



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS AMASTIGOTES DE DOS
CEPAS DE *Leishmania mexicana* AISLADAS DE
PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA
LOCALIZADA Y DIFUSA EN LA INHIBICIÓN DE LA
APOPTOSIS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

OSCAR JESÚS OLVERA SALAS



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH

Cd. Universitaria, D. F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
Oscar Jesús
Olvera
Salas
5511830826
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307244279
2. Datos del tutor
Dra.
Laila
Gutiérrez
Kobeh
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Julio Eduardo Roque
Morán
Andrade
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Lilián
Yépez
Mulia
5. Datos del sinodal 3
Dra.
María Magdalena
Aguirre
García
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe
7. Datos del trabajo escrito
Análisis del efecto de los amastigotes de dos cepas de *Leishmania mexicana* aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y difusa en la inhibición de la apoptosis de células dendríticas humanas. 71p. 2015.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, gracias por siempre estar, por todo el apoyo y amor que me han dado. Hoy he llegado hasta aquí gracias a ustedes, los amo con todo el alma.

A Mariana y Daniel, por el apoyo incondicional y todos los momentos vividos que me han dado grandes enseñanzas, los adoro hermanitos.

A Chris, mosi, gracias por tanto... llegaste a iluminar mi vida, gracias por todas las enseñanzas y los ánimos para sacar este proyecto. Siempre te estaré agradecido. Mano en el ojo!

A Ferny, mi gran amiga, gracias por compartir nuestros logros, por el apoyo, gracias por toda la confianza y ser mi cómplice en tantas aventuras, mi vida no sería igual sin ti, te quiero tanto...

A Omar, que después de tantos años de amistad, te has convertido en un miembro más de mi familia, gracias por tu apoyo en distintos aspectos de mi vida, y ya ves, no fue hasta el 2020, jaja, te quiero hermano.

A mis amigos CCH'ros, los mejores que pude haber encontrado, gracias por todos los momentos que hemos vivido juntos, espero que nuestros caminos nunca se separen.

A mis amigos de la facultad, por todos los momentos que pasamos en estos años, siempre estarán en mi mente todos esos recuerdos tan padres.

A la Dra. Laila, por todo el apoyo durante este tiempo, por los consejos y todos los conocimientos que con tanta pasión me ha transmitido, es una persona admirable, qué orgullo que la UNAM esté representada por personas como usted, muchas gracias.

A mis sinodales, la Dra. Magdalena Aguirre, la Dra. Lilián Yépez, la Dra. Laura Kawasaki y el Dr. Julio Morán, por la disposición para revisar mi tesis y realizar observaciones tan valiosas que hicieron de éste, un mejor trabajo.

A Arturo, Alma, Jorge y Jesús, por el apoyo durante mi estancia en el lab, por sus enseñanzas y su ayuda en la realización de los experimentos y su análisis. A Ana, Ilse, Omar y Fabián, que hicieron que esta etapa fuera más divertida.

Al súper equipo de bioterio LEI, gracias por el apoyo, con los permisos de cambio de horario, por soportar a Elena y echarme porras para sacar la tesis.

A todos mis familiares y amigos que estuvieron a lo largo de este tiempo, que siempre tuvieron palabras de aliento y las mejores vibras, muchas gracias!

Se agradece al proyecto IN217913 PAPIIT DGAPA UNAM, por el apoyo otorgado para a realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A MIS PADRES POR SU AMOR INCONDICIONAL,
INFINITAS GRACIAS

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 El sistema inmune	12
1.1.1 La respuesta inmune innata	12
1.1.2 La respuesta inmune adaptativa	13
1.2 Los monocitos.....	13
1.3 Las células dendríticas.....	15
1.3.1 Maduración de las células dendríticas	16
1.3.2 Subpoblaciones de las células dendríticas humanas.....	16
1.3.2.1 Células dendríticas plasmacitoides	17
1.3.2.2 Células dendríticas convencionales.....	18
1.3.2.3 Células dendríticas derivadas de monocitos humanos	19
1.3.2.4 Células de Langerhans	20
1.3.2.5 Células dendríticas de la dermis.....	20
1.4 El parásito <i>Leishmania</i>	21
1.4.1 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	21
1.4.2 La leishmaniasis	23
1.4.3 Formas clínicas de la leishmaniasis	23
1.4.3.1 Leishmaniasis cutánea.....	24
1.4.3.1.1 Leishmaniasis cutánea localizada	24
1.4.3.1.2 Leishmaniasis cutánea difusa	25
1.4.3.2 Leishmaniasis mucocutánea.....	26
1.4.3.3 Leishmaniasis visceral.....	26
1.4.4 Distribución de la leishmaniasis	27
1.4.4.1 Distribución mundial de la leishmaniasis	27
1.4.4.2 Distribución e incidencia de la leishmaniasis en México	28

1.5 Respuesta inmune contra <i>Leishmania</i> y mecanismos de evasión por parte del parásito	29
1.6 Apoptosis	32
1.6.1 Vías de inducción de la apoptosis	33
1.6.1.1 Vía perforina/granzima	33
1.6.1.2 Vía del retículo endoplásmico	34
1.6.1.3 Vía extrínseca	34
1.6.1.4 Vía intrínseca	35
1.6.1.4.1 Control y regulación de la vía intrínseca	35
1.6.2 Las caspasas	37
1.6.2.1 La caspasa 3	37
1.6.3 Inhibición de la apoptosis por parásitos intracelulares	38
1.6.4 Modulación de la apoptosis por el parásito <i>Leishmania</i>	39
2. JUSTIFICACIÓN	41
3. HIPÓTESIS	42
4. OBJETIVOS	43
4.1 Objetivo general	43
4.2 Objetivos particulares	43
5. MATERIAL Y MÉTODOS	44
5.1 Purificación de las células dendríticas derivadas de monocitos a partir de sangre periférica humana	44
5.2 Caracterización de las moDC por citometría de flujo	45
5.3 Cultivo de amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	45
5.4 Tratamiento de las moDC	46
5.5 Análisis de la fragmentación del DNA mediante la técnica de TUNEL	47
5.6 Análisis de la activación de la caspasa 3 por Western blot	47
5.7 Análisis de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl- X _L por Western blot	48

6. RESULTADOS	49
6.1 Caracterización de las moDC por citometría de flujo.....	49
6.2 <i>Leishmania mexicana</i> inhibe la apoptosis inducida con camptotecina de las moDC	51
6.3 <i>Leishmania mexicana</i> induce la expresión de la proteína anti- apoptótica Bcl X _L	53
6.4 La infección con <i>Leishmania mexicana</i> inhibe la activación de la caspasa 3 en las moDC de manera diferencial entre las cepas	55
7. DISCUSIÓN.....	57
8. CONCLUSIONES	63
9. BIBLIOGRAFÍA.....	64

ABREVIATURAS

APC	células presentadoras de antígenos
BSA	albúmina sérica bovina
CCL4	MIP-1 β (proteína inflamatoria 1 β de M \emptyset)
CCL5	RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)
CCL21	quimiocina secundaria de tejido linfoide
CCR1	receptor para MIP-1 α (proteína inflamatoria 1- α de M \emptyset)
CCR2	receptor MCP-1 (proteína quimio-atrayente-1 de monocitos)
CCR5	receptor- β de membrana para quimiocinas
CCR6	receptor para MIP-3 α (proteína inflamatoria-3 α de M \emptyset)
CCR7	receptor para MIP-3 β (proteína inflamatoria-3 β de M \emptyset)
CD1a	molécula presentadora de antígenos no clásica del grupo 1-a
CD1c	molécula presentadora de antígenos no clásica del grupo 1-b
cCD	células dendríticas convencionales
CD14	receptor para lipopolisacárido
CD16	receptor de baja afinidad para IgG
CD11b	cadena α del receptor para C3b del complemento
CD11c	cadena α del receptor para moléculas de adhesión como ICAM- 1
CD32	receptor de baja afinidad para IgG
CD40	miembro de la superfamilia de receptores del TNF
CD45	antígeno común de leucocitos
CD64	receptor de alta afinidad para IgG
CD86	antígeno de activación de linfocitos T
CD123	receptor para la cadena α de IL-3
CD141	cofactor para trombina
CD163	receptor scavenger para el complejo hemoglobina-haptoglobina
CD207	receptor para células de Langerhans
CD326	receptor para prolina

CD	células dendríticas
DISC	complejo de señalización de inducción de muerte
ICAM	molécula de adhesión intracelular
IFN- α	Interferón alfa
IFN- β	Interferón beta
IFN- γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IL-	Interleucina-
iNOS	sintasa inducible del óxido nítrico
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
LaC	células de Langerhans
LC	leishmaniasis cutánea
LCD	leishmaniasis cutánea difusa
LCL	leishmaniasis cutánea localizada
LMC	leishmaniasis mucocutánea
LPG	lipofosfoglicano
LV	leishmaniasis visceral
MHC clase II	complejo mayor de histocompatibilidad clase II
moDC	células dendríticas convencionales
M \emptyset	macrófagos
PAMP's	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	amortiguador de fosfatos salino
pCD	células dendríticas plasmacitoides
PRR's	receptores de reconocimiento de PAMP's
PS	fosfatidilserina
RE	retículo endoplásmico
RER	retículo endoplásmico rugoso
RIA	respuesta inmune adaptativa
RII	respuesta inmune innata
NK	células asesinas naturales

TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
TLR's	receptores tipo Toll
XCR1	receptor para linfotactina-1 y 2

RESUMEN

Leishmania es un parásito intracelular obligado causante de un amplio espectro de enfermedades humanas en 88 países alrededor del mundo, presentando tres principales cuadros clínicos: la leishmaniasis cutánea, que se divide en leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y en leishmaniasis cutánea difusa (LCD), la leishmaniasis mucocutánea (LMC) y la leishmaniasis visceral (LV). El cuadro clínico que se desarrolle dependerá del estado inmunitario del huésped y de la especie de *Leishmania*, sin embargo, una misma especie es capaz de provocar distintos cuadros clínicos. Tal es el caso de *L. mexicana* que es el agente causal de la LCL y la LCD. En su ciclo de vida, *Leishmania* presenta dos estadios morfológicos: el promastigote, que habita en el tracto digestivo de los vectores y el amastigote, que habita en el huésped definitivo. Las principales células que hospedan a los amastigotes de *Leishmania* son los macrófagos (M ϕ) y las células dendríticas (CD), las cuales presentan una gran variedad de mecanismos para eliminar infecciones intracelulares, tales como la activación de la apoptosis. A su vez, los organismos patogénicos han desarrollado estrategias que les permiten evadir la respuesta que ejercen las células ante su presencia. Se ha demostrado que *Leishmania* es capaz de inhibir la apoptosis tanto natural como inducida. En nuestro grupo de trabajo se demostró que *L. mexicana* es capaz de inhibir la apoptosis de células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, *L. mexicana* es causante de dos cuadros clínicos distintos, lo cual puede indicar que el desarrollo de la enfermedad hacia LCL o LCD, depende en gran medida de las características diferenciales que se presentan entre las cepas de la misma especie. Por dicha razón, en el presente trabajo se compararon dos cepas de *L. mexicana*, una aislada de un paciente con LCL (Lac) y otra aislada de un paciente con LCD (DIACT), demostrando que ambas cepas inhiben la apoptosis de las moDC y que la inhibición se presenta de una manera diferencial, en donde la DIACT muestra una mayor efectividad para inhibir la apoptosis de las moDC. Estas diferencias podrían ser de gran relevancia en la patogenicidad de las cepas y el desarrollo de la enfermedad en el huésped mamífero.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El sistema inmune

El cuerpo humano se encuentra en constante exposición a una gran variedad de agentes infecciosos, tales como virus, bacterias, hongos y protozoarios. Debido a esto, a lo largo de la evolución se han seleccionado diversos mecanismos de defensa para combatir las distintas afecciones que provocan daños al ser humano.

Las primeras barreras físicas y bioquímicas para impedir la entrada de microorganismos al cuerpo humano son las superficies epiteliales, que involucran a la piel, la mucosa gastrointestinal, respiratoria y del tracto urogenital. Se secretan también sustancias antimicrobianas que incluyen a la lisozima y las defensinas. Sin embargo, cuando algún patógeno logra atravesar dichas barreras, el sistema inmune del huésped requiere de mecanismos ejercidos por la respuesta inmune innata (RII) y la respuesta inmune adaptativa (RIA) (Moll, 2003).

1.1.1 La respuesta inmune innata

La primera etapa de la defensa del huésped ante los microorganismos invasores depende de mecanismos de la RII, la cual se divide a su vez en la respuesta celular, que incluye a los monocitos, los macrófagos (MØ), las células dendríticas (CD), las células asesinas naturales (NK), los neutrófilos, los eosinófilos y las células cebadas, las cuales presentan una amplia variedad de funciones tales como la fagocitosis, la lisis directa de patógenos, la presentación de antígenos y la producción de mediadores químicos (Birnbaum y Craft, 2011). La segunda rama de la RII es la respuesta humoral que incluye a factores solubles tales como componentes del complemento, citocinas y quimocinas (Moll, 2003). En la RII no se presenta una memoria inmunológica, ya que las células participantes producen una respuesta por medio del reconocimiento de componentes conservados a lo largo de la evolución en los organismos patogénicos. Dichos componentes se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) (Zaph *et al.*, 2004) y su reconocimiento se da a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR's) (Akira *et al.*, 2001; Medzhitov y Janeway, 2000), tales como los receptores intracelulares tipo NOD (Medzhitov, 2001) y los receptores scavenger (Gomes *et al.*, 2009), además de la familia de los receptores tipo

toll (TLR's), los cuales son sumamente importantes en la inmunidad en contra de distintos agentes patogénicos.

1.1.2 La respuesta inmune adaptativa

Cuando los organismos patogénicos logran evadir los mecanismos de defensa que se presentan en la RII, es necesaria la activación de la RIA, la cual está asociada con la activación de células efectoras tales como los linfocitos B y T, que son capaces de reconocer antígenos microbianos específicos, además de generar una memoria inmunológica para prevenir infecciones posteriores con los mismos organismos patogénicos (Moll, 2003). Sin embargo, el hecho de que se lleve a cabo la RIA, no indica que la RII esté inactiva, ya que ambas pueden encontrarse actuando conjuntamente.

Una de las células que son pieza fundamental entre la RII y la RIA son las CD, que son células presentadoras de antígenos profesionales (APC) ya que presentan MHC- I y II . Dichas células presentan los antígenos microbianos a los linfocitos T CD4 y TCD8, gracias a que poseen MHC- I y II y junto con la coestimulación los activan y conducen a la polarización de una respuesta inmune apropiada (Moll, 2003). Las CD representan un grupo heterogéneo de células y se han subdividido de acuerdo a la localización, origen y función en diferentes grupos entre los que encontramos a las CD plasmacitoides (pCD), las CD convencionales (cCD) y las que se derivan de los monocitos (moDC).

1.2 Los monocitos

Los monocitos son células pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear y fueron descritos por primera vez en circulación como precursores de macrófagos tisulares. Posteriormente, Sallusto y Lanzavecchia (1994), demostraron la capacidad de los monocitos para diferenciarse a CD. Dichos autores reportaron la generación de CD a partir de monocitos de sangre periférica humana en cultivos *in vitro* en co-incubación con el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM- CSF) y con IL- 4 (Gordon y Taylor, 2005).

Los monocitos se originan en la médula ósea a partir de un progenitor común mieloide que comparten con los neutrófilos. Posteriormente son liberados a la sangre periférica, donde circulan por varios días antes de llegar a los tejidos y establecerse en ellos para formar subpoblaciones de

células específicas, es decir, subpoblaciones de monocitos que presentan distintos roles fisiológicos o su posterior diferenciación a células derivadas de monocitos tales como las CD y los MØ (Gordon y Taylor, 2005).

La morfología de los monocitos en sangre periférica es heterogénea, varía en tamaño, granularidad y morfología nuclear. Constituyen de un 5 al 10% de los leucocitos totales de sangre periférica humana y expresan grandes cantidades del receptor CD14 (el cual es parte del receptor para lipopolisacárido). La expresión diferencial de marcadores antigénicos en los monocitos de sangre periférica confirma la heterogeneidad de dichas células y provee información sobre las actividades fisiológicas en los distintos subtipos de monocitos.

La expresión diferencial de CD14 el receptor para lipopolisacárido, y CD16, el receptor de baja afinidad para IgG, permite dividir a los monocitos en dos subpoblaciones: las células CD14⁺⁺ CD16⁻, también llamadas “monocitos clásicos”, debido a que este fenotipo fue descrito originalmente. Las células de esta subpoblación son altamente fagocíticas y se encuentran en mayor abundancia en sangre periférica de individuos adultos. La otra subpoblación está conformada por células CD14⁺⁺ CD16⁺ que expresan altas cantidades de MHC clase II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II) (HLA-DR). Las células de ambas subpoblaciones son reclutadas rápidamente a los sitios de infección y tienen un gran potencial para diferenciarse a células tales como MØ y CD (De Kleer *et al.*, 2014). De igual forma, en cultivos *in vitro* de monocitos humanos ambos subtipos pueden diferenciarse a CD en presencia de GM-CSF e IL-4 (Gordon y Taylor, 2005) (Figura 1).

Otro subtipo de monocitos descrito más recientemente se define por la expresión de CD14⁺, CD16⁺ y CD64⁺, el receptor Fc de alta afinidad para IgG. Presentan una alta expresión de HLA-DR, CD86 y una elevada actividad estimulante de linfocitos T. En similitud con los monocitos CD14⁺⁺ CD16⁻, estas células presentan una actividad fagocítica alta y producen cantidades elevadas de citocinas tales como IL-16 y TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) (Gordon y Taylor, 2005).

Monocitos		Marcadores de superficie	Distribución
	Clásicos	CD14++CD16-	~85%
	Intermedios	CD14++CD16+	~5%
	No clásicos	CD14+CD16++	~10%

Figura 1. Poblaciones de monocitos en sangre periférica humana. Se indica la expresión de los marcadores de cada subpoblación, además de los porcentajes de abundancia (Boltjes y Van Wijk, 2014).

1.3 Las células dendríticas

Las CD pertenecen a una familia de células especializadas en el procesamiento y presentación antigénica y representan el 1% de las células mononucleares de sangre periférica humana (Jongbloed *et al.*, 2010). En el estado inmaduro tienen la capacidad de reconocer antígenos, fagocitarlos y procesarlos para posteriormente iniciar y modular una respuesta inmune adaptativa, así como desarrollar memoria inmunológica y tolerancia ante diversos agentes patogénicos (De Kleer *et al.*, 2014). Una vez que las CD entran en contacto con microorganismos o sustancias asociadas con infecciones o inflamación, se inicia el proceso de maduración y migran a los órganos linfoides secundarios. En dichos sitios presentan los antígenos a los linfocitos T vírgenes y se lleva a cabo la polarización de la respuesta de los linfocitos T cooperadores. En esta polarización las CD juegan un papel fundamental, así como las citocinas que se producen. La producción de citocinas tales como IL-12 e IFN- γ polarizan a una respuesta tipo Th-1 que es muy eficaz en el combate de organismos patogénicos intracelulares (Brandonisio *et al.*, 2004).

