. mexicana* LPG induced a differential production of cytokines in human dendritic cells (DCs) and monocytes (Argueta-Donohue *et al.* 2008). Moreover, in monocytes of patients with LCL or DCL, LPG significantly reduced the production of TNF- α and IL-12p40 (Carrada *et al.* 2007).

Although it has been shown that *Leishmania* possesses ligands for TLRs and that the engagement of these receptors is important for the infection, it is necessary to investigate the kinases that are involved in this activation and the cytokines that are produced.

The aim of the present study was to investigate the participation of TLR2 and TLR4 in the production of cytokines and to explore the possible phosphorylation of ERK and/or p38 MAP kinase in human macrophages stimulated with *L. mexicana* LPG. Our data show that *L. mexicana* LPG activates TLR2 and TLR4 in human macrophages leading to ERK and p38 MAP kinase phosphorylation and production of TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 and IL-10.

MATERIALS AND METHODS

Macrophage purification from peripheral blood

Peripheral blood monocytes were obtained from the buffy coats of blood from healthy donors (kindly supplied by the blood bank of the Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by using Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO, USA) density gradient centrifugation at 300 *g* for 20 min at 20 °C, and suspended in pyrogen-free and sterile phosphate-buffered saline pH 7.2. They were then incubated with CD14 MACS microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) during 15 min and purified by magnetic sorting. CD14⁺ monocytes (1×10^6) were washed and left overnight in pyrogen-free and sterile RPMI-1640 medium (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 2 mM L-glutamine (Gibco Invitrogen Corporation Carlsbad, CA, USA). They were then cultured in 6-well tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA) for 5 days at 37 °C, with 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion. Purity was analysed by flow cytometry, using the CD14, CD80, CD86, CD40 antibodies (BD, Bioscience, San Jose, CA, USA).

Parasites

Leishmania mexicana (MHOM/MX84/ISETGS) promastigotes isolated from a patient with DCL, were grown in RPMI-1640 medium (Life Technologies Laboratories) supplemented with 10% heat-inactivated FBS at 26 °C.

LPG purification

LPG was purified from *L. mexicana* promastigotes, as previously described (Delgado-Dominguez *et al.* 2010). Briefly, parasites were sub-cultured every 4–5 days and grown to a density of 2×10^7 mL⁻¹. Promastigotes were harvested from stationary-phase cultures, centrifuged at 3200 *g* for 10 min, washed three times with PBS, and finally counted after immobilization with glutaraldehyde (0.1%). The supernatant was removed and the pellet was extracted with chloroform/methanol/water (4:8:3, v/v) for 30 min at room temperature. The insoluble material (delipidated residue extracted and not soluble in chloroform/methanol) was used for LPG extraction with 9% 1-butanol in water (2×50 mL) and the pooled supernatants were vacuum-dried. LPG was purified from this fraction by high-performance liquid chromatography (HPLC), using two octyl-sepharose columns (each with a 1-propanol gradient of 5–60% in 0.1 M ammonium acetate) to optimize LPG purity. The LPG samples proved negative for

the presence of endotoxin, evidenced by the *Limulus* sp. amoebocyte lysate assay (E-Toxate Kit; Sigma). A sample was shown to be devoid of protein contaminants through analysis by SDS-PAGE followed by silver staining.

Cytokine assays

A total of 1×10^6 human macrophages were stimulated with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of LPG from *L. mexicana* for 24 h. After this incubation time, macrophages were stimulated with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ *L. mexicana* LPG in 1 mL RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS during 24 h at 37°C and 5% CO_2 . For positive controls, cells were stimulated with 100 ng mL^{-1} of lipopolysaccharide (LPS). In some conditions macrophages were pre-incubated for 2 h, either with $40 \mu\text{M}$ PD98059 (sc-3532), an inhibitor of ERK, or $20 \mu\text{M}$ SB203580 (sc-3533), an inhibitor of p38 MAP kinase (both inhibitors from Santa Cruz, CA, USA) and dissolved in 1 M of dimethylformamide (Sigma). For experiments with the blocking antibodies for TLRs, macrophages were first pretreated with anti-human IgG antibody ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Aventis Behring GmbH, Marburgo, Germany) for 1 h at 37°C , in order to saturate Fc receptors and avoid unspecific attachment of anti-TLR mAbs. Then macrophages were treated with $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ anti-TLR2 monoclonal antibodies (clone TL2.1) or $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ anti-TLR4 (clone HTA125) (Imgenex, Biocarta, San Diego, CA, USA) for 1 h at 37°C , followed by stimulation with LPG for 24 h. Cell-free culture supernatants were harvested and the concentration of TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 and IL-10 were determined by standard sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to BD-Pharmingen Cytokine. In brief, 96-well microtiter plates (Costar, Corning, NY) were coated with an unconjugated anti-TNF- α capture antibody (clone Mab1, $6 \mu\text{g mL}^{-1}$), anti-IL-1 β (clone Mab 1, $4 \mu\text{g mL}^{-1}$), anti-IL-10 capture antibody (clone JES3-19F1, $4 \mu\text{g mL}^{-1}$), anti-IL-12 p40/capture antibody (clone C8.3, $8 \mu\text{g mL}^{-1}$) or anti-IL-12 p70 (clone 20C2, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$) in 100 mM Na_2HPO_4 , pH 9.0 for 12 h at 4°C , and blocked with phosphate-buffered saline pH 7.4, supplemented with 5% casein, dissolved in 0.1 N NaOH. Cell supernatants and recombinant hTNF- α standard, hIL-1 β standard, hIL-10 standard, hIL-12 p40 standard, hIL-12p70 standard were incubated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS for 2 h at room temperature. Bound human TNF- α , IL-1 β , IL-12 p40/p70 were detected using a biotinylated anti-mouse antibody in 1% BSA for 1 h. Human IL-10 was detected using a biotinylated rat anti-hIL-10. All antibodies and recombinant cytokines were from BD-Pharmingen, San Jose, CA, USA. The plate was developed using streptavidin alkaline phosphatase conjugate with p-nitrophenyl

phosphate 4 mg mL^{-1} (Life Technologies) as substrate. Plates were read at 405 nm using a microtiter (EL 321e BIO-TEK instruments), and the concentrations were calculated from a standard curve of recombinant human TNF- α , IL-1 β , IL-12 p40, IL-12 p70 and IL-10. The concentration of each sample was calculated by regression analysis using the mean absorbance (based on the average of triplicates of each sample).

RT-PCR of TLR2 and TLR4 mRNA

For RT-PCR analysis of TLR2 and TLR4 mRNA expression, 1×10^6 macrophages were stimulated with (2, 4, 6, 8 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) of LPG in 1 mL RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS for 18 h at 37°C with 5% CO_2 . Total RNA was extracted from macrophage cells with TRIzol and amplified with Super Script One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Life Technologies). The cDNA products were PCR amplified with the TLR2 or TLR4 specific primers selected on the basis of the published human TLR2 and TLR4 sequence. The primers for TLR2 were: sense 5'-GCC AAA GTC TTG ATT GAT TGG-3' and antisense 5'-TTG AAG TTC TCC AGC TCC TG-3'. The primers for TLR4 were: sense 5' TGG AAG TTG AAC GAA TGG AAT GTG-3' and antisense 5'-ACC AGA ACT GCT ACA ACA GAT ACT-3' (Becker *et al.* 2003; Chandra and Naik, 2008). PCR products were separated on 1.5% w/v agarose gel and the densitometric analysis was performed by recording the intensity of the bands with a Multi Image Analyser. β -Actin was used as an internal control.

Flow cytometry analysis of cell-surface expression of TLR2 and TLR4

The extracellular expression of TLR2 or TLR4 was determined by flow cytometry. A total of 1×10^6 macrophages were stimulated with (2, 4, 6, 8 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) of LPG for 18 h and re-suspended in blocking buffer (PBS containing total human IgG, 2% FBS, 5 mM EDTA and 0.1% sodium azide) and incubated on ice for 30 min. Afterwards, cell suspension was centrifuged 300 g and washed twice with PBS and stained with phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti-human TLR2 (sc-21759) and anti-human TLR4 (sc-13593) both of Santa Cruz Biotechnology. The isotype controls used to exclude non-specific staining were PE-conjugated anti-IgG2a (Santa Cruz Biotechnology). The cells were incubated for 20 min in the dark and washed twice with washing buffer (FACS). The cells were analysed by flow cytometry (FACSCanto II, Becton-Dickinson, San Jose, CA), and analysed with DIVA software (Becton Dickinson). The results are reported as Mean Fluorescence Intensity (MFI).

