



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PAPEL DEL GLUTATIÓN EN LA INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS EJERCIDA POR
Leishmania mexicana EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RODRÍGUEZ GONZÁLEZ JORGE

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CD. MX., MAYO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 24 de abril de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **RODRÍGUEZ GONZÁLEZ JORGE** con número de cuenta **300114337**, con la tesis titulada **"PAPEL DEL GLUTATIÓN EN LA INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS EJERCIDA POR *Leishmania mexicana* EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH**:

Presidente: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA
Vocal: DRA. BERTHA JOSEFINA ESPINOZA GUTIÉRREZ
Secretario: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Suplente: DRA. PAULA LICONA LIMÓN
Suplente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 09 de mayo de 2017



M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al apoyo recibido por parte de CONACYT a través de la beca número 407231.

Al apoyo otorgado por Papiit, DGAPA, UNAM, número IN 225116.

A mi tutora, doctora Laila Gutiérrez Kobeh, por permitirme trabajar a su lado y brindarme toda la ayuda necesaria para concluir este proyecto.

A mi comité tutor, doctora Gladis Fragoso y doctora Ma. Eugenia Gonsebatt, por la paciencia y tiempo dedicado al desarrollo y corrección de mi trabajo.

Agradecimientos personales

Al Señor mi Dios YHWH que ha dispuesto todo lo necesario para que me encuentre en este momento de mi vida, sin Él nada sería posible. Para Él toda la gloria, toda la honra y toda la majestad, amen.

Al biólogo Arturo A. Wilkins Rodríguez por la asistencia técnica en la inducción de promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* en medio ácido y el cultivo axenico de amastigotes.

Al doctor Alfonso Olivos García por permitirme usar y mostrarme el funcionamiento del espectrofluorómetro.

A la doctora Igeborg Becker que tan amablemente me permitió realizar el presente trabajo en el laboratorio que preside.

A la señora Susana Saldaña porque gracias a su trabajo siempre tuve disponible material limpio y estéril durante la realización del presente trabajo, aunque lo más valioso que me pudo dar fue su amistad.

A mi amada esposa Wendy por todo su apoyo, sobre todo cuando se terminó la beca, y aún más por su compañía y amor.

A mi hermano Uciel porque me pagó el curso de inglés y sin eso me habría costado mucho más trabajo consultar la literatura citada en el presente trabajo.

Y a todos aquellos que me han ayudado a lo largo de mi vida, siempre estarán en mis pensamientos, oraciones, pero, sobre todo, en mi corazón. Gracias.

Dedicatoria

Con mucho amor, a mi hija Sara y a mi madre Rosina.

Índice

Índice de figuras	i
Resumen	1
Abstract	2
1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Leishmaniasis.....	3
1.1.1 Leishmaniasis visceral o Kala-azar (LV)	3
1.1.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC).....	3
1.1.3 Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD).....	3
1.1.4 Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o “ulcera del chiclero”	3
1.1.5 Epidemiología.....	4
1.1.6 Agente etiológico	4
1.1.7 Respuesta inmune contra Leishmania.....	6
1.2 Las células dendríticas	7
1.2.1 Maduración de las células dendríticas	8
1.2.2 Subpoblaciones de las células dendríticas humanas.....	9
1.2.3 Papel de las células dendríticas durante la leishmaniasis.....	11
1.3 La apoptosis	12
1.3.1 La vía extrínseca	13
1.3.2 La vía perforina/granzima	14
1.3.3 La vía intrínseca o mitocondrial	14
1.3.4 Participación de las ROS durante la apoptosis	17
1.4 El glutatión (GSH).....	19
2 Objetivos.....	21
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 Antecedentes.....	22
4 Hipótesis.....	24
5 Metodología.....	25
5.1 Obtención de las células dendríticas derivadas de sangre periférica humana (moDC)	25
5.2 Caracterización de las moDC y de los monocitos	25
5.3 Cultivo de los promastigotes de <i>L. mexicana</i>	26
5.4 Infección y estímulo de las moDC.....	27
5.5 Cuantificación de las ROS	27

5.6	Cuantificación del GSH.....	27
5.7	Análisis por Western Blot de la expresión de la caspasa 3 y de Bcl-xL.....	29
5.8	Tinción de las moDC	30
5.9	Análisis de la viabilidad de los amastigotes liberados de las moDC.....	30
5.10	Análisis estadístico	30
6	Resultados.....	32
6.1	Citometría de flujo de los monocitos de sangre periférica humana	32
6.2	Citometría de flujo de las moDC	33
6.3	Leishmania mexicana inhibe la apoptosis inducida por la CPT	34
6.4	Leishmania mexicana inhibe la sobreproducción de las ROS en las moDC tratadas con el BSO y la CPT.....	35
6.5	La CPT disminuye la concentración de GSH, aún en las moDC infectadas ..	36
6.6	Las moDC se infectan con los promastigotes de L. mexicana y estos siguen viables, aún en presencia del BSO y de la CPT	37
6.7	Leishmania mexicana induce la sobreexpresión de Bcl-xL en las moDC.....	39
7	Discusión	40
8	Conclusión.....	45
9	Literatura citada	46