1.3.1 Maduración de las CD

Las CD inmaduras que se encuentran en tejidos periféricos detectan a los microbios o antígenos microbianos a través del reconocimiento de PAMPs, a los cuales fagocitan para su degradación y procesamiento. Dicho reconocimiento e internalización de las estructuras microbianas induce la maduración de las CD, un proceso que es acompañado por la migración de las CD desde los tejidos periféricos a las zonas ricas en linfocitos T en los ganglios linfáticos. Durante el proceso de maduración, las CD sufren cambios importantes tales como la disminución en la capacidad fagocítica, el aumento en la expresión del MHC clase II y la disminución en la expresión de receptores para quimiocinas inflamatorias tales como CCR1, CCR2, CCR5 y CCR6. Además, se induce la expresión de CCR7, lo cual puede producir una mayor capacidad de respuesta ante la unión con sus ligandos CCL19 (MIP-31) y CCL21 que es producida en los ganglios linfáticos en las áreas donde se encuentran los linfocitos T. De igual manera aumenta la expresión de moléculas co-estimuladoras tales como CD80, CD86 y CD40 y de moléculas de adhesión (Moll H, 2003).

Como resultado de los múltiples cambios en las CD maduras, éstas adquieren la capacidad de desencadenar una respuesta primaria de linfocitos T. Además, la activación por antígenos microbianos induce la producción de citocinas tales como IL-2, IL-12, IFN- γ y TNF- α . Por otro lado, la secreción de citocinas tales como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 promueve una respuesta tipo Th2 que induce en los linfocitos B la producción de IgG1 e IgE. Esta respuesta está implicada en mecanismos efectores de protección contra las infecciones por helmintos e inhibe la actividad de los M ϕ , lo que a su vez contribuye a la supervivencia de parásitos intracelulares (Silviera *et al.*, 2009).

1.3.2 Subpoblaciones de células dendríticas humanas

Las CD son un grupo heterogéneo de células y se subdividen de acuerdo a la localización anatómica, origen y función. En sangre periférica se han descrito tres principales subpoblaciones de CD basadas en la expresión de marcadores de superficie: Las células dendríticas plasmacitoides (pCD) y dos tipos de células dendríticas convencionales o clásicas (cCD). Estos subgrupos pueden encontrarse también en el bazo y las amígdalas (Boltjes y Van Wijk, 2014) (Figura 2). Los progenitores de las CD se originan en la médula ósea y se dirigen al torrente sanguíneo para dar lugar a las CD residentes, migratorias y a las que se diferencian posteriormente *in situ*. Las CD residentes se localizan en los tejidos linfoides, donde reconocen y procesan antígenos de la linfa y

la sangre para presentarlos a los linfocitos T locales. En los tejidos no linfoides las CD migran desde dichos tejidos a los ganglios linfáticos donde presentan antígenos derivados de los tejidos a los linfocitos T. Por otra parte, existen subpoblaciones de CD localizadas en la epidermis denominadas células de Langerhans (LaC) y CD localizadas en la dermis, denominadas por esta razón, células dendríticas de la dermis.

Células dendríticas	Marcadores de superficie	Distribución
 CD1c ⁺	CD1c ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺⁺	45-50%
 CD141 ⁺	CD11c XCR1	5-10%
 pDC	CD11c ⁺ CD123 ⁺ BDCA-2 ⁺ BDCA-4 ⁺	45-50%

Figura 2. Poblaciones de CD en sangre periférica humana. Se muestra la expresión de los marcadores utilizados para identificar a las distintas poblaciones de CD, además de los porcentajes de abundancia de cada grupo (Boltjes y Van Wijk, 2014).

1.3.2.1 Las células dendríticas plasmacitoides (pCD)

Las pCD en estado inactivado presentan una morfología no-dendrítica, se caracterizan por la expresión de CD123, CD11c, CD303 (BCDA- 2) y CD304 (BCDA- 4 o Neutrofilina-1) y se encuentran circulando en la sangre y los ganglios linfáticos. Una característica muy importante de las pCD es la capacidad para secretar rápidamente cantidades elevadas de interferones tipo I en respuesta a infecciones virales. Expresan TLR7 y TLR9 que detectan ácidos nucleicos derivados de virus,

bacterias y células muertas. Dichos receptores, al contacto con sus ligandos, desencadenan una cascada de señalización que resulta en la secreción de IFN- α , IFN- β e IFN- γ . En un estado normal, las pCD tienen poca capacidad para estimular linfocitos T-CD4⁺ debido a la presencia de niveles bajos de MHC-II y a la baja expresión de receptores de moléculas co-estimuladoras, así como una capacidad limitada para fagocitar antígenos (Boltjes y Van Wijk, 2014).

En ausencia de estímulos, las pCD parecen ser tolerogénicas y están implicadas en la inducción de anergia de los linfocitos T y el desarrollo de los linfocitos T reguladores. Posteriormente a la estimulación, las pCD adquieren una morfología de CD, aumenta la expresión de HLA-DR y moléculas co-estimuladoras y se diferencian a APC capaces de activar células CD4 vírgenes (Boltjes y Van Wijk, 2014).

1.3.2.2 Las células dendríticas convencionales (cCD)

Las cCD se clasifican en los subtipos CD1c⁺ y CD141⁺, ambos se encuentran en la sangre, el bazo y los ganglios linfáticos, así como en tejidos no linfoides tales como la piel, el hígado, el pulmón y el intestino. Las células del subtipo CD1c⁺ co-expresan CD11b, CD1c y niveles altos de CD11c, mientras que las del subtipo CD141⁺ expresan niveles bajos de CD11c y escasos CD11b. En comparación con otros subtipos de CD y monocitos, el marcador selectivo para las células del subtipo CD141⁺ es el receptor para quimiocinas XCR1. Ambos subtipos de cCD difieren en los patrones de expresión de los TLRs: las CD1c⁺ expresan todos los TLRs con excepción de TLR9 y las CD141⁺ expresan niveles altos de TLR3 y TLR10, baja expresión de TLR1, TLR2, TLR6 y TLR8 y carecen de TLR4, TLR5, TLR7 y TLR9 (Jongbloed *et al.*, 2010). Además, las cCD CD141⁺ producen cantidades elevadas de IL-12p70, IFN- β , IFN- γ , CXCL10/IP-10 y CCL5 después de la unión del TLR3 con su ligando: poly I:C. Por otra parte, las cCD CD1c⁺ secretan proteínas tales como IL-1 β , IL-12, IL-6, TNF- α , CXCL8/IL-8, CCL3, CCL4, CCL5 y CCL10 posteriormente a la estimulación del TLR3 (Boltjes y Van Wijk, 2014). Generalmente las cCD tienen un tiempo de vida corto, viven de 3 a 5 días aproximadamente y en los individuos adultos son remplazadas constantemente por precursores presentes en la médula ósea (Boltjes y Van Wijk, 2014; De Kleer *et al.*, 2014).

En cuanto a la presentación antigénica, las cCD CD141⁺ y las CD1c⁺ tienen capacidades similares, presentan proteínas a linfocitos T-CD4⁺ autólogas con eficacia semejante, expresan niveles parecidos de MHC-I y tienen la misma eficiencia para la presentación de antígenos peptídicos a los linfocitos T-CD8⁺. Por otro lado, tanto las pCD como las cCD presentan una baja actividad

proteolítica, lo cual permite que las proteínas y los péptidos antigénicos que procesan no se degraden y se lleve a cabo una presentación de antígenos eficaz (Boltjes y Van Wijk, 2014).

Debido a los distintos perfiles de expresión de los TLRs, citocinas y quimiocinas, la polarización de los linfocitos T puede diferir según los distintos subtipos de CD que activen a dichas células. La expresión elevada de TLR3 en las CD141⁺ y la capacidad para producir grandes cantidades de IFN- β , CCL10 e IL-12p70 inducen una polarización Th-1, al igual que en las CD1c⁺ al activarse receptores tales como el TLR3. En general, las CD sanguíneas no inducen una polarización tipo Th-2, únicamente las cCD residentes de ganglios linfáticos inducen tanto respuestas Th-1 como Th-2 y las células de Langerhans inducen principalmente respuestas Th-2 (Boltjes y Van Wijk, 2014).

1.3.2.3 Las células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC)

Como consecuencia de procesos inflamatorios o infecciosos, los órganos linfoides y no linfoides pueden albergar también a CD que se originan a partir de monocitos. Dichas células son llamadas células dendríticas derivadas de monocitos (moDC) o células dendríticas inflamatorias (iCD) (De Kleer I., *et al.*, 2014; Boltjes A. y Van Wijk F., 2014). La mayoría de las moDC se caracterizan por la expresión de Ly6C, CD11b, MHC-II y niveles intermedios de CD11c (Kim y Lee, 2014). Un marcador distintivo de estas células es el CD64, que es el receptor Fc1-gamma (Fc γ RI) (Plantinga *et al.*, 2013).

Cuando las CD son diferenciadas a partir de monocitos cultivados en presencia de de GM-CSF e IL-4, las moDC resultantes mantienen la capacidad de captura y presentación de antígenos tal como lo hacen la CD inmaduras *in vivo*. Además, presentan una típica morfología con dendritas, expresan niveles altos de MHC-I y II, CD1, CD40, CD44, ICAM-1 y carecen de CD14 (Sallusto y Lanzavecchia, 1994).

En experimentos *in vivo* se ha demostrado que los monocitos de sangre periférica infectados con el parásito *Leishmania major* se diferencian a moDC (León *et al.*, 2007). Además, se ha observado que los monocitos que son reclutados a sitios inflamatorios se pueden diferenciar a moDC localmente y que la diferenciación está controlada por citocinas como por ejemplo el GM-CSF (Le Borgne *et al.*, 2007; Salazar *et al.*, 2007). Además, las moDC son células muy importantes en los procesos inflamatorios, ya que se ha demostrado que en la infección con distintos organismos patógenos como por ejemplo *Listeria monocytogenes* se puede diferenciar un tipo de moDC

denominadas Tip-CD, que tienen la capacidad de producir cantidades elevadas de iNOS y TNF- α (Serbina *et al.*, 2003).

1.3.2.4 Las células de Langerhans (LaC)

Las LaC son un ejemplo típico de las CD centinelas, esto debido a la localización en la epidermis, la presencia de dendritas protuberantes y la captura de antígenos extraños en la piel y migración constante a los ganglios linfáticos lo que las hace la primera barrera inmunológica de la piel. En los humanos las LaC se identifican por la expresión de CD11c, CD32, CD45, Fc ϵ R1, niveles altos de CD1a, CD207/langerina, CD324/E-cadherina, CD326/EpCAM y HLA-DR. En condiciones normales, las LaC son reemplazadas continuamente por precursores residentes, mientras que en procesos inflamatorios son reemplazadas por precursores sanguíneos (Boltjes y Van Wijk, 2014).

1.3.2.5 Las células dendríticas de la dermis

En la dermis de los humanos las CD se dividen clásicamente en CD14⁺ y CD1a⁺. Las CD14⁺ muestran una expresión variable de CD1a, CD1c y CD163, similar a los M \emptyset de la dermis, que también expresan CD14, pero carecen de CD1c y presentan niveles altos de CD163. Las células dendríticas de la dermis expresan niveles bajos de CD80 y CD86 y nos son inductores eficientes de la proliferación de linfocitos T vírgenes, sin embargo, son eficientes en el reconocimiento de antígenos y tienen la habilidad para inducir a los linfocitos T reguladores a producir elevadas cantidades de IL-10 (Boltjes y Van Wijk, 2014).

Por otro lado, las CD CD1a⁺ expresan niveles altos de CD80 y CD86 y tienen un gran potencial para inducir la proliferación de linfocitos T-CD4 y T-CD8. Investigaciones recientes, describen a las CD CD1a como un grupo de células heterogéneo contrario a lo que se conocía anteriormente ya que se ha demostrado que la mayoría de las células CD1a⁺, son CD1c^{high}, pero también se presentan las CD1c^{low} que mantienen niveles altos de CD141. Por otra parte, estas células no son buenas presentadoras de antígenos y su función es la de inducir a los linfocitos T reguladores mediante la producción de IL-10 (Boltjes y Van Wijk, 2014).

Gracias a las diversas funciones que las CD llevan a cabo, entre las que destaca la conexión de la RII con la RIA, son de suma importancia en la inmunidad contra una gran variedad de organismos patógenos entre los que se presentan bacterias como *Escherichia coli* (Pulendran *et al.*, 1999) y

protozoarios tales como *Toxoplasma gondii* (Carmen *et al.*, 2006), *Cryptosporidium parvum* (Mele *et al.*, 2004) y *Leishmania mexicana* (Gutiérrez *et al.*, 2013).

1.4 El parásito *Leishmania*

Leishmania es un parásito protozoario intracelular de la Familia Trypanosomatidae (Orden Kinetoplastida), causante de un amplio espectro de enfermedades humanas en más de 80 países alrededor del mundo. Hay aproximadamente 12 millones de personas infectadas y 350 millones de personas en riesgo (Alvar *et al.*, 2006).

1.4.1 Ciclo de vida de *Leishmania*

En el ciclo de vida, *Leishmania* presenta dos estadios morfológicos: el promastigote flagelado y el amastigote. El promastigote mide de 1.5 a 3 μm x 10 a 20 μm , vive y se duplica en nichos extracelulares del tracto digestivo de los vectores (hembras hematófagas de mosquitos del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo o *Phlebotomus* en el Viejo Mundo). Cuando el vector se alimenta de sangre, los promastigotes son inoculados en la piel del huésped mamífero. Los promastigotes que logran atravesar las barreras del sistema inmune son fagocitados por células tales como M ϕ , neutrófilos y CD (Solbach y Laskay, 2000; Silveira *et al.*, 2009). Una vez dentro de la célula huésped, el promastigote se diferencia al amastigote, que es la forma intracelular obligada, carece de flagelo y mide entre 2.5 y 6.8 μm . El amastigote se duplica dentro del fagolisosoma hasta lisar a la célula e infectar a nuevas células (Kane y Mosser, 2000). La transición de promastigote a amastigote en el ciclo de vida de *Leishmania* es pieza fundamental para el establecimiento de la infección en el huésped mamífero. Estudios *in vitro* demuestran que dos condiciones microambientales en el fagolisosoma de los macrófagos son suficientes para que se lleve a cabo esta diferenciación: una temperatura entre los 33 y 37 °C y un pH de 5.5 (McConville y Handman, 2007) (Figura 3).

Leishmania, además de fluctuar entre los nichos del vector y el huésped, también puede encontrarse en reservorios. Los distintos reservorios varían dependiendo de la región geográfica en la que se localicen y entre éstos se encuentran distintos animales domésticos tales como perros y caballos y animales salvajes tales como osos hormigueros, zarigüeyas y ratas silvestres (Gramiccia y Grandoni, 2005). La transmisión del parásito puede ocurrir entre caninos y especies

de roedores y en los humanos a través de la picadura de los mosquitos. Sólo se tienen reportes de transmisión humano-humano en el caso de *L. tropica* (Sanguenza *et al.*, 2003).

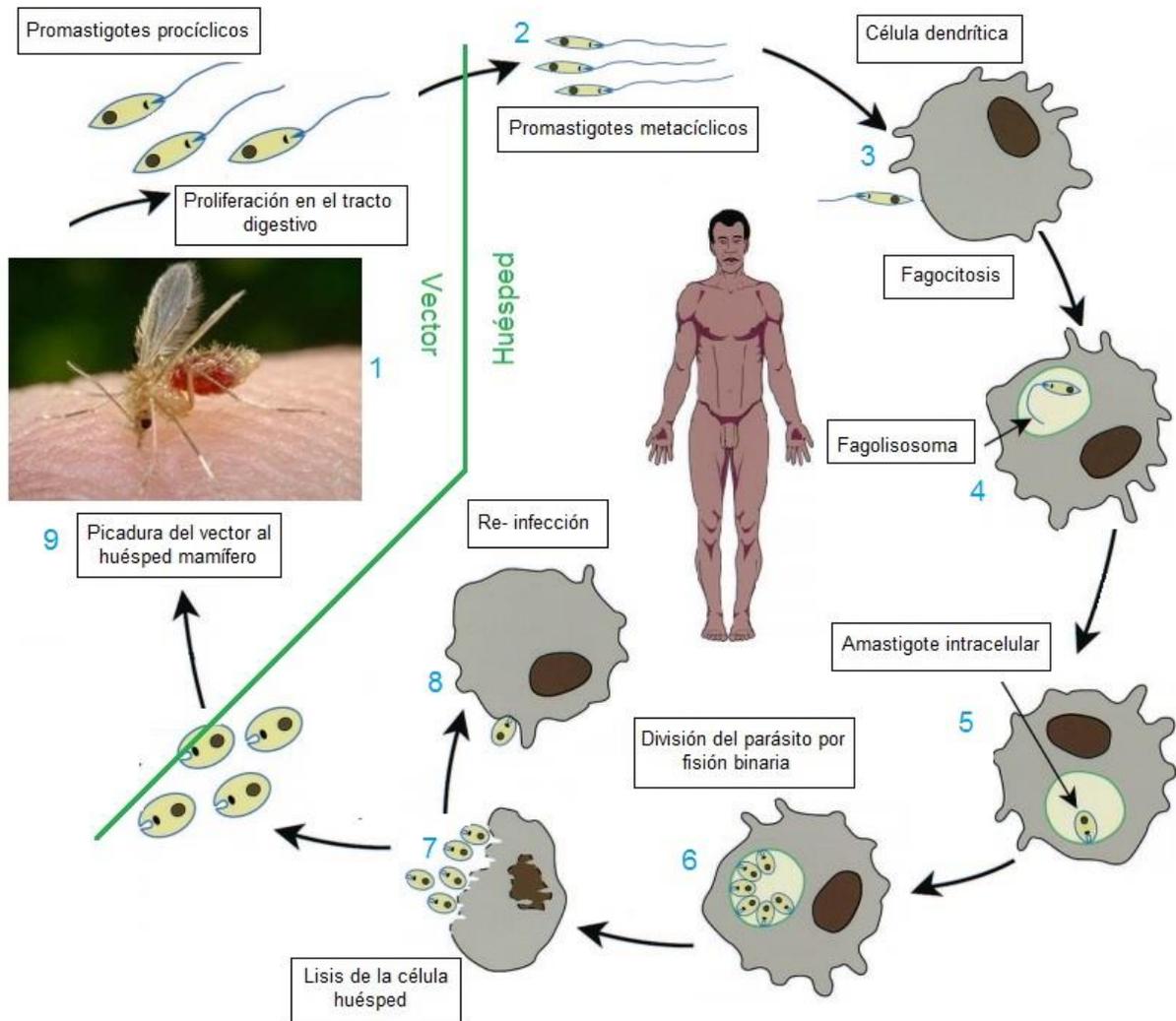


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. 1) El vector inocula por medio de la picadura a los promastigotes procíclicos que se encuentran proliferando en el tubo digestivo. 2) Los promastigotes procíclicos se diferencian a promastigotes metacíclicos en el huésped mamífero. 3) Los promastigotes metacíclicos son reconocidos y fagocitados por células del sistema fagocítico mononuclear. Dentro de la célula, el lisosoma se fusiona con el fagosoma formando un fagolisosoma, en el cual se encuentran los parásitos. 5) Los promastigotes se diferencian al estadio de amastigote dentro del fagolisosoma. 6) Los amastigotes se dividen por fisión binaria. 7) Se produce la lisis de la célula huésped, dando lugar a la liberación de los amastigotes. 8) Los amastigotes liberados son fagocitados por otras células del sistema fagocítico mononuclear. 9) El ciclo continúa cuando un vector se alimenta de sangre con células infectadas con amastigotes y al picar a otro huésped mamífero lo infecta (Modificado de Handman, 2001).