Western blot analysis

A total 1×10^6 macrophages were treated under different conditions: non-stimulated macrophages were used as the negative control for the kinetics of phosphorylation of ERK and p38MAP kinase; macrophages incubated with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of *L. mexicana* LPG for different times: 5, 10, 15, 30 and 60 min; macrophages pre-incubated with the ERK inhibitor ($40 \mu\text{M}$) or the p38 MAP kinase inhibitor ($20 \mu\text{M}$), and subsequently stimulated with *L. mexicana* LPG; macrophages treated with $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of anti-TLR2 monoclonal antibodies (clone TL2.1) or $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of anti-TLR4 (clone HTA125) for 1 h 37°C , followed by stimulation with LPG. All cell extracts from the different conditions were lysed with RIPA buffer (TrisHCl, pH 7.4 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaF 10 mM, NP-40 1%, cocktail protease and phosphatase inhibitors; all obtained from Sigma) and then centrifuged at 150 g for 10 min at 4°C . Afterwards, the pellet was removed and an aliquot was used for protein determination by the DC method (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) compatible with detergents. Subsequently the samples were analysed by Western-blot assays.

Proteins were resolved by 10% SDS-PAGE in Tris/glycine/SDS buffer (25 mM Tris, 0.1% SDS) (Biorad Laboratories) and then electrotransferred onto Immobilon-P transfer membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were washed with TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.005% Tween 20) and blocked by treatment with 3% albumin in TBS-T for 1 h. They were then immunoblotted with polyclonal goat-anti mouse p38 MAP kinase (C-20), p-p38 MAP kinase (D-8), ERK (K-23) and p-ERK (E-4) (all from Santa Cruz) at a dilution of 1:5000 in 1% albumin in TBS-T overnight at 4°C . After 1 h of washing with TBS-T, membranes were incubated with secondary HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Biomed, Foster City, CA, USA; dilution 1/10 000) and washed five times in TBS-T. Bands were detected using enhanced chemiluminescence (Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA), according to the manufacturer's instructions. Densitometric analysis was performed by recording the intensity of the bands of the corresponding gel with multiple image analyser (Biorad, Quantity One Analysis Software).

Western-blot for detection TLR2 and TLR4 in ODYSSEY infrared Imaging System

A total of 1×10^6 macrophages stimulated with different concentrations of LPG from *L. mexicana* (2, 4, 6, 8 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) were lysed and analysed by Western-blot assay. Firstly, samples were resolved by 7.5% SDS-PAGE and then electrotransferred.

The membranes were blocked with blocking buffer LiCor (Lincoln, NE) for 1 h at room temperature and incubated with specific antibodies (TLR2 sc-10739, TLR4 sc-30002 and Actin sc-1616, all from Santa Cruz) diluted in 0.1% Tween LiCor blocking buffer overnight at 4°C . The membranes were washed with PBS tween and incubated with a secondary antibody IR dye 700 goat anti-rabbit IgG (H+L), and IR dye 680 conjugated donkey anti-goat IgG (H+L) at a dilution 1/10 000 for 1 h. The membranes were washed with PBS 1X and the proteins were analysed using Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Lincoln, NE), according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm s.d. Statistical evaluation of the data values was performed by the Mann-Whitney *U*-test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Cytokine production induced by *L. mexicana* LPG in macrophages

The effect of *L. mexicana* LPG on the production of TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 and IL-10 by human macrophages was investigated. As shown in Fig. 1, LPG ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) increased the production of TNF- α ($511 \pm 53.87 \text{ pg mL}^{-1}$) 5-fold, as compared to non-stimulated macrophages. LPG stimulation also led to an increase in the production of IL-1 β ($278 \pm 23.24 \text{ pg mL}^{-1}$) (3-fold increase), IL-12p40 ($1067 \pm 134.4 \text{ pg mL}^{-1}$) (11-fold increase), IL-12p70 ($84 \pm 9.2 \text{ pg mL}^{-1}$) (2-fold increase) and IL-10 ($421 \pm 56.21 \text{ pg mL}^{-1}$) (3-fold increase), as compared with non-stimulated macrophages. Taken together, in all cytokines tested, we observed significant differences ($P < 0.05$) with regard to controls using non-stimulated macrophages.

Effect of *L. mexicana* LPG on TLR2 and TLR4 expression

The mechanism of induction of cytokines by *Leishmania* LPG is unknown. However, our group previously showed that *L. major* LPG induces cytokine production in human NK cells and that this LPG activation is through TLR2. In the present study we analysed the effect of *L. mexicana* LPG on TLR2 and TLR4 expression by evaluating the mRNA levels and protein presence in these receptors. Macrophages were incubated with different concentrations of LPG (2 to $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), and all treatments resulted in a significant increase in TLR2 and TLR4 mRNA expression, as compared with control cells without stimulation (Fig. 2A).

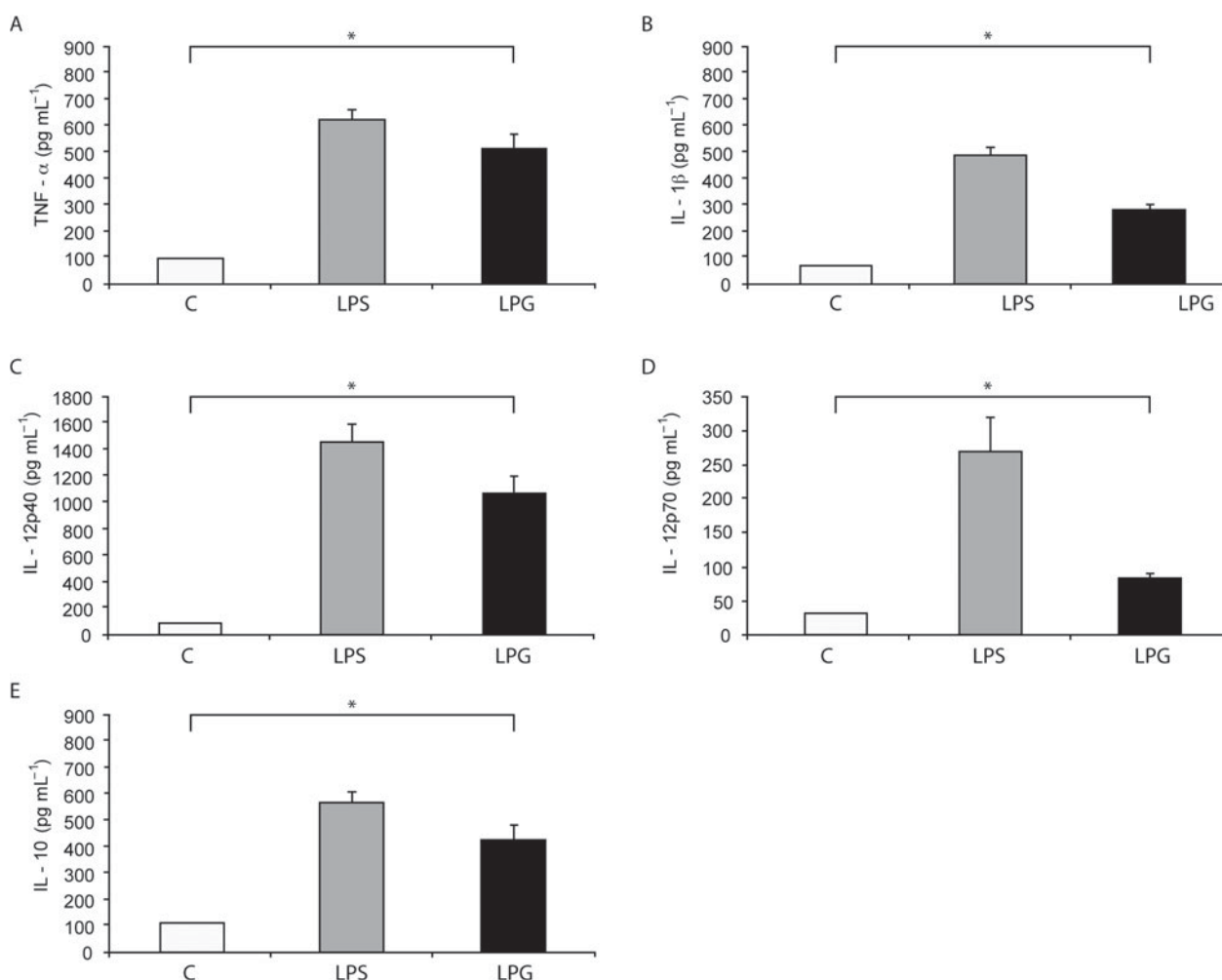


Fig. 1. Cytokines production induced by *L. mexicana* LPG in human macrophages. Macrophages (10×10^6 cell mL⁻¹) were cultured in RPMI medium in the presence of LPS (100 ng mL^{-1}) and LPG ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). After 24 h, TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-12p40 (C), IL-12p70 (D) and IL-10 (E) production was analysed by ELISA. The bars represent mean \pm S.D. of five independent different experiments. Asterisks show the significant differences between macrophages stimulated with LPG and unstimulated macrophages ($P < 0.05$).