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de los dos estadios morfológicos de Leishmania.	5
Figura 2. Diagrama del ciclo de vida de Leishmania.	6
Figura 3. Esquema de las vías de inducción de la apoptosis.	16
Figura 4. Mecanismos celulares antioxidantes.....	19
Figura 5. Esquema de la síntesis del GSH.....	20
Figura 6. Expresión de diferentes moléculas de superficie en los monocitos humanos analizados por citometría de flujo.....	32
Figura 7. Expresión de diferentes moléculas de superficie en las moDC analizadas por citometría de flujo.	33
Figura 8. Leishmania mexicana inhibe la presencia proteínica de la caspasa 3 (17kD).	34
Figura 10. La CPT induce la sobreproducción de las ROS en las moDC, mientras que L. mexicana inhibe la sobreproducción de las ROS en las moDC tratadas con el BSO y la CPT.	35
Figura 9. La concentración intracelular del GSH disminuye significativamente al inducir la apoptosis con la CPT en las moDC infectadas.....	36
Figura 11. Leishmania mexicana logra sobrevivir después de haber sido fagocitado por las moDC y haber sido expuesto al BSO y/o la CPT.....	38
Figura 12. Leishmania mexicana induce la sobreexpresión de Bcl-xL	39

Resumen

Las células dendríticas son parte del sistema fagocítico mononuclear y se encargan de fagocitar antígenos, provenientes de virus, bacterias y protozoarios. *Leishmania mexicana* es un protozoario que sobrevive y se reproduce en el fagosoma de las células dendríticas. Para lograr reproducirse en el fagosoma requiere manipular diversos procesos celulares tales como la apoptosis. Anteriormente reportamos que tanto los promastigotes como los amastigotes de *L. mexicana* inhiben la apoptosis inducida con camptotecina (CPT), y disminuyen la fosforilación de JNK y p38 inducida por la CPT. En otros modelos celulares se ha demostrado que la sobreproducción de glutatión (GSH) protege a las células contra estímulos apoptóticos y disminuye la fosforilación de JNK 1. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar si el GSH participa en la inhibición de la apoptosis ejercida por *L. mexicana* en las células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica humana (moDC). Nuestros resultados demuestran que en las moDC tratadas con la CPT y/o el inhibidor de la síntesis del GSH, la L-butionin-sufoximina (BSO), disminuye la concentración del GSH, mientras que la infección de las moDC no modificó los cambios en la concentración del GSH. Asimismo, observamos que la infección de las moDC con los promastigotes de *L. mexicana* y el BSO incrementa la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xL. Nuestros resultados sugieren que la inhibición de la apoptosis por promastigotes de *L. mexicana* en las moDC podría estar más relacionada con la expresión de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 que con la regulación del estado redox.

Abstract

Dendritic cells belong to the mononuclear phagocytic system and can capture, process, and present antigens from viruses, bacteria, and protozoa. *Leishmania mexicana* is a protozoan parasite that can survive and reproduce inside dendritic cells phagolysosome. To achieve this, *L. mexicana* regulates different cellular events, including apoptosis. Previously, we have reported that *L. mexicana* promastigotes, as well as amastigotes, inhibit camptothecin-induced apoptosis, through the downregulation of JNK and p38 phosphorylation triggered by camptothecin treatment. In other cellular models, it has been proved that glutathione (GSH) upregulation protects cells from apoptosis by inhibiting the phosphorylation and activation of JNK 1. The aim of this study was to determine if GSH participates in the inhibition of camptothecin-induced apoptosis by *L. mexicana* in human monocyte-derived dendritic cells (moDC). GSH quantification assays showed that CPT and BSO (an inhibitor of GSH synthesis) strongly decreased intracellular GSH concentration in moDC, while infection with *L. mexicana* had no effect on GSH concentration changes. On the other hand, Western blot assays showed that BSO treatment and infection with *L. mexicana* induced the expression of the antiapoptotic protein Bcl-xL in moDC. Our findings suggest that inhibition of camptothecin-induced apoptosis in moDC is preferentially regulated by the expression of antiapoptotic Bcl-2 family members than the redox status of the cell.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la clasifica como una enfermedad tropical desatendida, ya que afecta principalmente a poblaciones que sufren pobreza extrema y tienen servicios deficientes de salud e higiene, lo que en conjunto ayuda a perpetuar el ciclo de transmisión. La leishmaniasis se considera una enfermedad zoonótica, ya que el ser humano es contagiado cuando invade zonas donde la enfermedad se transmite de un animal silvestre a otro, generalmente entre mamíferos como roedores, marsupiales y canidos (sobre todo perros domésticos). Se han descrito al menos cuatro cuadros clínicos que produce esta enfermedad (OMS).