1.4.2 La leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad de suma importancia a nivel mundial que se distribuye principalmente en zonas tropicales y subtropicales a lo largo del planeta. El cuadro clínico que se presenta en el huésped dependerá del complejo huésped-parásito, es decir, tanto de la patogenicidad y la especie de *Leishmania*, como el estado inmunitario del huésped influyen en la manifestación clínica que se desarrollará (Solbach y Laskay, 2000; Lupi *et al.*, 2009; Markikou *et al.*, 2012). Se han identificado aproximadamente 30 especies de *Leishmania*, de las cuales alrededor de 20 son patógenas para mamíferos. En México, la leishmaniasis es un problema de salud pública y se ha encontrado en alrededor de 22 estados (Monroy, 2002).

1.4.3 Formas clínicas de la leishmaniasis

Se presentan principalmente tres formas clínicas de la leishmaniasis: la leishmaniasis cutánea (LC) que afecta únicamente a la piel, la leishmaniasis mucocutánea (LMC) que afecta a la piel y superficies mucosas y la leishmaniasis visceral (LV) que afecta órganos del sistema retículo endotelial (Lupi O *et al.*, 2009; Soong, 2008). La especie de *Leishmania* infectante es un factor importante en el desarrollo de las diferentes manifestaciones clínicas y existen seis principales especies patógenas del hombre (Tabla 1).

Tabla 1. Manifestaciones clínicas producidas por distintas especies de *Leishmania* que son patógenas para el hombre y los vectores transmisores (Tomado de Handman, 2001).

Manifestación clínica	Vector	Especie
LC, LCD	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i> <i>Lutzomyia olmeca</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
LC	<i>Phlebotomus papatsi</i>	<i>Leishmania major</i>
LC	<i>Phlebotomus sergenti</i>	<i>Leishmania tropica</i>
LC, LMC	<i>Phlebotomus longipes</i>	<i>Leishmania aethiopica</i>
LC, LMC	<i>Lutzomyia umbratilis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
LV (kala azar)	<i>Phlebotomus argentipes</i> <i>Lutzomyia longipalpis</i>	<i>Leishmania donovani</i>

1.4.3.1 Leishmaniasis cutánea

A nivel mundial, la LC es la forma clínica más común de leishmaniasis con un estimado del 10-75% global (Alvar *et al.*, 2012). Se pueden encontrar dos variantes, la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

En cuanto al periodo de incubación, las personas pueden ser portadoras de algunas especies de *Leishmania* sin presentar síntomas durante periodos que van de una a dos semanas o inclusive por tiempos más prolongados de hasta tres años. Sin embargo, la mayoría de los casos se hacen evidentes en lapsos de 2 a 6 meses (Iowa State University, 2010).

1.4.3.1.1 Leishmaniasis cutánea localizada

En el Nuevo Mundo los principales agentes causales son: *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. panamensis* y en el Viejo Mundo *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*, además de algunas cepas de *L. infantum* que pueden causar LC sin afectar a los órganos internos (Iowa State University, 2010).

La LCL se caracteriza por la presencia de lesiones en la zona donde el vector hizo la picadura. La lesión es generalmente indolora a menos que se presenten infecciones secundarias y a excepción de las orejas, las úlceras permanecen limitadas a la piel y no afectan tejidos subcutáneos. La mayoría de las lesiones se curan espontáneamente, pero la velocidad de la cicatrización varía dependiendo de la especie de *Leishmania* causante del cuadro clínico. En el caso de las personas que son portadoras del VIH, pueden presentar casos excepcionalmente graves (Iowa State University, 2010).

En México, la LCL causa lesiones conocidas como “la úlcera del chiclero” (Figura 4) que produce mutilaciones en el pabellón auricular (Dario *et al.*, 2010). Se ha encontrado en alrededor de 20 estados, entre ellos Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Yucatán y Veracruz, principalmente (Monroy, 2002). *L. mexicana* es la especie más común causante de la infección en México, América Central y algunas partes de Sudamérica (Lupi *et al.*, 2009).



Figura 4. Lesión típica y más común de LCL, se caracteriza por una úlcera redonda con un borde y ocurre en las áreas expuestas de la piel (Lupi *et al.*, 2009).

1.4.3.1.2 Leishmaniasis cutánea difusa

Los agentes causales de la LCD en el Nuevo Mundo son *L. mexicana* y *L. amazonensis*. En México, *L. mexicana* es la única especie reportada como agente causal de la LCD (Becker, 2006). En esta forma clínica se presentan patrones caracterizados por una distribución difusa de pápulas del color de la piel, además de nódulos y lesiones tuberosas y verrugosas (no se presentan como úlceras) que pueden afectar diversas regiones en el cuerpo tales como la cara y las extremidades (Figura 5). Las lesiones producidas pueden dañar a los tejidos profundos y persistir indefinidamente. Normalmente las respuestas ante los tratamientos de control de este cuadro clínico no dan resultados favorables (Machado, 2006) y puede ser incurable en algunos casos.



Figura 5. Paciente con LCD. Se observan nódulos con distribución difusa característicos de la LCD (Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM).

1.4.3.2 Leishmaniasis mucocutánea

La forma clínica de la LMC se restringe al Nuevo Mundo principalmente en Sudamérica y América central. El agente causal son distintas especies del subgénero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guayanensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) peruviana* (Becker, 2006; Lupi *et al.*, 2009). En México el agente causal es *L. (V.) braziliensis*. En la LMC el parásito se disemina por vía hemática provocando graves lesiones de la mucosa. Durante los primeros dos años de la lesión inicial se producen las lesiones clínicas de LMC que consisten en una inflamación progresiva de la mucosa nasal y el labio superior, lo que puede dar como resultado la destrucción completa del tabique nasal, además de una inflamación completa de la cara. Las lesiones en las mucosas se caracterizan por presentar ulceraciones e infiltraciones en la nariz, labios, boca y faringe (Machado, 2006) (Figura 6).



Figura 6. Paciente con LMC. Se observa la destrucción del tabique nasal debido a las lesiones de la mucosa características de la LMC (Lupi *et al.*, 2009).

1.4.3.3 Leishmaniasis visceral

La LV, también denominada kala-azar, es endémica en alrededor de 62 países. Los agentes causales son: *L. donovani* y *L. chagasi* en las regiones de África y La India y *L. infantum* en el Mediterráneo y América, incluido México (Becker I., 2006; Lupi O., *et al.*, 2009). El principal reservorio en ambientes urbanos es el perro doméstico (*Canis familiaris*) (OMS 2004; Panaftosa, 2006).

Esta manifestación clínica se caracteriza por la propagación del parásito a la médula ósea, el bazo y el hígado. Presenta un periodo de incubación de 1 a 36 meses y se asocia con síntomas tales como

fiebre, anorexia, diarrea, palidez, dolores abdominales, etc. Si no se tratan, algunos de estos síntomas pueden agravarse y ser fatales. Otros signos son hepatoesplenomegalia y hemorragia oral, nasal e intestinal (Lupi *et al.*, 2009; Machado, 2006) (Figura 7).



Figura 7. Hepatoesplenomegalia causada por LV.

1.4.4 Distribución de la leishmaniasis

1.4.4.1 Distribución mundial de la leishmaniasis

La leishmaniasis es endémica de algunas partes de África, India, Medio Oriente, el sur de Europa y centro y Sudamérica (Figura 8). Alrededor de 88 países a nivel mundial son afectados por la leishmaniasis (Alvar *et al.*, 2006), la cual se distribuye principalmente en las zonas tropicales y subtropicales.

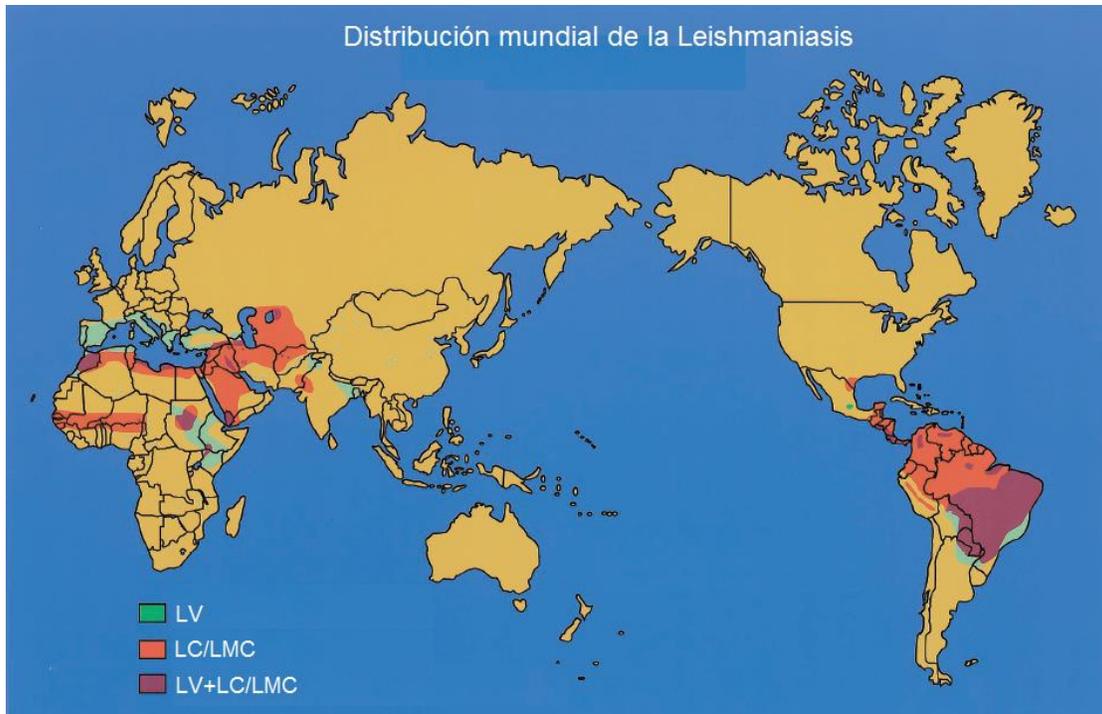


Figura 8. Distribución mundial de las áreas endémicas de LC, LV y LMC. Se tiene un estimado de 12 millones de personas infectadas y 350 millones de personas en riesgo (tomado de Handman, 2001).

1.4.4.2 Distribución e incidencia de la leishmaniasis en México

En México la leishmaniasis se distribuye principalmente en las zonas tropicales en los estados del sur. La LCL que es la más abundante, la LMC es muy rara y existen reportes en los estados de Chiapas y Veracruz principalmente, la LCD presenta pocos casos en Tabasco, Veracruz y Quintana Roo, y la LMC se presenta principalmente en los estados de Veracruz y Oaxaca. Se estima que en México hay 7,613,221 personas en riesgo de contraer LC (Alvar *et al.*, 2012) (Figura 9).

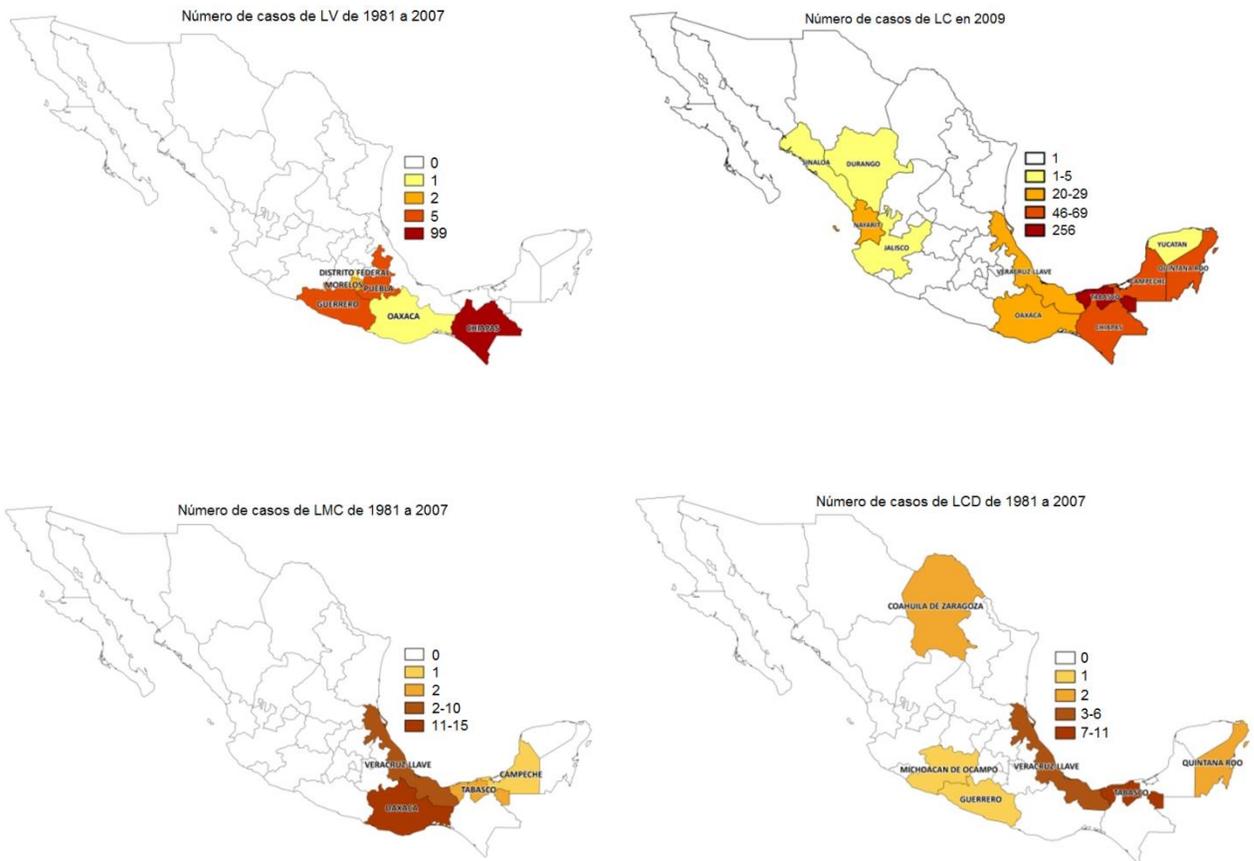


Figura 9. Distribución de la leishmaniasis en México. Se muestra el número de casos de LC del año 2009 y de LCD, LMC y LV de los años 1981 a 2007. Un total de 16 estados a lo largo del país presentan casos de alguna forma clínica de leishmaniasis (Alvar *et al.*, 2012).

1.5 Respuesta inmune contra *Leishmania* y mecanismos de evasión por parte del parásito

En la RI *Leishmania* es reconocida por células fagocíticas como los neutrófilos, $M\phi$ y CD, a través de receptores tales como TLRs, FcR y receptores del complemento, lo que lleva a la internalización posterior del parásito. Dichas células juegan papeles fundamentales en la respuesta inmune en contra de *Leishmania* (Tabla 2). Además, se ha descrito que los amastigotes pueden ser internalizados por medio del reconocimiento de la fosfatidilserina (PS) o en el caso de *L. mexicana* través de PI3-K γ , lo cual facilita la entrada a los $M\phi$ y favorece el progreso de la enfermedad (Cummings *et al.*, 2012). En el caso de las CD se considera que la entrada es “silenciosa”, ya que en ocasiones no se produce la maduración de la célula por el reconocimiento e

internalización del parásito, sin embargo, se ha demostrado que el reconocimiento de los amastigotes opsonizados sí provoca la maduración de las CD (Kima, 2007).

Tabla 2. Principales funciones de los neutrófilos, MØ y CD ante la infección por *Leishmania* (tomado de Birnbaum y Craft, 2011).

Tipo de célula	Función
Neutrófilos	<p>Primeras células que responden ante la infección</p> <p>Destruyen promastigotes por medio de especies reactivas del oxígeno</p> <p>Son altamente estimulados por constituyentes de la saliva de los vectores transmisores de la enfermedad en ausencia o presencia del parásito</p>
Macrófagos	<p>Células hospederas definitivas</p> <p>Fagocitan al parásito a través de receptores de manosa, receptores del complemento 1 y 3, TLR2 y TLR3</p> <p>Los macrófagos activados por la vía clásica incrementan la actividad de la iNOS y NO lo que conlleva a la muerte del parásito</p> <p>La activación alternativa disminuye la actividad de la iNOS e incrementa la actividad de la arginasa, lo que conduce a respuestas tipo Th2</p>
Células dendríticas	<p>Células hospederas definitivas</p> <p>Células clave en dirigir respuestas tipo Th1 o Th2 por medio de la presentación de antígenos</p> <p>Células productoras de IL-12, vital para polarizar una respuesta Th1</p> <p>Las CD migratorias en la dermis son importantes en la fagocitosis de <i>Leishmania</i> en etapas iniciales de la infección</p>

Un punto irónico en esta primera respuesta ante *Leishmania* es que los MØ y las CD son las principales células efectoras que destruyen a los amastigotes, pero también son el principal sitio de proliferación y diseminación del parásito (Birnbaum y Craft, 2011). Para lograr la sobrevivencia y proliferación dentro de la célula hospedera, *Leishmania* utiliza diversos mecanismos entre los que se encuentran la alteración de las vías de señalización de los TLRs. En este caso, se ha demostrado que *L. mexicana* interviene en la señalización de TLR-4 con lo que inhibe la producción de IL-12 y promueve el establecimiento dentro de la célula huésped (Shweash, 2011).

Uno de los mecanismos que utiliza *Leishmania* para asegurar su supervivencia, es la inducción de la síntesis de poliaminas, las cuales son esenciales para la formación de macromoléculas, la proiferación, la diferenciación y el eficaz funcionamiento de la maquinaria antioxidante de *Leishmania*. Este mecanismo se lleva a cabo mediante el metabolismo de la L- arginina, a través de la arginasa y no de la iNOS, lo cual conlleva a la disminución de la producción de NO y sus derivados tóxicos (Iniesta *et al.*, 2002).

Por otro lado, un mecanismo muy importante de la respuesta inmune y que es uno de los más eficaces en la eliminación de células dañadas, que han cumplido el tiempo de vida o que se encuentran infectadas por parásitos intracelulares, es la apoptosis celular. Sin embargo, se ha demostrado que parásitos tales como *Leishmania spp*, *Trypanosoma cruzi*, *Theileria spp*, *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium spp* han desarrollado estrategias para inhibir la apoptosis de la célula huésped (John y Anthony, 2007). En el caso de *L. mexicana*, se demostró que los promastigotes y los amastigotes inhiben la apoptosis inducida con camptotecina de las moDC. Dicha inhibición de la apoptosis puede tener importantes implicaciones en la patogénesis de *Leishmania* al favorecer la invasión y la persistencia en las células huésped (Valdés *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2013).