The protein presence of TLR2 and TLR4 was detected by Western blot and flow cytometry assays (Fig. 2B and C). The maximal expression of TLR2 and TLR4 mRNA and protein presence determined by Western blot was observed at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of LPG, which was the maximal concentration tested. However when the surface protein presence of TLR2 and TLR4 was analysed by flow cytometry, the maximal expression was observed at 4 and $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ of LPG for TLR2 and $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ of LPG for TLR4 (Fig. 2C).

Participation of TLR2 and TLR4 in LPG-induced cytokine production

Once we determined that *L. mexicana* LPG induced the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 and IL-10) and the expression of TLR2 and TLR4, we pursued to define whether the induction of pro-inflammatory

cytokines is dependent on TLR2 and/or TLR4 activation. Macrophages were pre-incubated with an anti-TLR2 or anti-TLR4 mAb before being stimulated with *L. mexicana* LPG and afterwards cytokine production was measured. We found a decrease in the production of TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 and IL-10 in macrophages incubated with anti-TLR2 or anti-TLR4 antibodies, or both, as compared with macrophages stimulated only with LPG (Fig. 3). The decrease in the production of cytokines after the pre-incubation with anti-TLR2 antibody, anti-TLR4 antibody or with both was 24, 46 and 70% for TNF- α , respectively; 19, 48 and 65% for IL-1 β ; 31, 38 and 59% for IL-12p40; 26, 32 and 52% for IL-12p70 and 48, 55 and 68% for IL-10, with regard to macrophages stimulated only by LPG. The major decrease in the production of cytokines was observed when macrophages were incubated with anti-TLR4 alone or in combination with anti-TLR2 ($P < 0.05$).

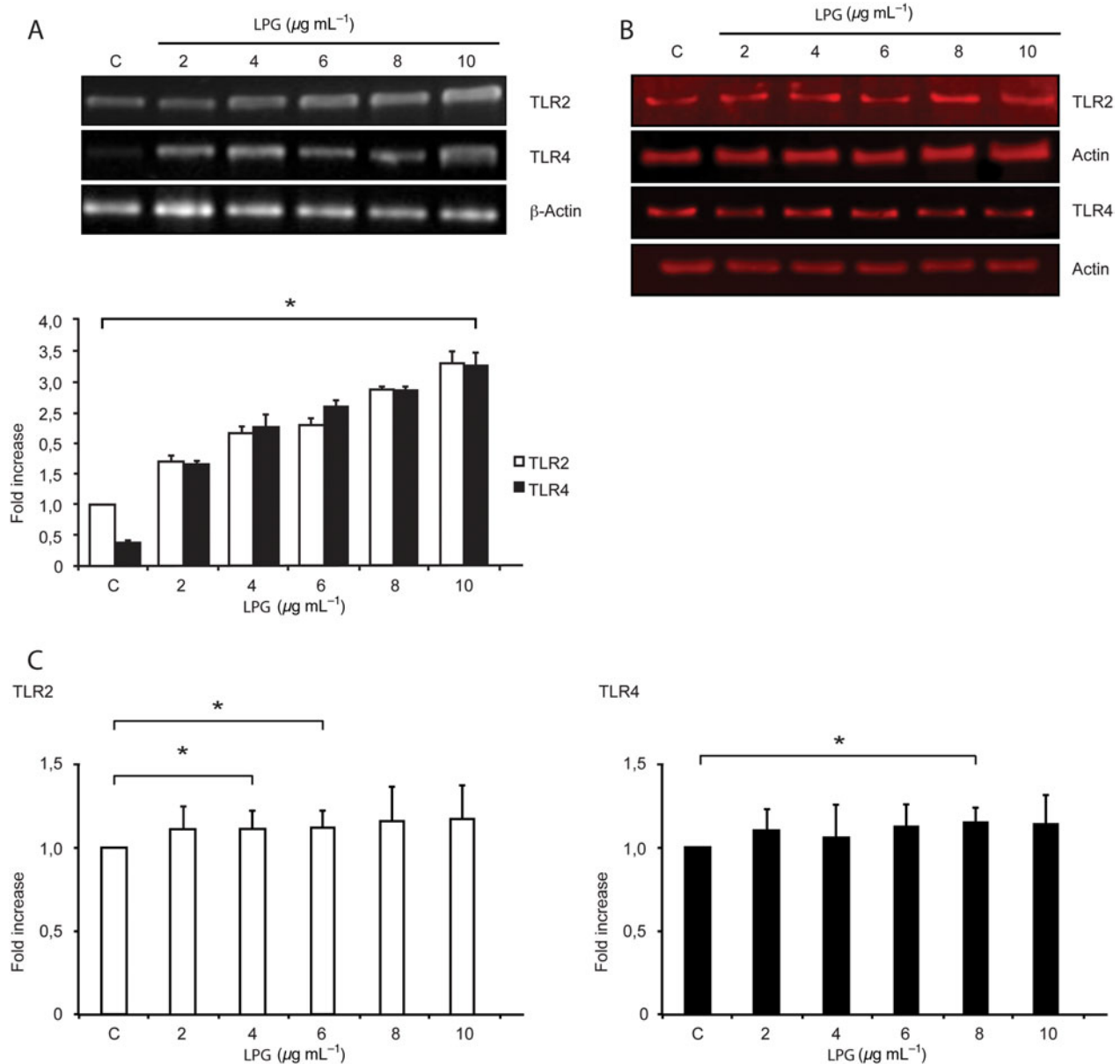


Fig. 2. Effect of *L. mexicana* LPG on TLR2 and TLR4 expression. Macrophages were stimulated with LPG at different concentrations (2, 4, 6, 8 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 18 h. mRNA was isolated and RT-PCR performed for human TLR2, TLR4 and β -actin. Relative mRNA levels for TLR2 and TLR4 were calculated by densitometry analysis and the values in the histograms are the fold increase of TLR2/4 in treated macrophages with respect to untreated. Data are the mean \pm S.D. of three independent experiments (A). For protein analysis, the cells were lysed and processed for Western blot assays, the membranes were incubated with antibodies for TLR2, TLR4 and Actin and the proteins were analysed using Odyssey Infrared Imaging System (B). The blot image is representative of three independent experiments. Flow cytometry analysis of TLR2 and TLR4 extracellular expression shows the relative increase calculated by dividing the median fluorescence from stimulated macrophages by the median fluorescence from unstimulated macrophages, bars expression as mean \pm S.D. of three independent experiments (C). Asterisks show the significant differences between macrophages stimulated with LPG and unstimulated macrophages ($P < 0.05$).