Numerosos estudios revelan que la inmunidad del huésped es la pieza fundamental para el desarrollo y persistencia de los distintos cuadros clínicos que presenta la leishmaniasis, sin embargo, recientemente se ha indagado en el efecto que puedan tener diferentes cepas o aislados de una misma especie de *Leishmania* en el establecimiento de un cuadro clínico o de otro. En cuanto a diferencias en la inhibición de la apoptosis, se ha demostrado que la infección con *Leishmania* inhibe la apoptosis inducida en macrófagos murinos de una manera dependiente de la cepa (Donovan *et al.*, 2009).

En la respuesta inmune contra *Leishmania*, otro factor que juega un papel importante es el lipofosfoglicano (LPG), ya que le confiere protección ante la respuesta inmune de la célula huésped. El polimorfismo estructural que presenta el LPG podría ser determinante en las diferencias de la respuesta del huésped ante la infección con diferentes especies de *Leishmania* (Donovan *et al.*, 2009). Por esta razón el LPG ha sido implicado de manera muy importante en la modulación de la señalización de la célula huésped, así como en las diferencias que son dependientes de la especie en la inhibición de apoptosis. Se ha demostrado que el LPG induce IL-12 en algunas células y probablemente esta inducción varíe entre especies y cepas que muestran diferencias en la estructura del LPG. Así mismo, el LPG está implicado en la modulación de la síntesis de IL-12 dependiente de CD40L en CD humanas (Donovan *et al.*, 2009).

1.6 Apoptosis

La apoptosis fue descrita por primera vez por Kerr J. F., Wyllie A. H. y Currie A. R., en el año de 1972 (Kerr *et al.*, 1972). Es un proceso de gran importancia que sirve como control en el desarrollo de los tejidos, la regulación y finalización de la respuesta inmune y para la eliminación de células dañadas o infectadas. Se definió como un tipo de muerte celular programada y durante su desarrollo se presentan características morfológicas tales como vesiculación de la membrana, condensación de la cromatina y encogimiento celular. Además, existen una serie de características bioquímicas asociadas a la apoptosis como son la fragmentación del DNA, la externalización de la fosfatidilserina y el rompimiento proteolítico de distintos substratos intracelulares como por ejemplo las proteasas de cisteína conocidas como caspasas. La apoptosis juega un papel crucial en la respuesta inmune, ya que gracias a este proceso se eliminan linfocitos T y B que son incapaces de producir receptores para antígenos específicos que son fundamentales para el combate ante agentes patogénicos o que producen receptores que son reactivos en contra de antígenos propios. Además, se eliminan la mayoría de los linfocitos que son activados por una infección después de eliminar a los patógenos responsables (Carmen y Sinai, 2007; Shaha, 2006).

Al término del proceso apoptótico, las células se separan en fragmentos denominados “cuerpos apoptóticos”, los cuales presentan citoplasma con orgánulos compactados y pueden presentar o no fragmentos del núcleo. Posteriormente, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por MØ, células del parénquima o células neoplásicas y son degradados en el fagolisosoma. Cabe destacar que en el proceso apoptótico no se presentan reacciones inflamatorias debido a que las células

apoptóticas no liberan constituyentes celulares en el tejido intersticial circundante, los cuerpos apoptóticos son fagocitados rápidamente por células aledañas y dichas células no producen citocinas inflamatorias (Kurosaka *et al.*, 2003).

1.6.1 Vías de inducción de la apoptosis

Los mecanismos de la apoptosis son altamente complejos e involucran cascadas de eventos moleculares dependientes de energía. Hay dos principales vías de inducción de la apoptosis: la vía extrínseca y la vía intrínseca. Adicionalmente, se ha descrito la vía perforina-granzima que puede inducir la apoptosis mediante la granzima A o B y la vía del retículo endoplásmico que involucra la acumulación de proteínas mal plegadas o sin plegar, lo cual conlleva a la apoptosis celular. Las cuatro vías mencionadas convergen en la misma vía de ejecución o terminal, la cual se inicia por el rompimiento de la caspasa 3 que da como resultado la fragmentación del DNA, la degradación de proteínas nucleares y del citoesqueleto, el entrecruzamiento de proteínas, la formación de cuerpos apoptóticos y la expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas (Martinvalet *et al.*, 2005; Elmore, 2007).

1.6.1.1 Vía perforina/granzima

La vía de la apoptosis denominada perforina/granzima es mediada por células citotóxicas como por ejemplo los linfocitos T-CD8, los cuales son capaces de producir moléculas que forman poros transmembranales en las células blanco para posteriormente liberar a través de ellos gránulos que contienen principalmente proteasas de serina tales como las granzimas A y B. Este mecanismo también lo presentan las células NK. La granzima B puede activar directamente a la caspasa 3 o puede romper a Bid e inducir la liberación del citocromo C, completándose el proceso por la vía mitocondrial (Kaufmann y Hengartner, 2001; Barry y Bleackley, 2002; Elmore, 2007). Por otro lado, la granzima A activa vías no dependientes de caspasas. Una vez dentro de la célula blanco, la granzima A puede romper a un grupo de proteínas llamadas SET, denominadas de esta manera porque comparten el dominio SET: *Su(var)3-9*, *Enhancer of Zest*, *Trithorax*, que suprime al gen *NM23-H1*, lo que resulta posteriormente en la degradación apoptótica del DNA (Elmore, 2007).

1.6.1.2 Vía del retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico rugoso (RER) es el sitio de ensamblaje de las proteínas destinadas a la secreción. Cuando las células son expuestas a estrés, en el retículo endoplásmico (RE) se presentan acumulaciones en el lumen de proteínas mal plegadas o sin plegar. Dicha acumulación de proteínas son liberadas al citoplasma gracias a una translocación del RER, donde posteriormente son degradadas por el proteosoma. Sin embargo, cuando la acumulación de proteínas es elevada y la degradación no es suficiente o el estrés es prolongado, se inicia un proceso de apoptosis mediado por la vía del retículo endoplásmico. Durante el proceso, la proteína integral del retículo endoplásmico Bap31, recluta a la pro-caspasa 8, activándola. Posteriormente, la caspasa 8 forma un complejo con Bid: tBid para iniciar la vía intrínseca de la apoptosis (Mojoi, 2004).

1.6.1.3 Vía extrínseca

En la vía extrínseca están involucradas interacciones mediadas por receptores transmembranales que incluyen a los receptores de muerte de la superfamilia de los receptores del TNF (Locksley *et al.*, 2001). Los ligandos y sus correspondientes receptores que han sido mejor caracterizados incluyen a los siguientes: FasL/FasR, TNF α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (Suliman *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2005). En el caso de los miembros de la familia de receptores del TNF, éstos presentan dominios extracelulares ricos en cisteínas y tienen dominios citoplasmáticos con alrededor de 80 amino ácidos, llamados “dominios de muerte”, los cuales tienen un papel fundamental en la transmisión de la señal de muerte desde la superficie celular al interior de la célula.

Los eventos que ocurren en la vía extrínseca han sido mejor definidos en los modelos FasL/FasR y TNF α /TNFR1. La vía se activa una vez que se da la unión del ligando con el receptor de muerte, lo cual resulta en la formación del complejo de señalización de inducción de muerte (DISC), el cual recluta y activa a la procaspasa 8 (Kischkel *et al.*, 1995; Peter y Krammer, 2003). Posteriormente, la caspasa 8 activa hace un corte proteolítico en la caspasa 3 que conlleva a la activación de dicha caspasa ejecutora. Al final, la caspasa 3 es responsable del rompimiento de múltiples proteínas y la subsecuente muerte de la célula (Peter y Krammer, 2003).

1.6.1.4 Vía intrínseca

La vía intrínseca se inicia por diversos estímulos que a diferencia de la vía extrínseca no están mediados por receptores. Dichos estímulos pueden ser radiaciones, toxinas, hipoxia, infecciones virales, entre otros, y producen señales intracelulares que actúan directamente sobre la membrana mitocondrial, incrementando su permeabilidad y dando lugar a la liberación de múltiples proteínas desde el espacio intermembranal al citosol (Kaufmann y Hengartner, 2001; Saelens *et al.*, 2004). Un ejemplo de esto es la liberación del citocromo C, Smac/DIABLO y la proteasa de serina HtrA2/Omi (Garrido *et al.*, 2006). Dichas proteínas activan la vía mitocondrial dependiente de las caspasas. El citocromo C se une y activa al Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor- 1) que posteriormente se une a la pro procaspasa 9, dando lugar a la formación de un complejo llamado “apoptosoma”. De esta manera se da la activación de la caspasa 9 y ésta a su vez activa a la caspasa 3 lo que conlleva a la posterior muerte de la célula (Kaufmann y Hengartner, 2001; Hill *et al.*, 2004; Green, 2005).

1.6.1.4.1 Control y regulación de la vía intrínseca

El control y la regulación de los eventos que ocurren en la vía intrínseca de la apoptosis se dan por medio de proteínas de la familia Bcl-2, que pueden ser pro-apoptóticas o anti-apoptóticas. Se han identificado un total de 25 genes que codifican para proteínas de dicha familia, entre las cuales se presentan Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w y BAG que son proteínas anti-apoptóticas y Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk como proteínas pro-apoptóticas. Dichas proteínas son fundamentales en el proceso apoptótico, ya que de su expresión depende que la célula entre en apoptosis o aborte el proceso. El mecanismo de acción de las proteínas de esta familia es la regulación de la liberación del citocromo C de la mitocondria, gracias a la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Elmore, 2007). A su vez, las proteínas de la familia Bcl-2 se dividen en tres grupos de acuerdo a criterios estructurales y funcionales, siendo uno de los más importantes la presencia de los dominios de homología conocidos como dominios BH (Kaufmann y Hengartner, 2001) (Tabla 3) (Figura 10).

Tabla 3. Miembros de la familia Bcl-2 y las funciones principales (Kaufmann y Hengartner, 2001)

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Miembros	Bcl-2, Bcl- XL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Nrf3	Bax, Bak, Bok/Mtd	Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, Puma
Dominios BH	BH1, BH2, BH3, BH4	BH1, BH2, BH3	BH3
Pro/anti-apoptóticas	Anti-apoptóticas	Pro-apoptóticas	Pro- apoptóticas
Función	Previenen la muerte celular por la unión o el secuestro de proteínas pro-apoptóticas del grupo II y III.	Inducen la liberación del citocromo C de la mitocondria.	Se unen a proteínas del grupo I o II por medio del dominio BH3. Responden a una gran variedad de estímulos pro- apoptóticos tales como alteraciones en el citoesqueleto y daño al DNA

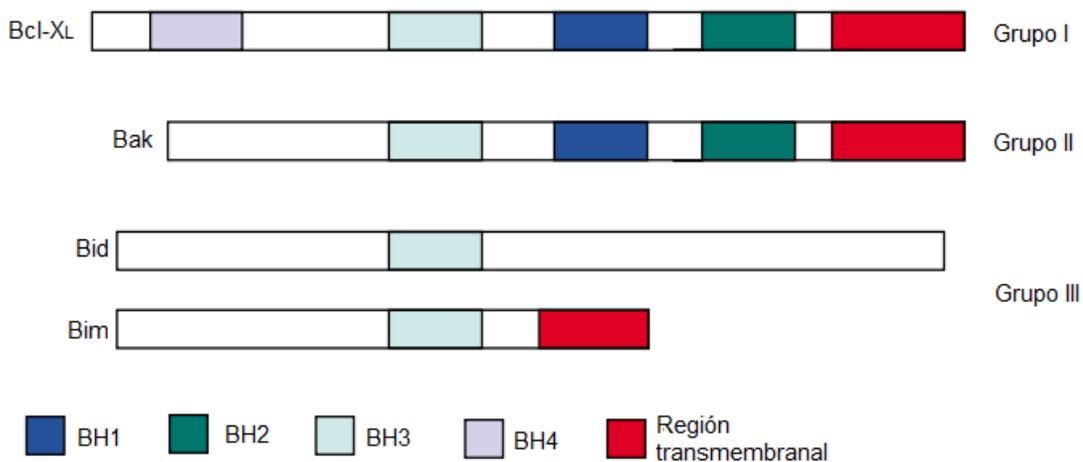


Figura 10. Dominios BH presentes en los tres grupos de proteínas pertenecientes a la familia Bcl- 2. El grupo I presenta los cuatro dominios, son el único grupo que presenta el dominio BH4, que es un C-terminal hidrofóbico con el que se unen a la superficie citosólica de membranas intracelulares tales como la membrana mitocondrial externa y la membrana del retículo endoplásmico. El grupo II es muy similar al grupo I, la diferencia reside en que carecen de BH4 y, a diferencia de las proteínas del grupo I, las del grupo II son pro-apoptóticas. Las proteínas del grupo III presentan únicamente el dominio BH3 por medio del cual llevan a cabo los mecanismos de acción (Kaufmann y Hengartner, 2001).

1.6.2 Las caspasas

La apoptosis es un proceso dependiente de energía que como se ha mencionado, involucra la activación de un grupo de proteasas de cisteína llamadas caspasas, las cuales son capaces de romper proteínas en los residuos de ácido aspártico (Danial y Korsmeyer, 2004; Elmore, 2007). Las caspasas de mamíferos se han agrupado de acuerdo a la función en tres categorías: las caspasas iniciadoras (caspasa-2,-8,-9,-10) que activan a las caspasas ejecutoras, las caspasas ejecutoras (caspasa-3,-6,-7), las cuales rompen diversos sustratos que incluyen a las citoqueratinas, PARP (Poli-ADP ribosa), proteínas de la membrana plasmática, del citoesqueleto, proteínas nucleares, entre otras. Gracias a la acción de las caspasas ejecutoras se presentan los cambios morfológicos y bioquímicos que se observan en las células apoptóticas, y por último, se presentan las caspasas inflamatorias (caspasa-1,-4,-5) (Rai *et al.*, 2005). Una vez que las caspasas son activadas, el proceso de apoptosis es irreversible, ya que tanto en la vía extrínseca como la vía intrínseca, la ejecución de las caspasas es el punto final del proceso apoptótico. Dichas caspasas activan endonucleasas citoplásmicas, las cuales degradan material nuclear y proteasas que degradan proteínas nucleares y del citoesqueleto (Elmore, 2007).

1.6.2.1 La caspasa 3

La caspasa 3 es considerada la más importante de las caspasas ejecutoras y es activada por las caspasas iniciadoras. En el proceso apoptótico la caspasa 3 activa específicamente a la endonucleasa CAD (DNAsa activada por caspasas), que en células que proliferan normalmente se encuentra formando un complejo con su inhibidor iCAD. En células apoptóticas la caspasa 3 rompe iCAD, liberando al CAD. Una vez libre, CAD degrada al DNA cromosómico dentro del núcleo causando la condensación de la cromatina. Por otra parte, la caspasa 3 induce también la reorganización del citoesqueleto y la desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos (Elmore, 2007).

Debido a la importancia de la caspasa 3 en el proceso apoptótico, el análisis de su activación es un método muy utilizado para detectar la apoptosis de las células (Ruhland *et al.*, 2007). Diversos autores han utilizado la detección de la caspasa 3 activa para comprobar la inhibición de la apoptosis por parásitos intracelulares tales como *L. mexicana* (Valdés *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2013), *Toxoplasma gondii* (Carmen *et al.*, 2006), *Plasmodium berghei* (Van de Sand *et al.*, 2005), entre otros.

1.6.3 Inhibición de la apoptosis por parásitos intracelulares

Existe una gran diversidad de parásitos intracelulares causantes de severas afecciones al ser humano. Cada grupo presenta distintas características morfológicas, fisiológicas y ciclos de vida sumamente complejos que involucran, en la mayoría de los casos, a múltiples huéspedes y estadios. Estos microorganismos tienen una dependencia metabólica con el huésped por lo que no pueden sobrevivir en ambientes extracelulares y una vez dentro del huésped definitivo necesitan evadir los mecanismos de defensa que éste presente. Uno de estos mecanismos es la apoptosis e interesadamente se ha demostrado que a pesar de la diversidad que existe entre los parásitos intracelulares, se han identificado en gran parte de ellos mecanismos mediante los cuales inhiben la apoptosis de las células con el fin de sobrevivir por mayor tiempo dentro de ellas, duplicarse e invadir posteriormente nuevas células. Entre los parásitos que inhiben la apoptosis celular se encuentran *Cryptosporidium parvum*, *L. mexicana*, *L. major*, *Trypanosoma cruzi*, *Theileria annulata*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium spp*, entre otros (Carmen y Sinai, 2007) (Tabla 4).

Tabla 4. Modulación de la apoptosis por parásitos protozoarios (Carmen y Sinai, 2007).

Especies	Inhibición de la apoptosis celular	Autores
<i>Leishmania mexicana</i>	Disminuye la actividad de la caspasa 3	Valdés <i>et al.</i> , 2009; Gutiérrez <i>et al.</i> , 2013
<i>Leishmania major</i>	Inhibe la liberación del citocromo C Inactiva a Bad	Akarid <i>et al.</i> , 2004 Ruhland <i>et al.</i> , 2007
<i>Toxoplasma gondii</i>	Inhibe la liberación del citocromo C Inhibe la activación de la caspasa 3 Incrementa la transcripción de Bcl-2 y Bcl- X _L	Carmen <i>et al.</i> , 2006 Carmen <i>et al.</i> , 2006 Molestina <i>et al.</i> , 2003
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Inhibe la activación de la caspasa 9 Incrementa Bcl- X _L	Aoki <i>et al.</i> , 2004 Aoki <i>et al.</i> , 2004
<i>Theileria annulata</i>	Inactiva a Bad	Guergnon <i>et al.</i> , 2006
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Incrementa Bcl-2	Mele <i>et al.</i> , 2004
<i>Plasmodium berghei</i>	Disminuyela actividad de la caspasa 3	Van de Sand <i>et al.</i> , 2005

1.6.4 Modulación de la apoptosis por el parásito *Leishmania*

Se ha demostrado que *Leishmania* tiene la capacidad de inhibir tanto la apoptosis natural como la inducida con compuestos tales como la camptotecina, la estaurosporina y la actinomicina D, los cuales son inductores de la vía intrínseca de la apoptosis (Donovan *et al.*, 2009). En el caso de la apoptosis natural, se demostró que *L. major* es capaz de inhibir la apoptosis de los neutrófilos. En un estudio *in vitro* en el que se infectaron a los neutrófilos con promastigotes de *L. major* se observó que el efecto anti-apoptótico está asociado con una disminución significativa de la caspasa 3 activa (Aga *et al.*, 2002). Por otro lado, se llevaron a cabo experimentos *in vivo* en los que se colectaron neutrófilos de la piel de ratones tres días después de la infección y dentro de las células se encontraron parásitos intactos, razón por la cual se determinó que la infección con *Leishmania* prolonga el tiempo de vida de los neutrófilos. De esta manera se determinó que *L. major* inhibe la apoptosis de los neutrófilos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Aga *et al.*, 2002).

Se han identificado diversos mecanismos mediante los cuales *Leishmania* inhibe la apoptosis de la célula huésped. En el caso de *L. major*, *L. pifanoi* y *L. amazonensis* se demostró que los promastigotes activan la vía de señalización de PI3K/AKT, lo cual les confiere resistencia a los activadores de la apoptosis de la célula huésped, en este caso de los MØ (Ruhland *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que la infección con *Leishmania* induce la activación de varias proteínas antiapoptóticas, tales como Bcl-2 y Bcl-XL (Donovan *et al.*, 2009), las cuales inhiben la liberación del citocromo C y se transcriben como resultado de la activación de NF-κB (Song *et al.*, 2005), y éste último se activa como resultado de la infección con *Leishmania* (Ruhland *et al.*, 2007).

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo demostró que los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* inhiben la apoptosis de las CD. Se infectaron células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC) con los amastigotes y los promastigotes de *L. mexicana* y el efecto anti-apoptótico se determinó por una disminución significativa en la translocación de la fosfatidilserina, cambios en la morfología nuclear, fragmentación del DNA detectado mediante la técnica de TUNEL y una disminución significativa en la activación de la caspasa 3. De esta forma, se determinó que *L. mexicana* inhibe la apoptosis en las CD como un mecanismo de supervivencia y proliferación del parásito (Valdés *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2013).

Por otra parte, en un estudio en el que se investigó el impacto de la infección con *Leishmania* en la apoptosis de MØ murinos, se demostró que el parásito inhibe la apoptosis inducida con cicloheximida de una manera diferencial entre distintas especies y cepas. Además, se demostró que se requieren parásitos activos metabólicamente para una completa inhibición de la apoptosis, así como un contacto directo entre la superficie de la célula huésped con el parásito (Donovan *et al.*, 2005).

Además de la participación del binomio especie + respuesta inmune como responsables de las diferentes manifestaciones clínicas y otros aspectos de la infección por *Leishmania*, el hecho de que una misma especie, como es el caso de *L. mexicana*, pueda provocar dos cuadros clínicos de características opuestas como lo son la LCL y la LCD sugiere que pueden existir diferencias intraespecíficas. Una característica que puede determinar las diferencias entre las distintas cepas de una misma especie de *Leishmania* es el polimorfismo del LPG, el cual difiere entre las distintas especies y los distintos estadios en el ciclo de vida del parásito. El LPG es la molécula más abundante en la superficie del promastigote y presenta una región muy conservada entre las diferentes especies que consiste de un anclaje lipídico y un núcleo de oligosacáridos. Presenta también dos dominios polimórficos que son un esqueleto de polisacáridos y un casquete terminal de oligosacáridos. Los polimorfismos del LPG se deben a modificaciones en los residuos de galactosa en el esqueleto de polisacáridos. Por ejemplo, está demostrado que el LPG de *L. donovani* no contiene ramificaciones en los azúcares y presenta pocas sustituciones de glucosa dependiendo de la cepa. Por otro lado, *L. mexicana* contiene pocas sustituciones en los azúcares, mientras que *L. major* y *L. tropica* presentan muchas sustituciones de azúcares de varios tamaños (Donovan *et al.*, 2005).

El LPG es una molécula a la que se le han atribuido funciones biológicas diferentes tales como la protección del parásito al ambiente degradativo en el tracto digestivo de los vectores (Sacks *et al.*, 2000), la protección ante la lisis mediada por componentes del complemento (McConville *et al.*, 1992), la inhibición de la maduración del fagosoma (Desjardins y Descoteaux, 1997), así como la inhibición de la apoptosis inducida por actinomicina-D (Lisi *et al.*, 2005). Debido a esto es probable que el polimorfismo en la estructura del LPG participe en las variaciones de las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis causadas por distintas especies y cepas de *Leishmania* (Donovan *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICACIÓN

Leishmania es un parásito intracelular obligado causante de un amplio espectro de enfermedades en humanos y otros mamíferos. Se han descrito alrededor de 20 especies causantes de tres cuadros clínicos distintos: LC, LV y LMC. El cuadro clínico que se presente dependerá del estado inmunitario y la genética del huésped, así como de la especie de *Leishmania*. Sin embargo, estudios recientes indican que las cepas presentan importantes diferencias que podrían influir en el cuadro clínico y el desarrollo de la enfermedad.

Dentro de las células huésped de *Leishmania* están las CD y los MØ, en las cuales los amastigotes se replican hasta lisis a la célula y ser liberados para continuar la infección. Uno de los principales mecanismos de defensa de las células para eliminar infecciones intracelulares, como es el caso de *Leishmania*, es la activación de la apoptosis. A pesar de ello, *Leishmania* tiene la capacidad de evadir y suprimir la apoptosis celular para asegurar la supervivencia y persistir en el ambiente intracelular. En nuestro laboratorio se demostró que los amastigotes y los promastigotes de *L. mexicana* inhiben la apoptosis de las moDC. Por otro lado, Donovan *et al.*, en 2005, demostraron que diferentes cepas de varias especies de *Leishmania* inhiben la apoptosis inducida en MØ de una manera diferencial.

En la actualidad no existe algún estudio que compare el efecto de diferentes cepas de *L. mexicana* en la apoptosis de la célula huésped. Debido a esto, en el presente trabajo se analizó el efecto de dos cepas diferentes de *L. mexicana*, una aislada de una paciente con LCL y otra de un paciente con LCD, en la inhibición de la apoptosis de las moDC, que como se mencionó es uno de los mecanismos que utiliza *Leishmania* para asegurar la supervivencia.

3. HIPÓTESIS

Los amastigotes de *Leishmania mexicana* de dos diferentes cepas, una aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada (LCD) y otra aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa (LCD), tendrán un efecto diferencial en la inhibición de la apoptosis de células dendríticas humanas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar el efecto de los amastigotes de dos cepas de *L. mexicana* aisladas de pacientes con LCL y LCD en la inhibición de la apoptosis de células dendríticas humanas.

4.2 Objetivos particulares

1. Purificar y caracterizar células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC).
2. Infectar a las moDC con amastigotes de la cepa Lac de *L. mexicana* e inducir apoptosis con camptotecina, con el fin de comprobar el efecto apoptótico en dichas células y la inhibición de la apoptosis por los amastigotes.
3. Analizar en las moDC infectadas con amastigotes de las cepas Lac y DIACT de *L. mexicana*, la inhibición de la apoptosis inducida con camptotecina, mediante la expresión proteínica de Bcl-XL y la activación de la caspasa 3.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Purificación de las moDC a partir de sangre periférica humana

Las células dendríticas se diferenciaron a partir de monocitos CD14⁺ obtenidos de sangre periférica humana de individuos sanos, basándonos en la metodología antes descrita por Romani N., *et al.*, 1994 y Sallusto F. y Lanzavecchia A., 1994. Los monocitos se obtuvieron a partir de agregados celulares de donadores sanos (buffy coats), los cuales fueron proporcionados por el Banco de Sangre del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Primeramente, se colocaron 25 ml de amortiguador de fosfatos salino estéril 1X (PBS 1X: 0.414g de NaH₂PO₄, 1.704g de Na₂HPO₄ y NaCl) en tres tubos cónicos de 50 ml y 15 ml de Ficoll-Hypaque (Sigma, St Louis, MO, EU) en otros dos tubos y se mantuvieron a temperatura ambiente. Se vertieron 15 ml de sangre en cada uno de los tubos que contenían PBS, haciendo así una mezcla de PBS-sangre. Se tomaron 30 ml de dicha mezcla con una pipeta estéril y se adicionaron lentamente a cada tubo con Ficoll-Hypaque. Se centrifugó en un gradiente de densidad a una velocidad de 400 *xg*, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. La interfase formada (zona del gradiente rica en células mononucleares y plaquetas) se colocó en un tubo nuevo, se aforó a 40 ml con PBS y se centrifugó nuevamente a 400 *xg*, 10 minutos, a 4 °C. El sobrenadante se decantó, el botón se resuspendió en 1 ml de PBS, se agregaron 20 ml de solución lítica de eritrocitos (NH₄Cl, KHCO₃ y EDTA) y se incubó durante 10 minutos en hielo. Una vez transcurrido el tiempo, se aforó a 40 ml con PBS y se centrifugó nuevamente a 400 *xg*, 10 minutos, a 4 °C. Posteriormente se formó un gradiente de células-plasma para eliminar las plaquetas y se centrifugó a 200 *xg*, 10 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el botón se resuspendió en 1 ml de PBS para contar las células mononucleares en una cámara de Neubauer. Posteriormente se colocó una relación de 50 µl de microperlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-CD14 (MACS CD-14 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) por cada 1×10^7 de células mononucleares y se co-incubaron durante 15 minutos a 4 °C. Las células se purificaron por selección positiva (CD14⁺) colocándolas en una columna LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), la cual se acopló a la unidad de separación magnética Super MACS II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Las células CD14⁺ se resuspendieron en medio RPMI-1640 estéril y libre de pirógenos (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor, 2 mM de L-Glutamina (Gibco Invitrogen Grand Island, NY, USA), 10 mM de amortiguador

HEPES, 500 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, 24 mM de NaHCO₃ (R-10) y con 1000 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml de IL-4 (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células se incubaron en cajas de 24 pozos, 1 ml por pozo con una concentración de 1×10^6 células/ml, a 37 °C, con 5% de CO₂ durante siete días, realizando cambios de medio cada dos días, en los cuales se extraían 500 µl de medio de cada pozo, y se le adicionaban 500 µl de medio fresco manteniendo la concentración de citocinas en 1000 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml de IL-4.

5.2 Caracterización de las moDC por citometría de flujo

Las moDC obtenidas en la forma anteriormente descrita se caracterizaron por citometría de flujo. Un total de 1×10^6 moDC se resuspendieron en 50 µl de PBS y se incubaron a una dilución 1:50 durante 20 minutos con los siguientes anticuerpos acoplados a fluorocromos dirigidos contra marcadores específicos de superficie celular: anti-CD1a PE (ficoeritina), anti-HLA-DR FITC (isotiocianato de fluoresceína), anti-CD86 FITC, anti-CD14 FITC, anti-CD3 FITC y anti-CD11 PE-Cy5. Posteriormente las células se lavaron tres veces con PBS y se leyeron en el citómetro FACSsort con el software CellQuest (BD, San Jose, CA, EUA).

5.3 Cultivo de los amastigotes de *Leishmania mexicana*

Las dos cepas de *L. mexicana* utilizadas en este estudio fueron la D1ACT, aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa y la Lacandona (Lac), aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada, el cual contrajo la infección en la selva lacandona, razón por la cual se denominó de esta manera a dicha cepa. Los amastigotes de *L. mexicana* de ambas cepas fueron proporcionados por el Biólogo Arturo Wilkins, Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Los amastigotes se obtuvieron a partir de las lesiones de ratones BALB/c previamente infectados en el cojinete plantar y se dejó que las lesiones prosiguieran durante 4 a 6 semanas. Pasado este tiempo los amastigotes se aislaron de los ratones infectados. Para esto, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, las patas infectadas se extirparon en condiciones asépticas y se maceraron de forma mecánica mediante la presión del tejido con el émbolo de una jeringa de 10 ml sobre una malla de nylon con un poro de 100 µM (BD Falcon, Bedford, MA, USA) con medio de cultivo para amastigotes SDM-20 (medio Schneider's suplementado con 20% de suero fetal bovino descomplementado por calor a 56 °C durante 30 minutos, 25 µg/ml de sulfato de gentamicina y 2 mM de L-glutamina, pH final de 5.4). El tejido macerado se colectó en un tubo cónico de 50 ml y se pasó tres veces por jeringas de calibres 21G, 23G y 25G para lisar

mecánicamente las células infectadas y liberar a los amastigotes. La suspensión se centrifugó a 100 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar los restos celulares. El sobrenadante que contenía los amastigotes se colectó en un tubo nuevo y se centrifugó a 2000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. La pastilla obtenida se resuspendió y se lavó 3x con 10 ml de medio SDM-20. La pastilla formada en el último lavado se resuspendió en 1 ml de medio y la suspensión se pasó 8 veces por jeringas de insulina para eliminar los cúmulos formados y realizar el conteo de los amastigotes en una cámara de Neubauer. Los amastigotes se cultivaron en medio SDM-20, en una concentración de 5×10^5 amastigotes/ml en botellas de cultivo de 25 cm² y se incubaron a 32 °C. Se realizaron pases cada 5-6 días inoculando 5×10^5 amastigotes en 10 ml de medio.

5.4 Tratamiento de las moDC

Una vez transcurridos los siete días de cultivo de las moDC, éstas se cosecharon y se les aplicaron diferentes estímulos (Tabla 5). Se utilizaron amastigotes de las cepas LAC y DIACT.

Se colocaron 1×10^6 moDC/pozo en cajas de cultivo de 24 pozos y se dejaron reposar durante dos horas. Posteriormente, en los pozos C, D, E y F se adicionaron los amastigotes de las cepas correspondientes en una relación 1:10 (1 moDC:10 amastigotes) y se incubaron durante dos horas para permitir la fagocitosis de los parásitos por las moDC. Por último, en los pozos B, E y F se colocó la camptotecina (10 µM) que es el inductor de la apoptosis.

Tabla 5. Tratamientos utilizados para el análisis del efecto de *Leishmania mexicana* en la apoptosis de las moDC.

Pozo	Tratamiento
A	Células dendríticas (basal)
B	Células dendríticas estimuladas con camptotecina (10 µM)
C	Células dendríticas infectadas con amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> de la cepa Lacandona (Lac) en una relación 1:10
D	Células dendríticas infectadas con amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> de la cepa DIACT en una relación 1:10
E	Células dendríticas infectadas con amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> de la cepa Lacandona (Lac) en una relación 1:10 y estimuladas con camptotecina (10 µM)
F	Células dendríticas infectadas con amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> de la cepa DIACT en una relación 1:10 y estimuladas con camptotecina (10 µM)

5.5 Análisis de la fragmentación del DNA mediante la técnica de TUNEL

Las moDC sometidas a los tratamientos antes descritos se colocaron en portaobjetos y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con solución bloqueadora (peróxido de hidrógeno disuelto en metanol al 3%) durante 10 minutos para bloquear la actividad de las peroxidasas endógenas. Una vez transcurrido dicho tiempo, las muestras se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante dos minutos en hielo con solución permeabilizadora (Tritón X-100 al 0.1% y citrato de sodio al 0.1%). Las muestras se lavaron nuevamente tres veces con PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda con la mezcla enzima-amortiguador del kit de TUNEL (*In situ* Cell Death Detection Kit, Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Alemania). Las muestras se lavaron nuevamente tres veces con PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el convertidor POD (anticuerpo anti-fluoresceína, fragmento Fab de cabra conjugado con peroxidasa) (*In situ* Cell Death Detection Kit: Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Alemania). Posteriormente las muestras se lavaron con PBS y se les adicionó el revelador aminoetil carbazol. Por último se realizó una contratinción con hematoxilina de Mayer durante un minuto para analizar posteriormente las muestras en un microscopio de fluorescencia Zeiss AxioVert (Zeiss, Thornwood, NY, USA).

5.6 Análisis de la activación de la caspasa 3 por Western blot

Uno de los parámetros apoptóticos tomados en cuenta fue la activación de la caspasa 3, la cual posteriormente a la inducción de la apoptosis sufre un corte proteolítico que da como resultado la formación de dos fragmentos activos de 12 y 17 kDa.

Para esto, se lisaron un total de 1×10^6 moDC (por cada tratamiento mencionado anteriormente) con amortiguador de lisis celular RIPA (NP-40 1%, Tris-HCl 1M, NaCl 1M, EDTA 50 mM, Na_3VO_4 100 mM, NaF 100 mM, aproptinina 10 mg/ml, leupeptina 1 mg/ml, PMSF 10 mM y DTT 100 mM). El lisado celular se centrifugó a 14000 *xg*, durante 4 minutos, a 4 °C y se colectó el sobrenadante, al cual se le determinó la concentración total de proteínas con el método compatible con detergentes de BIO-RAD (Bio-Rad CD protein assay, Hercules, CA, EUA) intrapolando los datos en una curva estándar de BSA (albúmina sérica bovina). Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Biotek^R, μ Quant, Winooski, VT, EUA) a 650 nm utilizando el programa KC4 v3.4.

Para realizar la electroforesis las muestras se ajustaron a 15 µg de proteína, se les agregó amortiguador de carga 2x, se hirvieron durante 3 minutos a 95°C y se corrieron a 100 V en geles de acrilamida-bis-acrilamida al 15%. Al final de la corrida los geles se incubaron en amortiguador de transferencia (25 mM de Tris-HCl, glicina y metanol al 20%) durante 10 minutos. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas en los geles a membranas de PVDF-Immobilon de 0.45 µm (Immobilon-P, Millipore, Darmstadt, Alemania) activadas previamente durante 1 minuto con metanol. Se utilizó un equipo para transferencia semi-seca (Trans-Blot SD semi-dry transfer cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y se llevó a cabo durante 25 minutos a 25 V. Una vez transcurrido dicho tiempo, las membranas se incubaron durante 5 minutos en TBST 1x (Tris-HCl 100 mM, pH=7.4, NaCl 1.5 M y Tween 20 0.05%) y se tiñeron con rojo de Ponceau para verificar la correcta transferencia de las proteínas. Las membranas se incubaron durante 30 minutos con leche al 5% en TBST para bloquear los sitios inespecíficos, posteriormente se colocó el anticuerpo anti-caspasa 3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a una dilución 1:1000 en BSA al 5% diluida en TBST 1x durante la noche a 4°C. Al día siguiente se retiró el anticuerpo y las membranas se lavaron con TBST 1x durante 30 minutos. Se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (Anti-rabbit HRP-linked, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a una dilución 1:2000 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el anticuerpo y las membranas se lavaron durante 60 minutos con TBST, se incubaron durante tres minutos con el sustrato de la peroxidasa (Luminata Forte Western HRP substrate, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) y se revelaron por quimioluminiscencia utilizando placas Kodak (Kodak Professional, Developer HC-110). Por último, se realizó el análisis densitométrico mediante el registro de la intensidad de las bandas con el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) y Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

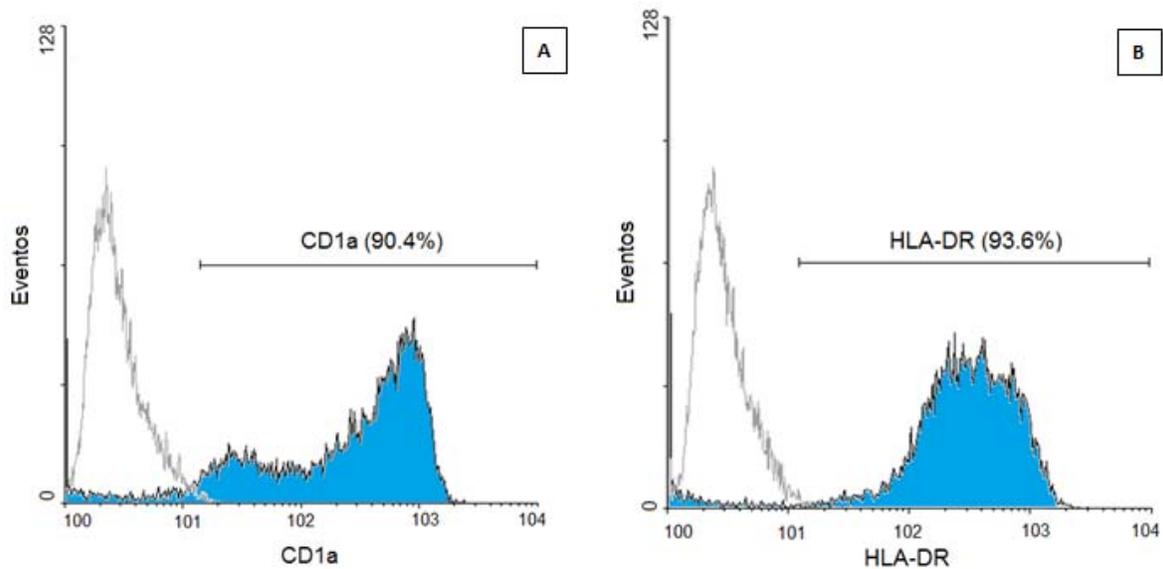
5.7 Análisis de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-X_L mediante Western blot

Para el análisis de la expresión de Bcl-X_L se realizó la misma metodología descrita para el análisis de la caspasa 3. En este caso, se utilizó el anticuerpo primario anti Bcl-X_L (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) a una dilución 1:100 y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a una dilución 1:2000.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de las moDC por citometría de flujo

Las CD se diferenciaron a partir de monocitos aislados por selección positiva con microperlas magnéticas acopladas a un anticuerpo dirigido contra CD14. Posteriormente a los 7 días de incubación con IL-4 y GM-CSF, las moDC se caracterizaron por citometría de flujo utilizando anticuerpos dirigidos contra los marcadores de superficie CD1a, HLA-DR, CD11c, CD86, CD14 y CD3 (Figura 11).