Leishmania mexicana LPG induced the phosphorylation of ERK and p38 MAP kinase

We examined the activation of ERK and p38 MAP kinase in macrophages stimulated with *L. mexicana* LPG. Macrophages were stimulated with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of LPG from *L. mexicana* for different times (5, 10 and 15 min for ERK and 5, 10, 15 and 30 min for p38 MAP kinase). As shown in Fig. 4A

and B, the incubation of macrophages with LPG induced the phosphorylation of ERK and p38 MAP kinase, as determined by the densitometry analysis of ERK and p38 MAP kinase phosphorylation. The phosphorylation of ERK was observed after 5 min and reached a peak at 10 min (Fig. 4A). The highest phosphorylation of p38 MAP kinase was detected at 15 min of incubation (Fig. 4B). Macrophages were then pre-incubated for 2 h with either an inhibitor of

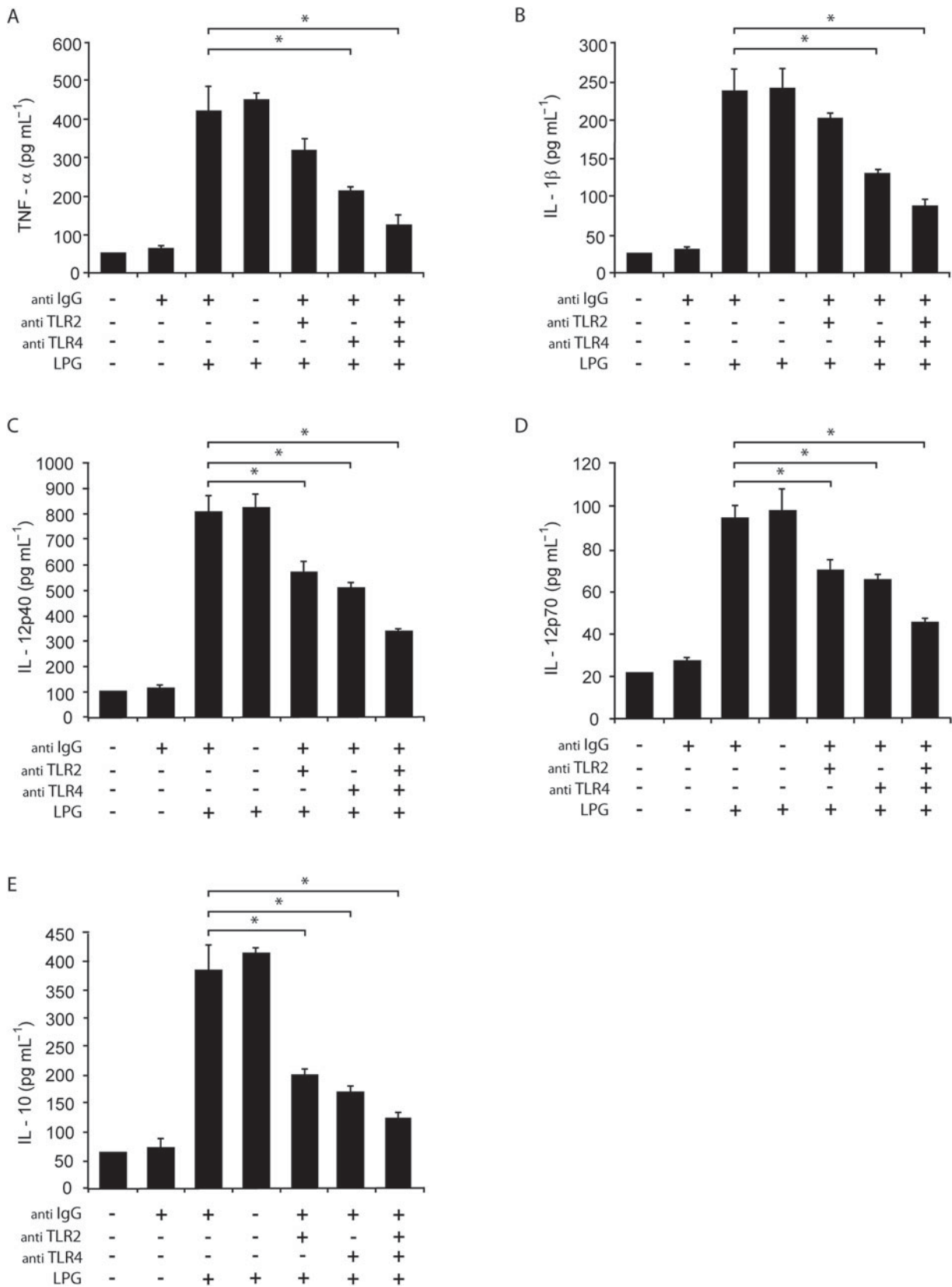


Fig. 3. Role of TLR2 and TLR4 in cytokine production induced by *L. mexicana* LPG. Macrophages were cultured in RPMI medium in presence of LPG ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) with or without pre-treatment with anti-TLR2 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), anti-TLR4 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) or anti-IgG antibodies. After 24 h, TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-12p40 (C), IL-12p70 (D) and IL-10 (E) production was analysed by ELISA. The bars represent the mean \pm s.d. of six different experiments. Asterisks show the significant differences between macrophages stimulated with LPG and unstimulated macrophages ($P < 0.05$).