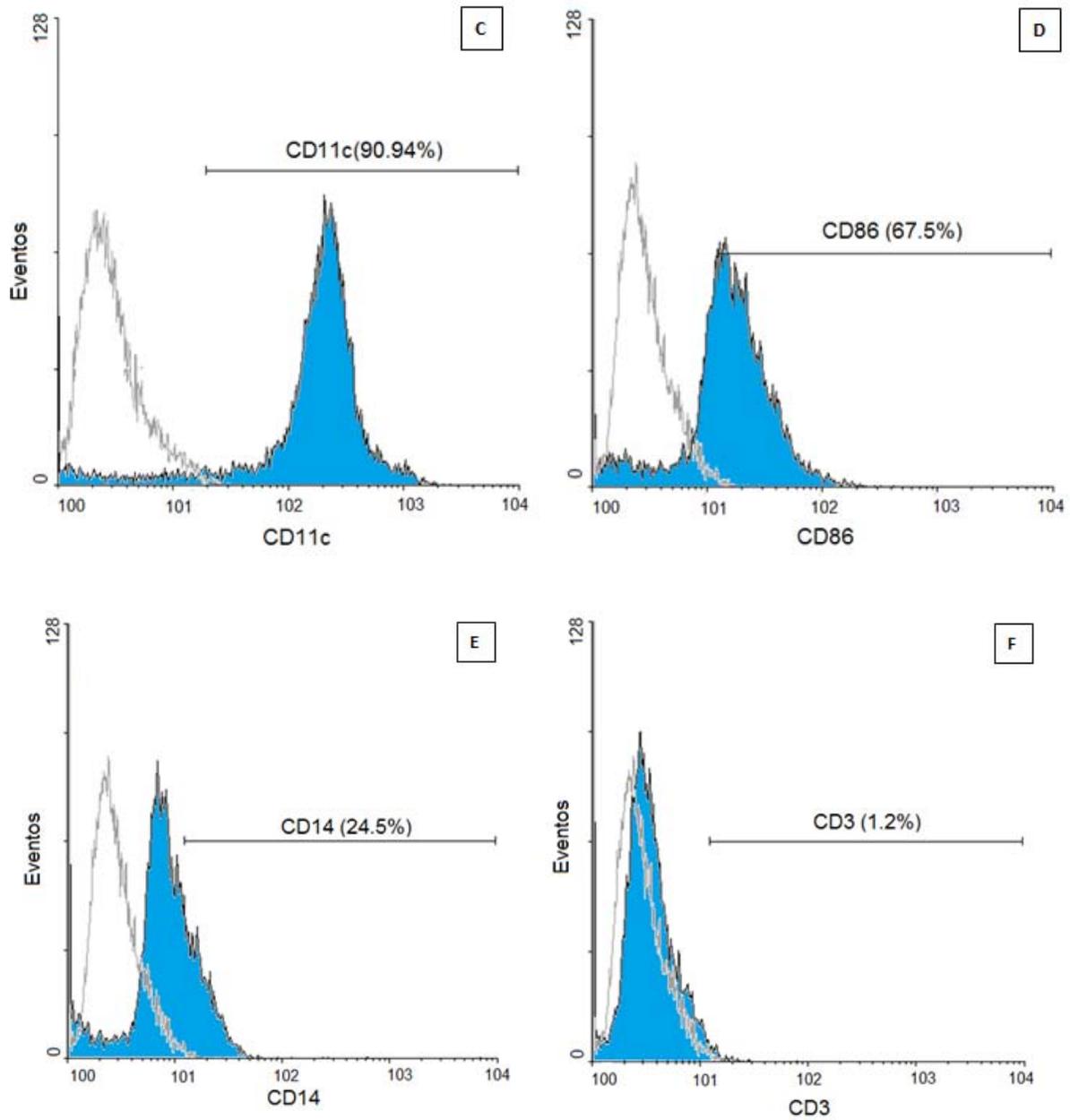


Figura 11. Caracterización de las moDC por citometría de flujo. Se muestra la expresión de los marcadores de superficie: A) CD1a (90.4%), B) HLA-DR (93.6%), C) CD11c (90.94%), D) CD86 (67.5%), E) CD14 (24.5%) y F) CD3 (1.2%).

6.2 *Leishmania mexicana* inhibe la apoptosis inducida con camptotecina de las moDC

Con el fin de confirmar que el parásito es capaz de inhibir los mecanismos apoptóticos del huésped, se evaluó la muerte apoptótica mediante la fragmentación del DNA de las moDC a través de la técnica de TUNEL, utilizando a la cepa Lac de *L. mexicana*. Las moDC se infectaron con los amastigotes de dicha cepa y se trataron con 10 μ M de camptotecina durante 24 horas (Figura 12).

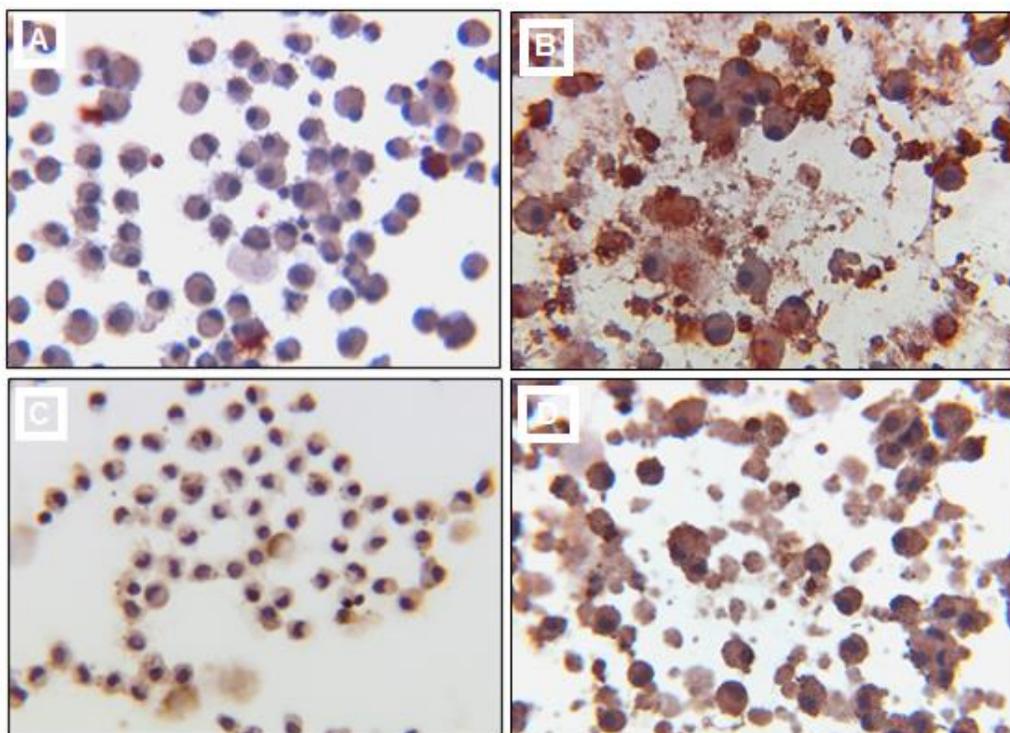


Figura 12. Efecto de los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa Lac en la fragmentación del DNA de las moDC detectada mediante la técnica de TUNEL. Se muestran micrografías representativas de tres experimentos independientes. Las células fueron sometidas a los siguientes tratamientos: A) moDC sin estímulo, B) moDC + campto, C) moDC + Lac y D) moDC + Lac + campto. La tinción roja en el núcleo de las células indica que fueron positivas para el TUNEL y la tinción azul indica que fueron negativas.

Se realizó un conteo aleatorio de 100 células por condición y se determinó que en el caso del basal (moDC sin estímulo) el porcentaje de células positivas al TUNEL, es decir, apoptóticas, fue del 7.97%. Por otra parte, el tratamiento de las moDC con la camptotecina, que es el inductor de apoptosis, provocó un aumento considerable en el porcentaje de células positivas al TUNEL con respecto a la condición basal, obtendiéndose un valor del 38.16%. Interesantemente, cuando las moDC tratadas con la camptotecina se infectaron con los amastigotes de la cepa Lac, el porcentaje

de células positivas al TUNEL disminuyó a valores similares al basal (8.89%). Lo mismo ocurrió cuando las células sin estímulo fueron infectadas con los amastigotes de la cepa Lac en donde no se observó ningún incremento en las células positivas al TUNEL (Figura 13).

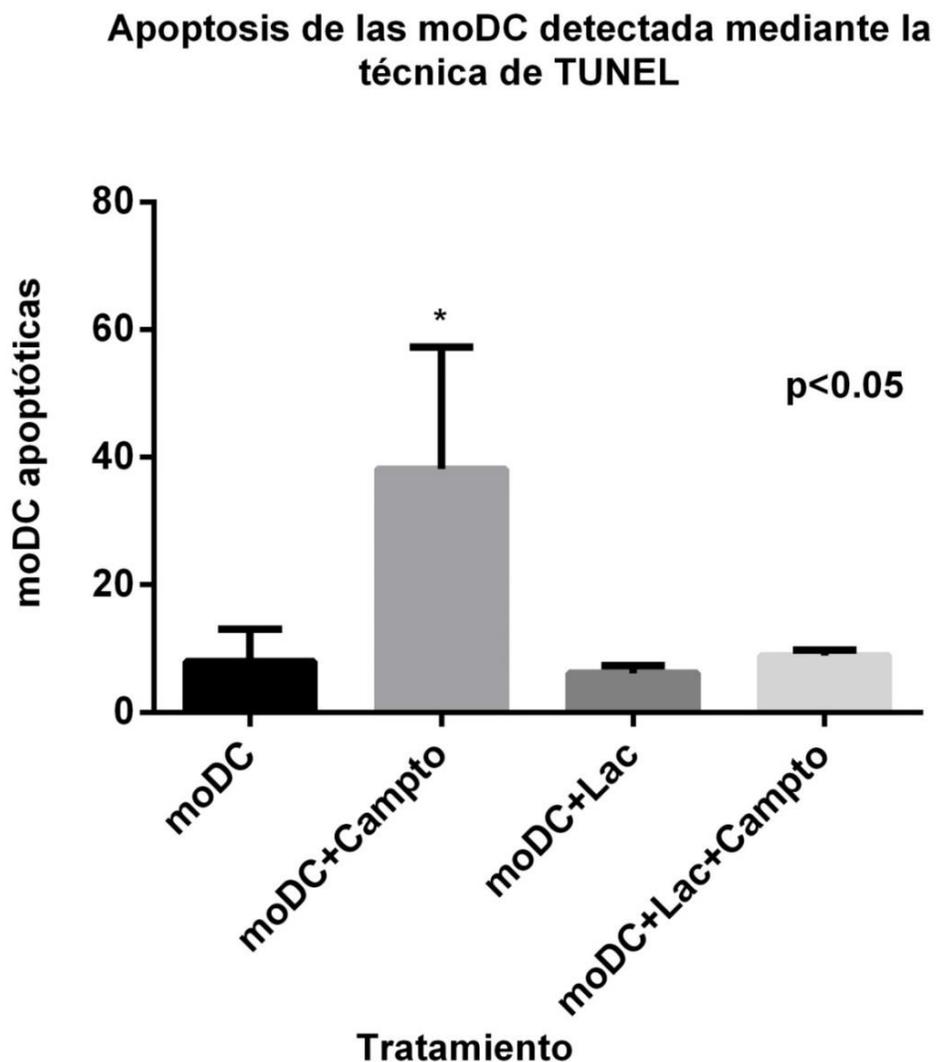


Figura 13. Efecto de los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa Lac en la fragmentación del DNA de las moDC detectada mediante la técnica de TUNEL. Las células fueron sometidas a los siguientes tratamientos: A) moDC sin estímulo, se observa un porcentaje de moDC apoptóticas del 7.9%; B) moDC + campto, con un nivel de apoptosis del 38.16%, mayor a las demás condiciones; C) moDC + Lac, presentó el mismo porcentaje de apoptosis que el basal y D) moDC + Lac + campto con un 8.89% de células apoptóticas. n=3, (p<0.05)

6.3 *Leishmania mexicana* induce la expresión de la proteína anti-apoptótica BclX_L

Uno de los parámetros apoptóticos que se analizó para determinar el efecto de las cepas Lac y D1ACT de *L. mexicana* en la inhibición de la apoptosis de las moDC fue la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl X_L, la cual fue analizada mediante la técnica de Western blot siguiendo la metodología previamente descrita.

Como se puede observar en la figura 14, la presencia proteínica de Bcl X_L en la condición de las moDC sin estímulo es mínima. Como se esperaba, al ser Bcl X_L una proteína anti-apoptótica, la estimulación de las moDC con la camptotecina, inductor de la vía intrínseca de la apoptosis (moDC + campto), los niveles de la proteína disminuyeron aún más, siendo prácticamente nulos. Por otra parte, en los tratamientos en los que las moDC fueron infectadas con ambas cepas de *L. mexicana* (moDC + Lac y moDC+ D1ACT) se observa una mayor expresión en los niveles de Bcl X_L en comparación con el basal. Interesantemente, en el caso de las moDC infectadas con las dos cepas de *L. mexicana* y sometidas con el inductor de apoptosis (moDC + Lac + campto y moDC + D1ACT+ campto) la expresión de Bcl X_L aumenta más del doble en comparación con las células tratadas únicamente con la camptotecina (Figura 14). Claramente se observa una elevación en la inducción de la proteína anti-apoptótica Bcl X_L en respuesta a la infección con ambas cepas de *L. mexicana*, sin embargo, a pesar de que las diferencias no fueron estadísticamente significativas, se observa que la cepa D1ACT, aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa, presenta un mayor efecto en la inducción de Bcl X_L en comparación con la cepa Lac, aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada.

Presencia proteínica de Bcl X_L en las moDC a causa de la infección por *Leishmania mexicana*

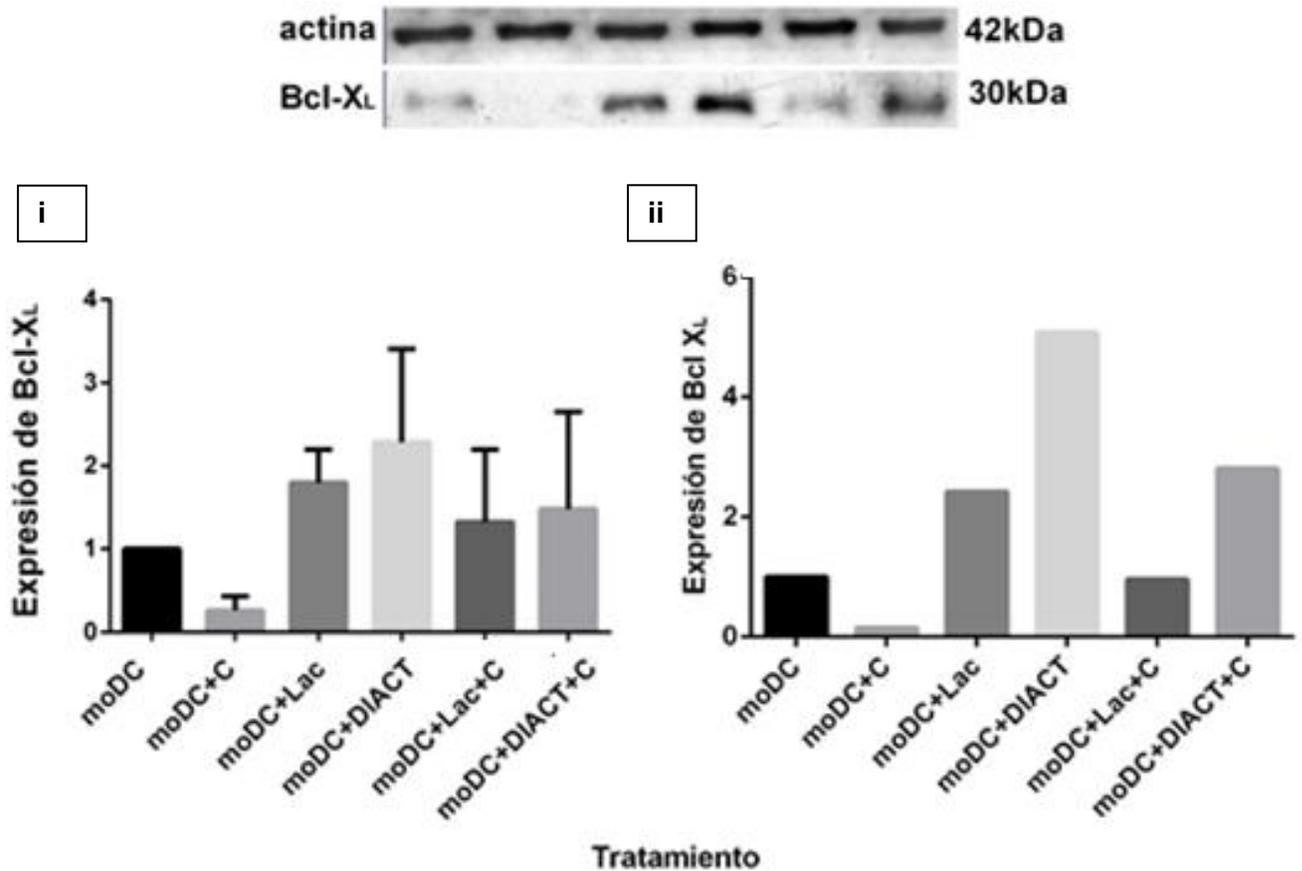


Figura 14. La infección con *Leishmania* induce la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl X_L en las moDC. Las moDC fueron sometidas a los siguientes tratamientos (C= campto): A) moDC, B) moDC + campto, C) moDC + Lac, D) moDC + DIACT, E) moDC + Lac + campto y F) moDC + DIACT + campto. i. Promedio de las densitometrías de tres experimentos independientes con. Se muestra muestra la presencia proteínica de la actina (control de carga) y un importante aumento de la presencia de Bcl X_L en las condiciones que fueron infectados con ambas cepas de *Leishmania*, incluso con el inductor de apoptosis. Se observa una diferencia en la presencia de Bcl X_L entre las distintas cepas, en la cual, la cepa DIACT induce mayormente la expresión de Bcl X_L, sin embargo, dicha diferencia no es estadísticamente significativa. ii. Imagen representativa de un solo experimento que muestra la presencia proteínica de Bcl X_L en los distintos tratamientos.

6.4 La infección con *Leishmania mexicana* inhibe la activación de la caspasa 3 de manera diferencial entre cepas aisladas de pacientes con LCL y LCD en las moDC

Para determinar las diferencias en la inhibición de la apoptosis entre amastigotes de *L. mexicana* de cepas aisladas de pacientes con LCL y LCD, se analizó la expresión de la caspasa 3 activa, que es considerada la más importante de las caspasas ejecutoras. Durante el proceso apoptótico la caspasa 3 inactiva de 35 kDa sufre un corte proteolítico resultando en dos isoformas activas de 17 y 19 kDa. Los dos fragmentos activos de la caspasa 3 fueron analizados mediante la técnica de Western blot.

La figura 15 muestra el efecto de los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa Lac (LCL) y la cepa DICT (LCD) en la activación de la caspasa 3 en las moDC. En el panel i se muestra la presencia proteínica de la actina (control de carga) y de la caspasa 3 activa. El panel ii muestra el promedio más las SD de las densitometrías obtenidas de las bandas de tres experimentos independientes y el panel iii muestra el resultado de la densitometría de un experimento por separado. Como se muestra en la figura 15 i, ii y iii, el tratamiento con la camptotecina, inductor de la apoptosis (moDC + C), provocó la activación de la caspasa 3 demostrada por la presencia proteínica de los fragmentos activos de 17 y 19 kDa que fue 4 veces mayor en comparación con el basal (moDC). Por otro lado, la infección de las moDC con los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa DICT (moDC + DICT), el valor de la caspasa 3 activa fue muy similar al obtenido en la condición basal, lo cual indica que no hay un proceso apoptótico en las moDC. Por el contrario, en la infección de las moDC con la cepa Lac (moDC + Lac) se presentan niveles más elevados de caspasa 3 activa en comparación con la cepa DICT. Interesantemente, en los tratamientos con las moDC infectadas con los amastigotes de ambas cepas y con el inductor de apoptosis (moDC + Lac + C y moDC + DICT + C), la activación de la caspasa 3 disminuyó más de la mitad en comparación con el control positivo (moDC + C), por lo que ambas cepas tuvieron una alta efectividad en la inhibición del corte proteolítico de la caspasa 3, evitando la apoptosis de las moDC. Además, como se esperaba, se encontraron diferencias considerables en la activación de la caspasa 3 entre las dos cepas. En el caso de la DICT, los valores de los fragmentos activos de la caspasa 3 fueron notablemente menores a los encontrados en las moDC infectadas con la Lac (Figura 15). Por esta razón, se determinó que la cepa DICT, aislada de un paciente con LCD, es más efectiva en inhibir la activación de la caspasa 3 para así inhibir la apoptosis de la célula huésped y asegurar la supervivencia.

Efecto de los amastigotes de la cepa Lac y DIACT de *Leishmania mexicana* en la activación de la caspasa 3

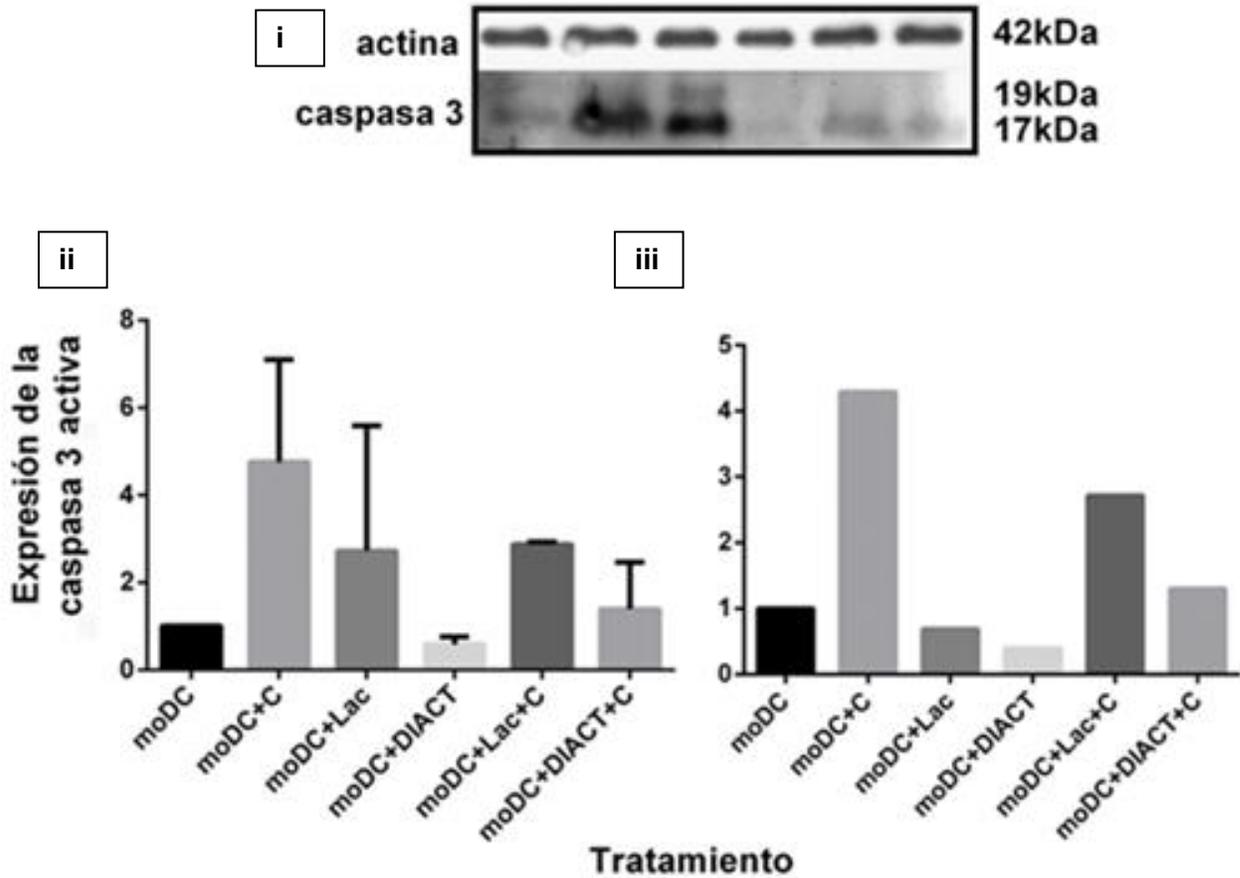


Figura 15. La infección con *L. mexicana* inhibe la activación de la caspasa 3 de manera diferencial entre las cepas Lac y DIACT. Las moDC se sometieron a los siguientes tratamientos: A) moDC, B) moDC + C, C) moDC+Lac, D) moDC + DIACT, E) moDC + Lac + C y F) moDC + DIACT + C. i. muestra la presencia proteínica de la actina (control de carga) y de la capsasa 3 activa. ii. Muestra el promedio \pm sd de las densitometrías de las bandas de las proteínas reveladas en el Western blot de tres experimentos independientes. iii. Muestra el promedio de las densitometrías de las bandas de las proteínas reveladas en el Western blot de un solo experimento.

7. DISCUSIÓN

Leishmania es un parásito intracelular obligado causante de un amplio espectro de enfermedades en más de 80 países al rededor del mundo. Una de las principales células huésped son las CD, las cuales juegan un papel muy importante en el control de múltiples infecciones, incluida la leishmaniasis. Uno de los modelos que ha sido de gran utilidad para estudiar la interacción de las CD con el parásito *Leishmania* son las moDC (León *et al*, 2005), debido a que el método para realizar cultivos *in vitro* para la diferenciación de dichas células está bien establecido, y al ser una de las principales células huésped del parásito, se realizan co- incubaciones que permiten estudiar la interacción que se presenta.

En este estudio se utilizó dicho modelo, para lo cual se realizaron cultivos a partir de sangre periférica humana en los que se diferenciaron a las CD a partir de monocitos CD14⁺. Las moDC obtenidas fueron caracterizadas por citometría de flujo utilizando anticuerpos dirigidos contra diferentes marcadores característicos de las CD, tales como CD1a, CD11c y HLA-DR. La estimulación de los monocitos con GM-CSF e IL-4 durante 7 días permitió la diferenciación a células dendríticas, tal como fue descrito por Romani *et al.*, (1994) y Sallusto y Lanzavecchia, (1994). Dado que en este trabajo era importante conocer la interacción de las CD con los amastigotes de *L. mexicana*, fue necesario demostrar que las CD se encontraban en estado inmaduro, condición en la cual dichas células presentan una mayor capacidad fagocítica en comparación con el estado maduro. Como marcador del estado inmaduro de las CD utilizamos un anticuerpo dirigido contra CD86 que es una molécula co-estimuladora cuya presencia aumenta durante el proceso de maduración de las CD, en el que presentan gran capacidad de presentar antígenos. Se obtuvo un porcentaje moderado de 67.5%. Por otra parte, con el fin de descartar la presencia de otros tipos celulares que pudieran estar interfiriendo en los resultados, se utilizaron anticuerpos contra CD14 que es un marcador para MØ y monocitos y contra CD3, que es un marcador para linfocitos. El porcentaje obtenido de células CD14⁺ fue bajo (24.5%), lo que mostró una buena diferenciación de los monocitos a CD y el porcentaje de células CD3⁺ fue prácticamente nulo (1.2%), lo que permitió descartar una contaminación por linfocitos en los cultivos de moDC.

Como se ha mencionado, una vez que los promastigotes de *Leishmania* han sido inoculados en el huésped definitivo y logran atravesar las barreras del sistema inmune, son fagocitados por células de la RII, tales como neutrófilos, MØ y CD. Posteriormente los promastigotes se diferencian a amastigotes, los cuales se duplican hasta ser liberados a causa de la lisis de la célula y así poder infectar a nuevas células (Kane y Mosser, 2000). Un punto crítico en la respuesta ejercida por el huésped en contra de *Leishmania* es el hecho de que las CD y los MØ son las principales células que se encargan de combatir y eliminar a dicho parásito, sin embargo, también son el principal sitio de proliferación y diseminación de los amastigotes (Birnbbaum y Craft, 2011). En esto último participa en gran medida el parásito, ya que a lo largo de la evolución se han seleccionado características que le permiten suprimir la respuesta inmune y así asegurar su supervivencia. Ejemplo de esto es la inhibición de la apoptosis de la célula huésped, que como se ha demostrado para *Leishmania*, el parásito es capaz de inhibir la apoptosis natural de los MØ (Ruhland *et al.*, 2007; Donovan *et al.*, 2009) y de los neutrófilos (Aga *et al.*, 2002), así como la apoptosis inducida, habiéndose demostrado que tanto los promastigotes como los amastigotes de *L. mexicana* inhiben la apoptosis inducida con camptotecina en las CD (Valdés *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2013).

El fenómeno de inhibición de la apoptosis de la célula huésped es un fenómeno que ha sido ampliamente documentado para diversos organismos patogénicos intracelulares tales como *Cryptosporidium parvum*, *L. mexicana*, *L. major*, *Trypanosoma cruzi*, *Theileria annulata*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium spp.*, entre otros (Carmen y Sinai, 2007), sin embargo, los mecanismos involucrados en esta inhibición de la apoptosis no han sido definidos del todo. En el caso de *Leishmania* se ha demostrado que las MAPK y PI3K participan en esta inhibición (Ruhland *et al.*, 2013; Vázquez *et al.*, 2015).

En el presente trabajo, nos interesó ahondar más en la búsqueda de las moléculas que son blanco del parásito *Leishmania* para inhibir la apoptosis de las CD. Además, analizamos el efecto de dos cepas de *L. mexicana* aisladas de pacientes con las dos formas clínicas de la leishmaniasis cutánea con el interés de conocer si existen diferencias entre cepas de distinto origen en la capacidad de inhibir la apoptosis de la célula huésped.

Lo primero que se hizo fue determinar la fragmentación del DNA mediante la técnica de TUNEL con el fin de demostrar la inhibición de la apoptosis ejercida por parte de los amastigotes en las moDC. Se utilizó esta técnica debido a que uno de los principales métodos para detectar la apoptosis es la fragmentación del DNA (Morris y Geller, 1996), así como los ensayos para detectar

la activación de la caspasa 3 (Gurtu *et al.*, 1997). Las moDC se infectaron con los amastigotes de la cepa Lac de *L. mexicana* y se trataron con 10 mM de camptotecina durante 24 horas para evaluar la inducción de la apoptosis de las moDC. Se utilizó únicamente la cepa Lac debido a que este ensayo se realizó para comprobar que efectivamente los amastigotes de *L. mexicana* inhiben la apoptosis de las moDC. Demostramos que las moDC sin estímulo tuvieron una apoptosis basal baja del 7.97%, porcentaje que incrementó significativamente cuando las células se trataron con la camptotecina razón por la cual se determinó que el efecto de la camptotecina sobre las moDC fue efectivo e indujo la apoptosis de dichas células. Interesantemente, cuando las moDC tratadas con la camptotecina fueron infectadas con los amastigotes de la cepa Lac de *L. mexicana*, el porcentaje de células apoptóticas se redujo significativamente a valores similares a los del basal (Figura 12 y 13). Por esta razón, mediante la fragmentación del DNA que es característica de las células apoptóticas, se comprobó que los amastigotes de *L. mexicana* inhiben la apoptosis de las moDC, gracias a lo cual asegura su supervivencia, permitiendo la duplicación de los amastigotes y la infección posterior a células aledañas.

Una vez comprobado por medio de la cepa Lac, que *Leishmania* es capaz de inhibir la apoptosis de las moDC, lo siguiente que se analizó fue el efecto de distintas cepas de *L. mexicana* en la inhibición de la apoptosis utilizando dos parámetros apoptóticos, la expresión de Bcl-X_L y la activación de la caspasa 3. El interés de analizar el efecto de diferentes cepas aisladas de pacientes con las dos formas clínicas de la leishmaniasis cutánea se debió a que, como ya se mencionó previamente, es muy importante estudiar el comportamiento de diferentes cepas de una misma especie en su relación con la célula huésped. Primeramente, cabe mencionar que se han identificado alrededor de 20 especies patógenas para los mamíferos y que el cuadro clínico que se presente dependerá en gran medida de la especie de *Leishmania*, así como del estado inmunitario del huésped (Solbach y Laskay, 2000; Lupi *et al.*, 2009; Markikou *et al.*, 2012). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que cepas de la misma especie presentan características que difieren entre ellas, y dichas características podrían influir directamente en el cuadro clínico y la gravedad de la enfermedad que se desarrolle en el huésped. Un claro ejemplo de esto es el caso de *L. major* que puede causar infecciones severas o lesiones que se resuelven sin dificultades (Neva *et al.*, 1979). Por otra parte, se demostró que distintas cepas de *L. donovani* y *L. major* inhiben la apoptosis de los MØ de manera diferencial; además se comprobó que las distintas cepas utilizadas en dicho estudio muestran diferencias en la estructura del LPG, por lo cual se postula que dichos polimorfismos podrían estar directamente involucrados en las diferencias de la

inhibición de la apoptosis (Donovan *et al.*, 2009). Por otro lado, un estudio realizado con MØ de ratones de la cepa susceptible BALB/c y de la cepa resistente C57BL/6 que fueron infectados con *L. major* mostró que ambas cepas de ratones tuvieron patrones muy similares en la resistencia a la apoptosis, lo cual sugiere que este fenómeno no es dependiente de la genética del huésped (Tabatabaee *et al.*, 2011).

Debido a lo antes mencionado, en el presente estudio se compararon dos cepas de *L. mexicana*: la Lac, aislada de un paciente con LCL y la DIACT aislada de un paciente con LCD. Como se ha mencionado, *L. mexicana* puede provocar estos dos cuadros clínicos, los cuales presentan características totalmente diferentes. La LCL, se cura sin dificultades en pacientes sanos, sin embargo, en la LCD los tratamientos muy pocas veces resultan efectivos (Machado, 2006). La principal respuesta que se ha adjudicado al desarrollo de los distintos cuadros clínicos es el estado inmunitario del huésped y la especie de *Leishmania*, sin embargo, como se ha recalado, hay especies que pueden causar más de un cuadro clínico. Por dicha razón, es de suma importancia indagar en las diferencias que se puedan presentar en las cepas de una misma especie, ya que estas podrían intervenir directamente sobre la polarización de la enfermedad.

Para el análisis de las diferencias que podrían presentar las cepas Lac y DIACT, se decidió realizar una comparación del efecto que tienen los amastigotes de *L. mexicana* sobre la inhibición de la apoptosis de las moDC, debido a que dicho mecanismo es fundamental para la proliferación y supervivencia de *Leishmania* y una gran variedad de parásitos intracelulares. Se analizaron dos proteínas mediante la técnica de Western blot: la proteína anti-apoptótica (Bcl X_L), ya que se ha demostrado que *Leishmania* induce la activación de varias proteínas anti-apoptóticas, incluidas Bcl-2 y Bcl-X_L (Donovan *et al.*, 2009) y la caspasa-3, que juega un papel central en el desarrollo de la apoptosis y nuestro grupo demostró que se inactiva por la infección de las moDC con los amastigotes y los promastigotes de la cepa Lac de *L. mexicana* (Valdés *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2013).

El dato más relevante en cuanto a la expresión de Bcl X_L en las moDC infectadas con la cepa Lac y la DIACT de *L. mexicana* fue que la infección con ambas cepas produjo una elevada presencia de Bcl X_L, que como se mencionó, ésta y otras proteínas de la familia Bcl2 tienen un efecto directo en la modulación de la vía intrínseca de la apoptosis al regular la liberación del citocromo C de la mitocondria, gracias a que alteran la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Elmore, 2007). Debido a esto, se puede determinar que ambas cepas de *L. mexicana* inducen la síntesis de la

proteína Bcl X_L en las moDC, a pesar del tratamiento de éstas con un potente inductor de la apoptosis como lo es la camptotecina. Nuestros resultados son los primeros que demuestran la inducción por *Leishmania* de una proteína anti-apoptótica en las CD y sugieren que la inducción de esta proteína es uno de los mecanismos empleados por este parásito para sobrevivir en las CD. Por otra parte, la diferencia en el efecto de las dos cepas sobre la presencia de Bcl X_L no fue significativa, sin embargo, las moDC infectadas con la cepa DIACT y sometidas con la camptotecina, mostraron una mayor inducción de la proteína en comparación con las moDC infectadas con la cepa Lac y la camptotecina. Esto puede explicarse debido a que la DIACT es una cepa aislada de un paciente con LCD, que como se mencionó es un cuadro clínico de la leishmaniasis que se caracteriza por ser mucho más severo que la LCL, la cual se puede curar sin la necesidad de someterse a tratamientos. Por esta razón, probablemente la DIACT tiene un efecto más eficiente en contra de los mecanismos de defensa de la célula huésped, en este caso, la inhibición de la apoptosis. El que la diferencia en la presencia proteínica de Bcl X_L entre las dos cepas no haya sido tan clara como esperábamos puede explicarse debido a la variedad de proteínas anti-apoptóticas que se presentan, ya que como se mencionó, *Leishmania* puede activar a más de una proteína anti- apoptótica (Donovan *et al.*, 2009), además de la variación en los experimentos individuales que en conjunto muestran una SD elevada.