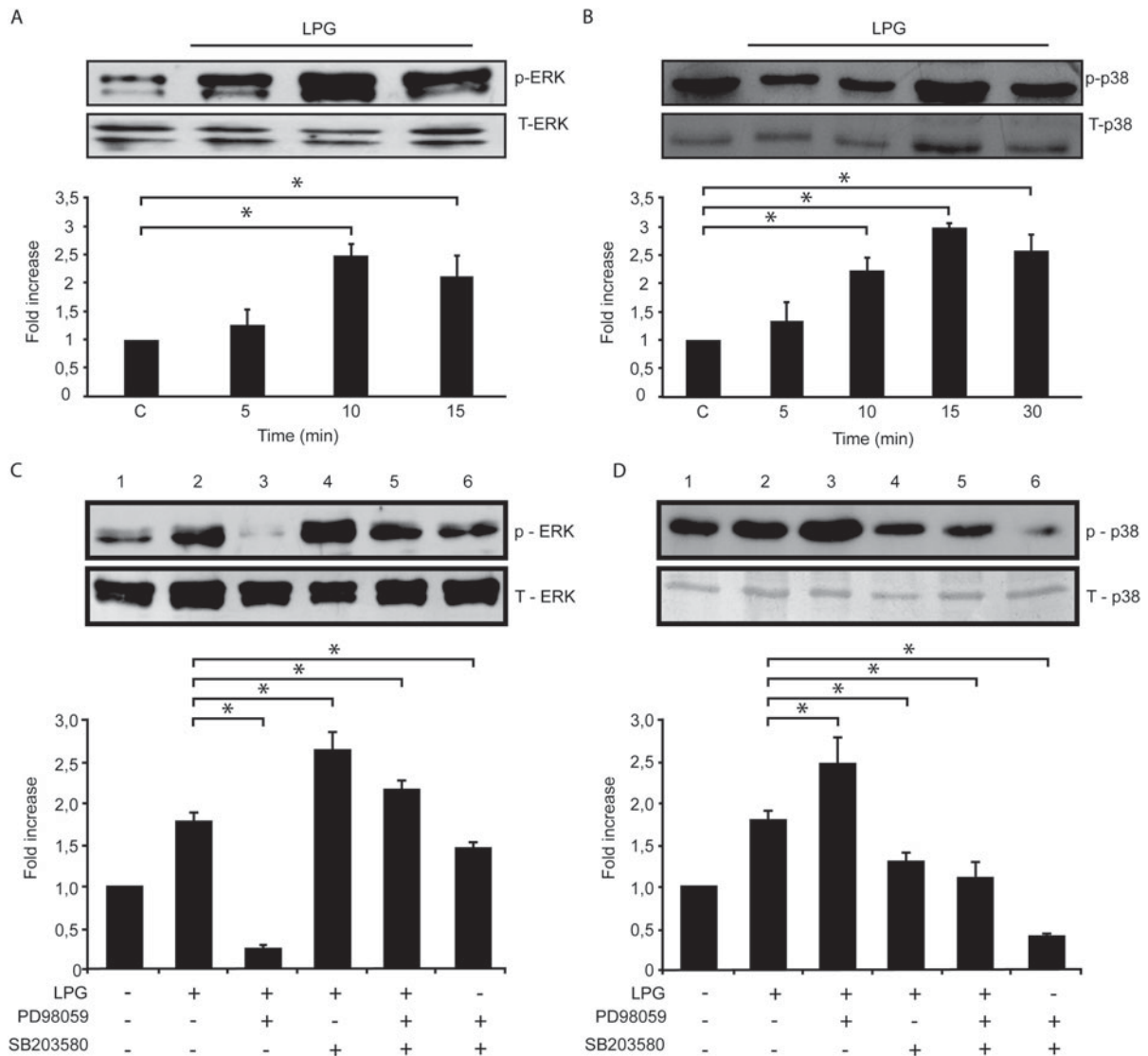


Fig. 4. Effect of *L. mexicana* LPG on the phosphorylation of ERK and p38 MAP kinase. Macrophages were cultured in RPMI medium in the presence or absence of LPG ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 5, 10 and 15 min for p-ERK, and 5, 10, 15 and 30 min for p-p38MAPK. Cell extracts were prepared ($10 \mu\text{g}$ protein/well) and levels of phosphorylated ERK and p38 MAP kinase were detected by Western blot using specific antibodies for (A) p-ERK and T-ERK and (B) p-p38 MAP kinase and T-p38 MAP kinase. Macrophages were pretreated with PD98059 (an ERK inhibitor) or SB203580 (a p38 MAPK inhibitor) for 2 h (control cells were not pre-treated) and incubated with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of LPG for 10 min for p-ERK and 15 min for p-p38 MAP kinase. Lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted for (C) p-ERK and T-ERK and (D) p-p38 MAP kinase and T-p38 MAP Kinase. Relative levels of phosphorylated ERK and p38 MAP kinase were measured by densitometric analysis and values represent the mean \pm s.d. of four different experiments. Asterisks indicate a significant difference with $P < 0.05$ compared with unstimulated macrophages (A, B) and macrophages stimulated with LPG (C, D).

ERK (PD98059), p38 MAP kinase (SB203580) or both inhibitors, and then stimulated with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ *L. mexicana* LPG for 10 min before p-ERK detection and 15 min before p38 MAP kinase (Fig. 4C and D). Western-blot analysis was used to detect the phosphorylation levels of these kinases. The phosphorylation of ERK induced by LPG in macrophages was suppressed by the ERK inhibitor, but not the p38 MAP kinase inhibitor (Fig. 4C). Likewise, the phosphorylation of p38 MAP kinase induced by LPG in macrophages was decreased by

the p38 MAP kinase inhibitor but not the ERK inhibitor (Fig. 4D).

We also observed the effect of pre-incubation with the two inhibitors together in macrophages stimulated with LPG, which resulted in a decrease of ERK phosphorylation, as compared with phosphorylation of ERK induced in macrophages incubated only with LPG (Fig. 4C, lane 5), and a partial inhibition of p38 MAP kinase phosphorylation (Fig. 4D, lane 5). Macrophages were incubation only with both inhibitors (Fig 4C and D, lane 6).

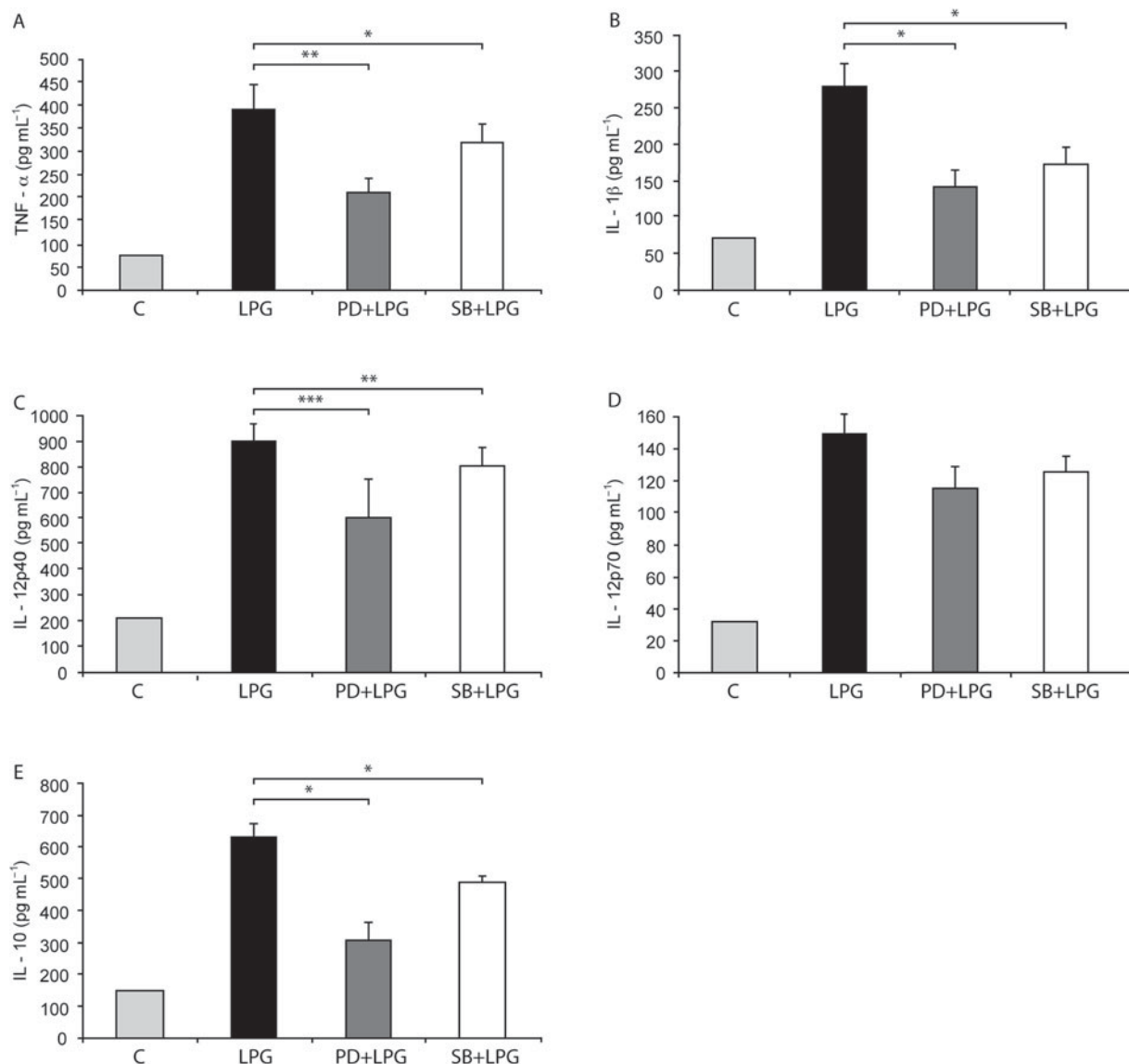


Fig. 5. Inhibition of ERK and p38 MAP kinase decreased cytokine production. Macrophages were cultured in RPMI medium in presence of 40 μ M PD98059 or 20 μ M SB203580, and LPG (10 μ g mL⁻¹). Control cells were only treated with LPG. After 24 h, TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-12p40 (C), IL-12p70 (D) and IL-10 (E) production was analysed by ELISA. Results are the mean \pm s.d. of six independent experiments. (*), (**) and (***) indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$ respectively) compared to macrophages stimulated with LPG.

Inhibition of ERK and p38 MAP kinase decreased cytokine production induced by LPG

ERK and p38 MAP kinase pathways are known to play a central role in the regulation of the innate response, including the production of pro-inflammatory cytokines. We evaluated whether the inhibition of ERK and/or p38 MAP kinase participated in the regulation of TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 and IL-10 after stimulating macrophages with *L. mexicana* LPG. LPG was able to induce the production of TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 and IL-10 (Fig. 5), but after macrophages were preincubated for 2 h with PD98059 (an ERK inhibitor) or with SB203580 (a p38 MAP kinase inhibitor) and subsequently stimulated with LPG, we observed that pre-incubation with the ERK

inhibitor led to a significant decrease in cytokine production, being 45% for TNF- α , 50% for IL-1 β , 33% for IL-12p40, 23% for IL-12p70 and 51% for IL-10, as compared with macrophages stimulated with LPG. In the case of the inhibitor for p38 MAP kinase only IL-1 β production decreased significantly in 38% ($P < 0.05$).