En cuanto a la activación de la caspasa 3, los resultados que se obtuvieron corroboraron lo que habíamos demostrado previamente, que la infección de las moDC con los amastigotes de *L. mexicana* disminuye considerablemente la activación de la caspasa-3. En este estudio, en el que trabajamos con dos cepas diferentes de *L. mexicana*, se observa claramente como, a pesar de que las moDC fueron sometidas al inductor de apoptosis, la activación de la caspasa 3 fue significativamente menor en las células infectadas que en las células sin infectar. Observamos que ambas cepas de *L. mexicana* tienen una capacidad elevada para inhibir el corte proteolítico de la caspasa 3, lo cual conlleva a la inhibición de la apoptosis de la célula huésped. Interesantemente, la DIACT mostró un mayor efecto sobre la expresión de la caspasa 3 activa en comparación con la Lac. De igual forma que en la expresión de Bcl X_L, la DIACT fue más eficaz en bloquear la activación de la caspasa-3 para así favorecer su supervivencia. En este caso, las diferencias que presentan las cepas en cuanto a la inhibición de la activación de la caspasa 3 se pueden explicar con más facilidad, ya que la caspasa 3 es una caspasa ejecutora que converge al final de todas las vías de inducción de apoptosis (Ruhland *et al.*, 2007), es decir, a pesar de que *Leishmania* es capaz de

bloquear distintas proteínas en distintas vías de inducción de apoptosis, el resultado final es la activación de la caspasa 3. Gracias a esto, analizar el efecto diferencial que presentaron las cepas sobre la inhibición de la apoptosis fue más claro.

A pesar de que las diferencias son notables entre las cepas, cabe destacar que el hecho de que los resultados no hayan resultado estadísticamente significativos, se puede deber a un problema en la metodología al realizar los ensayos de Western blot, ya que los tiempos de exposición de los films ante las membranas después de haber sido incubadas con las anticuerpos primario y secundario y el reactivo de quimioluminiscencia, variaron entre cada experimento. Debido a esto, al realizar las densitometrías de las bandas de cada experimento, se obtuvieron valores con rangos muy amplios, lo cual produjo valores de desviaciones estándar elevados. Sin embargo, el patrón observado fue similar en cada experimento, en los que a pesar de que ambas cepas tuvieron una elevada eficacia en inhibir la apoptosis celular, claramente se observa un efecto más potente en la cepa DIACT, en comparación con la Lac.

En este trabajo, únicamente se analizó el efecto diferencial en la apoptosis de las moDC mediada por ambas cepas de *L. mexicana*, sin embargo, es importante poder analizar las diferencias que se presentan entre las cepas en cuanto a otros parámetros de evasión de la respuesta inmune del huésped tales como la inhibición de la síntesis de especies reactivas del oxígeno o la producción de citosinas, para así poder determinar con mayor certeza si las cepas están involucradas directamente en el cuadro clínico y el desarrollo de la enfermedad que se presente en el huésped.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que los amastigotes de *L. mexicana* son capaces de inhibir la apoptosis de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC) inducida por camptotecina. La capacidad de la inhibición de la apoptosis es diferente entre la cepa Lac aislada de un paciente con LCL y la cepa DICT aislada de un paciente con LCD, en donde la cepa DICT presentó un efecto más potente en dicha inhibición.

Las diferencias que se presentan entre ambas cepas de *L. mexicana* podrían tener un efecto directo en el cuadro clínico y desarrollo de la enfermedad en el huésped, sin embargo, se deben analizar otros mecanismos de la evasión de la respuesta inmune por *Leishmania* ante la célula huésped, tales como la producción de citosinas y la inhibición de la síntesis de especies reactivas del Oxígeno, además de analizar aspectos morfológicos de las cepas, tales como la estructura del LPG que influye directamente en la patogénesis del parásito.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aga E., Katschinski D., van Zandbergen G., Laufs H., Hansen B., Muller K., Solbach W. y Laskay T. 2002. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by Intracellular Parasite *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*. 2: 888- 905.
2. Akarid K., Arnoult D., Micic-Polianski J., Sif J., Estaquier J. y Ameisen J.C. 2004. *Leishmania major* mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Leukocyte Biology*.76: 95–103.
3. Akira S., Takeda K. y Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*. 8:675-80.
4. Alvar J., Yactayo S. y Bern C.2006. Leishmaniasis and poverty.*Trends in parasitology*.22:552-557.
5. Alvar J., Vélez I., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., Jannin J. y den Boer M. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*. 5: e35671.
6. Aoki M.P., Guinazu N.L., Pellegrini A.V., Gotoh T., Masih D.T. y Gea S. 2004. Cruzipain, a major *Trypanosomacruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 286: C206–C212.
7. Barry M. y Bleackley R. C. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology*. 2:401–409.
8. Boltjes A. y Van Wijk F. 2014. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Frontiers in immunology*. 5:131.
9. Brandonisio O., Spinelli R. y Pepe M. 2004. Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes and Infection*. 6:1402-1409.
10. Becker I., 2006. Capítulo 41, Leishmaniosis. En: Flisser A. y Pérez T., .eds. Aprendizaje de la Parasitología Basado en Problemas. Editores de Textos Mexicanos, ETM. México, D.F. pp.394-409.
11. Birnbaum R. y Craft N. 2011. Innate Immunity and *Leishmania* Vaccination Strategies. *Dermatologic clinics*. 1:89-102.

12. Carmen J.C., Hardi L. y Sinai A.P. 2006. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cellular Microbiology*. 8: 301–315.
13. Carmen J. C. y Sinai A.P. 2007. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Molecular Microbiology*. 64:904-916.
14. Cummings H. E., Barbi J., Reville P., Oghumu S., Zorko N., Sarkar A., *et al.* 2012. Critical role for phosphoinositide 3-kinase gamma in parasite invasion and disease progression of cutaneous leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109: 1251–1256.
15. Danial N. N. y Korsmeyer S. J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. 116: 205- 219
16. Desjardins M. y Descoteaux A. 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine*. 185:2061– 2068.
17. De Kleer I., Willems F., Lambrecht B. y Goriely S. 2014. Ontogeny of myeloid cells. *Frontiers in immunology*. 5:423.
18. Donovan M., Maciuba B., Mahan C. y McDowell M. 2009. *Leishmania* Infection Inhibits Cycloheximide-Induced Macrophage Apoptosis in a Strain Dependent Manner. *Experimental Parasitology*. 123: 58–64.
19. Elmore S. 2007. Apoptosis: A review of Programed Cell Death. *Toxicologic pathology*. 4:495-516.
20. Garrido C., Galluzzi L., Brunet M., Puig P. E., Didelot C. y Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*. 3:1423–33.
21. Gramiccia M. y Grandoni L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal of Parasitology* 35:1169-80.
22. Green D. 2005. Apoptotic pathways. Ten minutes to dead. *Cell*. 121: 671-674.
23. Gomes I. N., Palma L. C., Campos G. O., Lima J. G., DE Almeida T. F., DE Menezes J. P., Ferreira C. A., Santos R. R., Buck G. A., Manque P. A., Ozaki L. S., Probst C. M., DE Freitas L. A., Krieger M. A., y Veras P. S. 2009. The scavenger receptor MARCO is involved in *Leishmania major* infection by CBA/J macrophages. *Parasite Immunology*. 4:188-98.
24. Gordon S. y Taylor P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews. Immunology*. 12:953-964.

25. Guernon J., Dessauge F., Traincard F., Cayla X., Rebollo A., Bost P.E., *et al.* 2006. A PKA survival pathway inhibited by DPT-PKI, a new specific cell permeable PKA inhibitor, is induced by *T. annulata* in parasitized B-lymphocytes. *Apoptosis* 11: 1263–1273.
26. Gurtu V., Kain S. R. y Zhang G. 1997. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Analytical Biochemistry*. 15; 251: 98-102.
27. Gutiérrez K.L., De Oyarzabal E., Argueta J., Wilkins A., Salaiza N., Fernández E., López O., Aguirre M. y Becker I. 2013. Inhibition of dendritic cell apoptosis by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Parasitology research*. 112: 1755-62.
28. Handman E. 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*. 14:229-43.
29. Hill M. M., Adrain C., Duriez P. J., Creagh E. M. y Martin S.J. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosome. *TheEmbo Journal*. 10:2134–45.
30. Iniesta V., Gómez-Nieto., Molano I., Mohedano A., Carcelén J., Mirón C., Alonso C. y Corraliza I. 2002. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunology*. 24: 113-118.
31. Iowa State University. The Center for Food Security & Public Health. 2010. Leishmaniasis (cutánea y visceral) pp. 1- 13.
32. John C. C. y Anthony P. S. 2007. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Molecular Microbiology*. 64: 904-916.
33. Jongbloed S. L., Kassianos A. J., McDonald K. J., Clark G. J., Ju X., Angel C. E., Chen C. J., Dumber P. R., Wadley R. B., Jeet V., Vulink A. J., Hart D. N. y Radford K. J. 2010. Human CD141+ (BCDA-3)+ dendritic cells (CDs) represent a unique myeloid CD subset that cross-presents necrotic cell antigens. *The Journal of Experimental Medicine*. 6: 1247-1260.
34. Kane M. y Mosser D. 2000. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Current Opinion in Hematology*. 1: 26-31.
35. Kaufmann S. H. y Hengartner M. O. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology*. 12: 526-534.
36. Kerr J. F., Wyllie A. H. y Currie A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26:239– 257.

37. Keller P., Schaumburg F., Fischer S.F., Hacker G., Gross U. y Luder C.G. 2006. Direct inhibition of cytochrome c-induced caspase activation *in vitro* by *Toxoplasma gondii* reveals novel mechanisms of interference with host cell apoptosis. *FEMS Microbiol Letter.*258: 312–319.
38. Kima P.E. 2007. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal of Parasitology.* 37: 1087-1096.
39. Kim T.H. y Lee H. K., 2014. Differential roles of lung dendritic cell subsets against respiratory virus infection. *Immune network.* 3:128-37.
40. Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H. y Peter M. E. 1995. Cytotoxicitydependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The Embo Journa.* 14:5579–88.
41. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *Journal of Immunology.* 171:4672–9.
42. León B., López B. M. y A. Carlos. 2005. Monocyte- derived dendritic cells. *Seminars in immunology.* 4:313- 318.
43. León B., López B. M. y Ardavin C. 2007. Monocyte- derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity.* 26: 519- 531.
44. Le borgne M., Dubois B. y Kaiserlian D. 2007. “Dendritic cells of mucosa and skin: recruited for vaccination”. *Médecine sciences: M/C.* 23: 819- 825.
45. Lisi S., Sisto M., Acquafredda A., Spinelli R., Schiavone M., Mitolo V., Brandonisio O y Panaro M. 2005. Infection with *Leishmania infantum* Inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *Journal of Eukaryotic Microbiology.*52:211–217.
46. Locksley R.M, Killeen N., Lenardo M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 104:487–501.
47. Lupi O., Bartlett B., Haugen R., Dy L., Sethi A., Klaus S., Machado P., Bravo F. y Tying S. 2009. Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. *American Academy of Dermatology.*6: 897-925.
48. Machado P. y Azulay R. 2006. Leishmaniasis. En: Tying S., Lupi O., Hengge U., editors. *Tropical dermatology.* New York: Elsevier Inc. pp. 41-8.

49. Manual de procedimientos para el diagnóstico y control de la leishmaniasis en Centroamérica.
50. Markikou O., Achour C. y Meddeb G. 2012. Effects of *Leishmania major* clones showing different levels of virulence on infectivity, differentiation and maturation of human dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 3: 273-280.
51. Martinvalet D., Zhu P. y Lieberman J. 2005. Granzyme A induces caspase- independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 22:355–70.
52. McConville M. J. y Handman E. 2007. The molecular basis of *leishmania* pathogenesis. *International Journal of Parasitology*. 37: 1047-1051.
53. McConville M. J, Turco S. J., Ferguson M.A. y Sacks D.L. 1992. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO Journal*. 11:3593–3600.
54. Medzhitov R., 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*. 2:135-45.
55. Medzhitov R. y Janeway C. Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*. 173:89-97.
56. Mele R., Gomez Morales M., Tosini F. y Pozio E. 2004. *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis *in vitro*. *Infection and Immunity*. 72: 6061–6067.
57. Molestina R.E., Payne T.M., Coppens I. y Sinai A.P. 2003. Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated I kappaB to the parasitophorous vacuole membrane. *The Journal Cell Sci*. 116: 4359–4371.
58. Moll H. 2003. Dendritic cells and host resistance to infection. *Cellular Microbiology*. 5:493–500.
59. Momoi T. 2004. Caspases involved in ER- stress mediated cell death. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 28: 101- 105.
60. Monroy O. y Sánchez T. 2002. Molecular probes and the polymerase chain reaction for detection and typing of *Leishmania* species in Mexico. *Transactions of the Real Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 96 Suppl 1: S101-4.
61. Moore K. J. y Matlashewski G. 1994. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *Journal of Immunology*. 152:2930–2937.

62. Morris E. J. y Geller H. M. 1996. Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *The Journal of Cell Biology*. 134: 757-770.
63. Neva F. A, Wyler D. y Nash T. 1979. Cutaneous leishmaniasis--a case with persistent organisms after treatment in presence of normal immune response. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28:467-471.
64. OMS, 2004. Scientific working group on Leishmaniasis. Meeting report. 2-4 de Febrero, 2004. Geneva, Switzerland. TDR/SWG/04. WHO, Geneva, pp. 1-143.
65. De Kleer I., Willems F., Lambrecht B. y Goriely S. 2014. Ontogeny of myeloid cells. *Frontiers in immunology*. 5: 423.
66. Pananftosa. 2006. Informe final de la reunión de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis visceral en las Américas. Rio de Janeiro. Pp. 1-152.
67. Tabatabaee P.A., Abolhassani M., Mahdavi M., Nahrevanian H. y Azadmanesh K. 2011. *Leishmania major*: secreted antigens of *Leishmania major* promastigotes shift the immune response of the C57BL/6 mice toward Th2 *in vitro*. *Experimental parasitology*. 127: 46-51.
68. Plantinga M., Guillems M., Vanheerswynghe M., Deswarte K., Branco M., Toussaint W., Vanhoutte L., Neyt K., Killeen N., Malissen B., Hammad H. y Lambrecht B. 2013. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity*. 2: 322- 35.
69. Peter M. E. y Krammer P. H. 2003. The CD59 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. 1: 26- 35.
70. Pulendran B., Smith J. L., Caspary G., Brasel K., Pettit D., Maraskovsky E. y Maliszewski C. R. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. *Proc Acad Science USA*. 96: 1036- 1041.
71. Rai N. K., Tripathi K., Sharma D. y Shukla V. K. 2005. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 4:138-44.
72. Romani N., Gruner S., Brang D., Kampgen E., Lenz A., Trockenbacher B., Konwalinka G., Fritsch P. O, Steinman R. M. y Schuler G. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *The Journal of Experimental Medicine*. 180: 83-93.
73. Rubio M. F., Blesa D., Mestre C., Siebert R., Balasas T., Benito A., Rosenwald A., Climent J., Martinez J.I., Schilhabel M., Karran E.L., Gesk S., Esteller M., deLeeuw R., Staudt L.M., Fernandez-Luna J.L., Pinkel D., Dyer M.J. y Martinez-Climent J.A. 2005. Characterization of

- 8p21.3 chromosomal deletions in Bcell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*. 106:3214–22.
74. Ruhland A., Leal N. y Kima P. E. 2007. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cellular Microbiology*. 9:84–96.
75. Saelens X., Festjens N., Vande Walle L., van Gurp M., van Loo G. y Vandenabeele P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 16:2861–74.
76. Sacks D.L., Modi G., Rowton E., Spath G., Epstein L., Turco S. J. y Beverley S.M. 200. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*. 97:406– 411.
77. Salazar G. R. M., Srinivasan A., Griffin A., Muralimohan G., Erlet J. M., Ravindran R., Vella A. T. y McSorley S. J. 2007. Salmonella flagellin induces bystander activation of splenic dendritic cells and hinders bacterial replication in vivo. *Journal of Immunology*. 179: 6169-75.
78. Sallusto F. y Lanzavecchia A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin 4 and down regulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*. 179: 1109- 1118.
79. Sanguenza O., Lu D., Sanguenza M. y Pereira C.2003. Protozoa and worms. En: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. London: Mosby. 1295-307.
80. Shaha C., 2006. Apoptosis in *Leishmania* species and its relevance to disease pathogenesis. *Indian Journal of Medical Research*. 233-244.
81. Shweash M., Adrienne McGachy H., Schroeder J., Neamatallah T., Bryant C. E., Millington O., et al. 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.
82. Silveira F., Lainson R., de Castro G., Laurenti M. y Corbett C. 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology*. 31: 423-431.
83. Solbach W. y Laskay T. 2000. The host response to *Leishmania* infection. *Advances in immunology*. 74: 257-317.
84. Song G., Ouyang G. y Bao S. 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 9:59–71.

85. Soong L. 2008. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *The Journal of Immunology*. 7: 4355- 60.
86. Suliman A., Lam A., Datta R. y Srivastava R.K. 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*. 20:2122–33.
87. Valdés R., Argueta J., Morán J., Salaiza N., Hernández J., Berzunza M., Aguirre G., Becker I. y Gutiérrez K. 2009. *Leishmania mexicana*: Inhibition of camptothecin- induced apoptosis of monocyte- derived cells. *Experimental parasitology*. 121:199-207.
88. van de Sand C., Horstmann S., Schmidt A., Sturm A., Bolte S., Krueger A., *et al.* 2005. The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. *Molecular Microbiology*. 58: 731–742.
89. Vázquez-López R, Argueta-Donohué J, Wilkins-Rodríguez A, Escalona-Montaña A, Aguirre-García M, Gutiérrez-Kobeh L. *Leishmania mexicana* amastigotes inhibit JNK and p38 MAPK phosphorylation and promote PI3K and AKT activation: participation in the inhibition of apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. Aceptado para publicación en *Parasite Immunology*. 2 de septiembre de 2015.
90. Wilkins R., Escalona M., Aguirre G., Becker I. y Gutiérrez K. 2010. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Experimental parasitology*. 126: 426-434.
91. Zaph C., Uzonna J., Beverley S. M. y Scott P. 2004. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nature Medicine*. 10:1104-10.