LPG activation of ERK and p38 MAP kinase is mediated by TLR2 and TLR4

We studied the possible role of TLR2 and TLR4 in the phosphorylation of ERK and p38 MAP kinase in macrophages after stimulation with *L. mexicana* LPG. Macrophages were pre-incubated with anti-TLR2 or anti-TLR4 antibodies and stimulated with

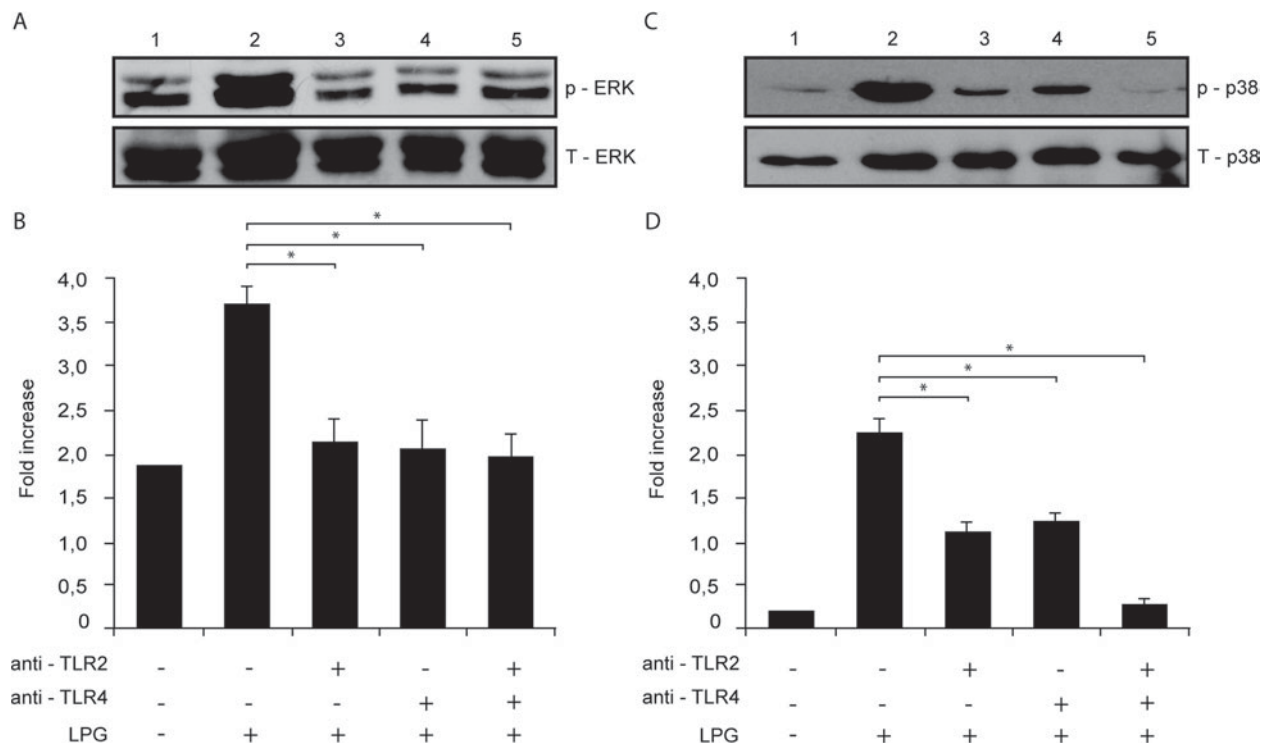


Fig. 6. LPG activation of ERK and p38 MAP kinase is mediated by TLR2 and TLR4. Macrophages were cultured in RPMI medium in presence of LPG ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) with or without pre-treatment with anti-TLR2 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) or anti-TLR4 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) monoclonal antibodies. Whole cell lysates were prepared, separated by SDS-PAGE, and then assessed for (A) p-ERK and T-ERK and (B) p-p38 MAP kinase and T-p38 MAP kinase. Relative levels of phosphorylated ERK and p38 MAP kinase were measured by densitometry analysis, and values represent the mean \pm s.d. of four independent experiments. Asterisks indicate a significant difference with $P < 0.05$ compared with macrophages stimulated with LPG.

L. mexicana LPG, and then ERK and p38 MAP kinase phosphorylation was detected by Western blot and a densitometry analysis was performed recording the intensity of the bands and total proteins were compared with phosphorylated ERK or p38 MAP kinase.

When macrophages were pre-incubated with either anti-TLR2 or anti-TLR4 (Fig. 6A and B) there was a similar decrease in ERK and p38 MAP kinase phosphorylation, as compared with macrophages stimulated only with LPG. Interestingly when macrophages were pre-incubated with both antibodies, p38 MAP kinase phosphorylation was almost completely inhibited (Fig. 6B).

DISCUSSION

It has been shown that *Leishmania* infection promotes an alteration in TLR signal transduction via phosphorylation mechanisms, which permits the parasite to create a favourable environment for its survival (Tuon *et al.* 2008). One of the cells that are infected by *Leishmania* parasites are macrophages, that play a critical role in inflammatory responses through a variety of TLR receptors expressed on their surface that, upon contact with an infectious agent, trigger various signalling events that result

in the activation of NF- κ B and production of pro-inflammatory cytokines that contribute to effectively eliminate the parasite (Underhill and Ozinsky, 2002).

All species of *Leishmania* express LPG, a GPI-anchored glyco-phospholipid, which is the most abundant glycoconjugate on the parasite surface (Naderer *et al.* 2004). LPG has been shown to be a ligand for TLR2 in different cells (Becker *et al.* 2003; de Veer *et al.* 2003; Ibraim *et al.* 2013). These parasites can successfully establish an intracellular infection by employing various strategies, one of which is silencing TLR2 that decreases cytokine production of the cell, thus hampering the host defence (Chandra and Naik, 2008). The differential regulation of pro-inflammatory cytokine production exerted by *Leishmania* plays a crucial role in determining disease control or disease chronicity (Del Vecchio *et al.* 2007; Sharma and Singh, 2009). Yet little is known of the molecules and pathways involved in the modulation of the innate immune response by the parasite.

In order to analyse the effect of *L. mexicana* LPG on cytokine production by human macrophages and on the possible involvement of MAP kinases and TLR2 and TLR4 receptors in this event, we first analysed TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12 p70 and

IL-10 produced by macrophages after stimulation with *L. mexicana* LPG. Our results show that LPG significantly enhances TNF- α , IL-1 β , IL-12p40 and IL-10 production, with only a slight increase of IL-12p70. These results agree with previous studies of our research group, showing that *L. mexicana* LPG differentially induced IL-12p40, IL-12p70, TNF- α and IL-10 production in monocytes and monocyte-derived dendritic cells (moDC): whereas moDC produced higher levels of IL-12p40, monocytes produced more IL-10, yet both cells produced similar amounts of TNF- α (Argueta-Donohue *et al.* 2008). Additionally, our group has previously analysed cytokine production by monocytes of patients with LCL or DCL and healthy donors, stimulated with *L. mexicana* LPG and found that monocytes from healthy donors produced higher amounts of TNF- α , IL-12p40, IL-15, but not IL-18, as compared with monocytes from LCL and DCL patients (Carrada *et al.* 2007). Our current data on cytokine production by macrophages are in accordance with the literature, where cytokine production (TNF- α , IL-10 and IL-6) has been reported in human macrophages or Raw 264.7 infected with *L. major* amastigotes. It is noteworthy however, that this was not observed after stimulation with *L. major* promastigotes (Ben-Othman *et al.* 2009). Variations in the effector responses of macrophages may be related to diverse origins of the cells or to the different *Leishmania* strains, whose amastigotes and promastigotes can have modifications in their surface molecules (Teixeira *et al.* 2005). Additionally, TNF- α production has been shown in U-937 macrophages after stimulation with *Leishmania panamensis* promastigotes (Gallego *et al.* 2011). The role of TNF- α in leishmaniasis has been extensively studied in mouse models showing that this cytokine induces reactive oxygen intermediates and nitric oxide (NO), leading to macrophage activation and parasite control (Wilhelm *et al.* 2001).

In addition to the cytokine production by macrophages, we analysed the ability of *L. mexicana* LPG to activate TLR2 and TLR4 receptors in human macrophages. Our results show that LPG from *L. mexicana* induces the expression of TLR2 and TLR4 on the surface of macrophages. We further analysed if the cytokine production was related to TLR2 and TLR4 activity and found that anti-TLR2 and anti-TLR4 antibodies significantly reduced TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12 p70 and IL-10 production, after LPG stimulation. Similar results were found by Srivastav *et al.* (2012), who showed that purified *L. donovani* LPG induced the production of IL-12 and TNF- α in macrophages, whereas *L. donovani* promastigotes suppressed the production of pro-inflammatory cytokines, despite having LPG on their surface. In contrast to our study, these authors also showed that the increased production of IL-12 induced by LPG in

macrophages was blocked by peptidoglycan, a well-known TLR2 agonist (Srivastav *et al.* 2012). The inhibitory effect on IL-12 production after stimulation with a TLR2 agonist reported by this author may be due to the amounts of the stimulus used, since excessive stimulation can lead to the expression of inhibitory molecules. The production of cytokines (IFN- γ , IL-12 and IL-10) in PBMC after TLR2 stimulation was also analysed with *L. major* promastigotes, where partial inhibition of TLR2 by antibodies were shown to reduce cytokine production (Kavoosi *et al.* 2009). Other studies performed in a murine model of leishmaniasis demonstrated that the activation of TLR4 by *L. major* during immunotherapy against leishmaniasis was associated with an increase in the cure rate, since mice with mutation in the TLR4 gene were unable to cure skin lesions (Kropf *et al.* 2004).

The activation of TLR receptors triggers different signal transduction cascades, which include ERK and p38 MAP kinases (Means *et al.* 2000; Jung *et al.* 2006), which lead to the production of pro-inflammatory cytokines (Robinson and Cobb, 1997). We here show the first evidence that *L. mexicana* LPG activates TLR2 and TLR4, leading to ERK and p38 kinase phosphorylation and pro-inflammatory cytokine production in human macrophages. The specific participation of both kinases in cytokine production was proven by inhibition studies, showing that phosphorylation of ERK induced by LPG in macrophages was suppressed by the ERK inhibitor (PD98059) but not by the p38 MAP kinase inhibitor (SB203580). Likewise, the phosphorylation of p38 MAP kinase was decreased by the p38 inhibitor, but not by the ERK inhibitor, thus demonstrating the specificity of these inhibitors. The inhibition of ERK and p38 MAP kinase partially blocked the production of pro-inflammatory cytokines, which was most notorious in the presence of the ERK inhibitor that achieved a reduction of TNF- α , IL-1 β , IL-12p40 and IL-10, but not of IL-12p70 production. For additional evidence to show that activation of TLR2 and TLR4 receptors leads to phosphorylation of ERK and p38 MAP kinases, we used anti-TLR2 and anti-TLR4 antibodies. We observed a decrease in the phosphorylation of both kinases, as well as of the cytokine production, suggesting that these kinases participate in the activation of TLR2 and TLR4 by *L. mexicana* LPG. Our results are consistent with those of Shweash *et al.* (2011), who reported that infection of macrophages deficient in TLR2, TLR4, or in both, with *L. mexicana* promastigotes led to slight decrease in the phosphorylation of p38 in TLR2 -/- macrophages, whereas in the TLR4 -/- macrophages, the phosphorylation of ERK and JNK was abolished (Shweash *et al.* 2011). Our current report is in accordance with various reports that have shown that LPG of various *Leishmania* species leads to activation of MAP kinases (de Veer *et al.* 2003;

Balaraman *et al.* 2005). Thus, *L. major* LPG was shown to simultaneously stimulate three classes of MAP kinases (ERK, p38 and JNK) in J774A.1 macrophages, whereas ERK and p38 MAP kinases were stimulated in RAW-ELAM macrophages (de Veer *et al.* 2003). Both *L. major* and *L. donovani* promastigotes have been shown to induce activation of p38 MAP kinase in human macrophages (Junghae and Raynes, 2002; Ben-Othman *et al.* 2008), whereas *Leishmania amazonensis* amastigotes induce ERK phosphorylation during the infection (Yang *et al.* 2007).

However, contradictory data have shown that wild-type *L. donovani* promastigotes failed to activate phosphorylation of ERK, JNK and p38 MAPK in mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM), yet after IFN- γ treatment, the infected BMDM showed phosphorylation of ERK and p38 MAP kinases, leading to TNF- α production (Prive and Descoteaux, 2000). Furthermore, *L. donovani* promastigotes were also shown to inhibit TLR2 and TLR4 related phosphorylation of p38 MAP kinase, yet ERK showed significant increase in phosphorylation. Thus, the parasite seems to be able to counter regulate p38 MAP kinase and ERK phosphorylation, leading to suppression of IL-12 and induction of IL-10 (Chandra and Naik, 2008). Again, these discrepancies might reflect that macrophages from various origins respond differently or that various *Leishmania* species or surface molecules trigger different signalling pathways.

Previous studies suggested that MAPK and NF- κ B pathways transduce signals triggered by TLRs, after *Leishmania* recognition (Becker *et al.* 2003; de Veer *et al.* 2003; Flandin *et al.* 2006; Ben-Othman *et al.* 2008). As *Leishmania* seems to target molecules upstream in NF- κ B and MAPKs signalling pathways, it will be interesting to analyse different molecules involved in the TLR signalling pathway, including TLR itself (Nomura *et al.* 2000; Li *et al.* 2006; Ben-Othman *et al.* 2009), as well as negative regulators, that might be targeted by various *Leishmania* species.

In conclusion, the present results demonstrate for the first time that *L. mexicana* LPG can induce the production of TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70 and IL-10 by binding to TLR2 and TLR4 receptors which leads to the phosphorylation of ERK and p38 MAP kinases in human macrophages and that the inhibition of TLR2 and TLR4, as well as of ERK and p38 MAP kinases, decreases the production of pro-inflammatory cytokines. The present study helps to clarify the mechanisms by which *L. mexicana* LPG induces the production of pro-inflammatory cytokines. The results are interesting for further research in order to explore the mechanisms by which whole *Leishmania* promastigotes *vs* purified LPG molecules modulate human macrophages and especially those of patients with different disease severity as observed with LCL and DCL.

ACKNOWLEDGEMENTS

Araceli Rojas Bernabé is a student of Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México and supported by CONACyT, México fellowship. The authors are especially grateful to Alma Escalona-Montaña for technical assistance in the Western-blot assays and analysis in ODYSSEY infrared Imaging System. Thanks to Norma Salaiza Suazo and Adriana Ruiz Remigio for technical assistance.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by CONACyT 45052-M, 152433; and PAPIIT-DGAPA, UNAM IN218412.

REFERENCES

- Argueta-Donohue, J., Carrillo, N., Valdes-Reyes, L., Zentella, A., Aguirre-Garcia, M., Becker, I. and Gutierrez-Kobeh, L. (2008). *Leishmania mexicana*: participation of NF-kappaB in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Experimental Parasitology* **120**, 1–9. doi: S0014-4894(08)00095-7 [pii] 10.1016/j.exppara.2008.04.002.
- Balaraman, S., Singh, V. K., Tewary, P. and Madhubala, R. (2005). *Leishmania* lipophosphoglycan activates the transcription factor activating protein 1 in J774A.1 macrophages through the extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase. *Molecular Biochemical Parasitology* **139**, 117–127. doi: S0166-6851(04)00302-0 [pii] 10.1016/j.molbiopara.2004.10.006.
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L. G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A. P., Cabrera, N., Gonzalez, A., Maldonado, C. and Isibasi, A. (2003). *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular Biochemical Parasitology* **130**, 65–74. doi: S0166685103001609 [pii].
- Ben-Othman, R., Guizani-Tabbane, L. and Dellagi, K. (2008). *Leishmania* initially activates but subsequently down-regulates intracellular mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB signaling in macrophages. *Molecular Immunology* **45**, 3222–3229. doi: S0161-5890(08)00094-1 [pii] 10.1016/j.molimm.2008.02.019.
- Ben-Othman, R., Dellagi, K. and Guizani-Tabbane, L. (2009). *Leishmania major* parasites induced macrophage tolerance: implication of MAPK and NF-kappaB pathways. *Molecular Immunology* **46**, 3438–3444. doi: S0161-5890(09)00246-6 [pii] 10.1016/j.molimm.2009.05.337.
- Carrada, G., Caneda, C., Salaiza, N., Delgado, J., Ruiz, A., Sanchez, B., Gutierrez-Kobeh, L., Aguirre, M. and Becker, I. (2007). Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunology* **29**, 117–126. doi: PIM924 [pii] 10.1111/j.1365-3024.2006.00924.x.
- Chandra, D. and Naik, S. (2008). *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clinical Experimental Immunology* **154**, 224–234. doi: CEI3741 [pii] 10.1111/j.1365-2249.2008.03741.x.
- Delgado-Dominguez, J., Gonzalez-Aguilar, H., Aguirre-Garcia, M., Gutierrez-Kobeh, L., Berzunza-Cruz, M., Ruiz-Remigio, A., Robles-Flores, M. and Becker, I. (2010). *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasite Immunology* **32**, 440–449. doi: PIM1205 [pii] 10.1111/j.1365-3024.2010.01205.x.
- Del Vecchio, M., Bajetta, E., Canova, S., Lotze, M. T., Wesa, A., Parmiani, G. and Anichini, A. (2007). Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clinical Cancer Research* **13**, 4677–4685. doi: 13/16/4677 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-07-0776.
- de Veer, M. J., Curtis, J. M., Baldwin, T. M., DiDonato, J. A., Sexton, A., McConville, M. J., Handman, E. and Schofield, L. (2003). MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *European Journal Immunology* **33**, 2822–2831. doi: 10.1002/eji.200324128.
- Feng, G. J., Goodridge, H. S., Harnett, M. M., Wei, X. Q., Nikolaev, A. V., Higson, A. P. and Liew, F. Y. (1999). Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania*

- phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *Journal of Immunology* **163**, 6403–6412. doi: [10.1093/ajph/163n12p6403](https://doi.org/10.1093/ajph/163n12p6403) [pii].
- Flandin, J. F., Chano, F. and Descoteaux, A.** (2006). RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *European Journal of Immunology* **36**, 411–420. doi: [10.1002/eji.200535079](https://doi.org/10.1002/eji.200535079).
- Gallego, C., Golenbock, D., Gomez, M. A. and Saravia, N. G.** (2011). Toll-like receptors participate in macrophage activation and intracellular control of *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Infection and Immunology* **79**, 2871–2879. doi: [10.1128/IAI.01388-10](https://doi.org/10.1128/IAI.01388-10) [pii].
- Ibraim, I. C., de Assis, R. R., Pessoa, N. L., Campos, M. A., Melo, M. N., Turco, S. J. and Soares, R. P.** (2013). Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasite Vectors* **6**, 54. doi: [1756-3305-6-54](https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-54) [pii].
- Jung, S. B., Yang, C. S., Lee, J. S., Shin, A. R., Jung, S. S., Son, J. W., Harding, C. V., Kim, H. J., Park, J. K., Paik, T. H., Song, C. H. and Jo, E. K.** (2006). The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infection and Immunology* **74**, 2686–2696. doi: [10.1128/IAI.74.5.2686-2696](https://doi.org/10.1128/IAI.74.5.2686-2696).
- Junghee, M. and Raynes, J. G.** (2002). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates *Leishmania donovani* infection in macrophages. *Infection and Immunology* **70**, 5026–5035.
- Kavoosi, G., Ardestani, S. K. and Kariminia, A.** (2009). The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology* **136**, 1193–1199. doi: [S0031182009990473](https://doi.org/10.1017/S0031182009990473) [pii].
- Kropf, P., Freudenberg, M. A., Modolell, M., Price, H. P., Herath, S., Antoniazzi, S., Galanos, C., Smith, D. F. and Muller, I.** (2004). Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and Immunology* **72**, 1920–1928.
- Kyriakis, J. M. and Avruch, J.** (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiology Review* **81**, 807–869.
- Li, C. H., Wang, J. H. and Redmond, H. P.** (2006). Bacterial lipoprotein-induced self-tolerance and cross-tolerance to LPS are associated with reduced IRAK-1 expression and MyD88-IRAK complex formation. *Journal of Leukocyte Biology* **79**, 867–875. doi: [10.1189/jlb.0905505](https://doi.org/10.1189/jlb.0905505).
- Liese, J., Schleicher, U. and Bogdan, C.** (2008). The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology* **213**, 377–387. doi: [10.1016/j.imbio.2007.12.005](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.12.005).
- Lu, H. T., Yang, D. D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R. J. and Flavell, R. A.** (1999). Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO Journal* **18**, 1845–1857. doi: [10.1093/emboj/18.7.1845](https://doi.org/10.1093/emboj/18.7.1845).
- Mathur, R. K., Awasthi, A., Wadhone, P., Ramanamurthy, B. and Saha, B.** (2004). Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nature Medicine* **10**, 540–544. doi: [10.1038/nm1045](https://doi.org/10.1038/nm1045) [pii].
- Means, T. K., Golenbock, D. T. and Fenton, M. J.** (2000). The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Reviews* **11**, 219–232. doi: [S1359-6101\(00\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(00)00006-X) [pii].
- Naderer, T., Vince, J. E. and McConville, M. J.** (2004). Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Current Molecular Medicine* **4**, 649–665.
- Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K. and Akira, S.** (2000). Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *Journal of Immunology* **164**, 3476–3479. doi: [10.1093/ajph/164n7p3476](https://doi.org/10.1093/ajph/164n7p3476) [pii].
- Prive, C. and Descoteaux, A.** (2000). *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *European Journal of Immunology* **30**, 2235–2244. doi: [10.1002/1521-CO.2-9](https://doi.org/10.1002/1521-CO.2-9) [pii].
- Robinson, M. J. and Cobb, M. H.** (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 180–186. doi: [S0952-0674\(97\)80061-0](https://doi.org/10.1016/0952-0674(97)80061-0) [pii].
- Sharma, U. and Singh, S.** (2009). Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology* **47**, 412–423.
- Shweash, M., Adrienne McGachy, H., Schroeder, J., Neamatallah, T., Bryant, C. E., Millington, O., Mottram, J. C., Alexander, J. and Plevin, R.** (2011). *Leishmania mexicana* promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. *Molecular Immunology* **48**, 1800–1808. doi: [S0161-5890\(11\)00165-9](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.05.013) [pii].
- Srivastav, S., Kar, S., Chande, A. G., Mukhopadhyaya, R. and Das, P. K.** (2012). *Leishmania donovani* exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response. *Journal of Immunology* **189**, 924–934. doi: [10.1093/jimmunol.1102845](https://doi.org/10.1093/jimmunol.1102845) [pii].
- Suttles, J., Milhorn, D. M., Miller, R. W., Poe, J. C., Wahl, L. M. and Stout, R. D.** (1999). CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 5835–5842.
- Teixeira, M. J., Fernandes, J. D., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Pompeu, M. L., Santana da Silva, J., Brodskyn, C. L., Barral-Netto, M. and Barral, A.** (2005). Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infection and Immunology* **73**, 1191–1195. doi: [10.1128/IAI.73.2.1191-1195](https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.1191-1195).
- Tuon, F. F., Amato, V. S., Bacha, H. A., Almusawi, T., Duarte, M. I. and Amato Neto, V.** (2008). Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infection and Immunology* **76**, 866–872. doi: [10.1128/IAI.01090-07](https://doi.org/10.1128/IAI.01090-07) [pii].
- Underhill, D. M. and Ozinsky, A.** (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current Opinion in Immunology* **14**, 103–110. doi: [S0952-7915\(02\)00304-1](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(02)00304-1) [pii].
- Vargas-Inchaustegui, D. A., Tai, W., Xin, L., Hogg, A. E., Corry, D. B. and Soong, L.** (2009). Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infection and Immunology* **77**, 2948–2956. doi: [10.1128/IAI.00154-09](https://doi.org/10.1128/IAI.00154-09) [pii].
- Vitale, G., Bernardi, L., Napolitani, G., Mock, M. and Montecucco, C.** (2000). Susceptibility of mitogen-activated protein kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochemical Journal* **352** (Pt 3), 739–745.
- Whitaker, S. M., Colmenares, M., Pestana, K. G. and McMahon-Pratt, D.** (2008). *Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4. *Infection and Immunology* **76**, 2149–2156. doi: [10.1128/IAI.01528-07](https://doi.org/10.1128/IAI.01528-07) [pii].
- Wilhelm, P., Ritter, U., Labbow, S., Donhauser, N., Rollinghoff, M., Bogdan, C. and Korner, H.** (2001). Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *Journal of Immunology* **166**, 4012–4019.
- Yang, Z., Mosser, D. M. and Zhang, X.** (2007). Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. *Journal of Immunology* **178**, 1077–1085. doi: [10.1093/ajph/178n2p1077](https://doi.org/10.1093/ajph/178n2p1077) [pii].