1.1.1 Leishmaniasis visceral o Kala-azar (LV)

Este cuadro clínico se caracteriza por que los individuos afectados desarrollan hepatoesplenomegalia, pancitopenia, anemia, cuadros irregulares de fiebre y pérdida de peso. Es la forma con mayor índice de mortalidad ya que según la OMS en más del 95% de los casos es mortal si no se trata. Generalmente afecta a niños. No es reactiva a la prueba de Montenegro (OMS; CENAPRECE).

1.1.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

Se caracteriza porque en un inicio afecta la piel, sin embargo, varios años después se disemina hacia la mucosa orofaríngea, destruyendo mucosa y cartílago. Produce deformaciones faciales tales que los individuos afectados viven aislados, generando un alto índice de morbilidad (CENAPRECE).

1.1.3 Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD)

Este cuadro clínico se caracteriza porque las lesiones son nodulares o en placa diseminadas en la piel a lo largo de todo el cuerpo. Causa morbilidad ya que los pacientes afectados sufren de estigmatización social de forma muy similar a un paciente con lepra, ya sea por el parecido que hay entre ambos cuadros clínicos, o por la ignorancia sobre ambas enfermedades. Es refractaria al tratamiento. No es reactiva a la prueba de Montenegro (CENAPRECE).

1.1.4 Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o “ulcera del chiclero”

Esta es la forma más frecuente de la enfermedad, se caracteriza por úlceras en zonas de la piel que se encuentran expuestas a las picaduras de insectos, sobre todo mosquitos. Las úlceras se caracterizan por ser de bordes indurados, de fondo limpio,

indoloras, que dejan cicatrices de por vida. Cuando la lesión es causada en las orejas, la evolución suele ser crónica causando la mutilación del apéndice. Sin embargo, se podría decir que esta es la forma menos grave de la enfermedad ya que las lesiones pueden curar por si solas y el paciente responde muy bien al tratamiento. Sí es reactiva a la prueba de Montenegro. En México se le conoce como “ulcera del chiclero” porque afecta a poblaciones en condición de extrema pobreza que tradicionalmente se dedican a la extracción de la savia del árbol del chicle, aunque también a los que se dedican al cultivo de café y cacao principalmente (CENAPRECE).

Es importante señalar que en México se pueden observar los cuatro cuadros clínicos de la enfermedad.

1.1.5 Epidemiología

La leishmaniasis se distribuye en el holotrópico afectando alrededor de 80 países (Ameen 2010), mientras que la población que está en riesgo de contraer la infección se calcula en alrededor de mil millones de personas (OMS). Se estima que la prevalencia es de 12 millones de casos (Ameen 2010), mientras que la incidencia se calcula que es de 0.9 y 1.3 millones de casos nuevos. Se calcula que ocurren entre 20 000 y 30 000 muertes al año causadas por esta enfermedad (OMS).

En México la población en riesgo de contraer la leishmaniasis asciende a 9 millones de personas, distribuidas en tres áreas geográficas con un total de trece entidades federativas afectadas, estas son:

- Región del Golfo: Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán.
- Región del Pacífico: Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit Oaxaca y Sinaloa.
- Región del centro: Morelos y Puebla.

Las entidades federativas donde se concentra la mayoría de los casos son: Tabasco con el 35.5%, Quintana Roo con el 28.5%, Chiapas con el 14.2% y Campeche con el 12.9% de los casos. La LCL es el cuadro clínico que se presenta con mayor frecuencia (99%), mientras que la LCD y la LMC se presentan con mucha menor frecuencia. La LV se presenta de manera anual en el estado de Chiapas y afecta principalmente a niños (CENAPRECE).

1.1.6 Agente etiológico

La leishmaniasis es causada por al menos 20 especies de protozoarios del género *Leishmania*, del orden Trypanosomatida, de la clase Kinetoplastida (Corliss 1994), que se distribuyen en el holotrópico (OMS). Es un parásito digenético, es decir desarrolla dos estadios morfológicos, el amastigote y el promastigote, el primero en un vector

(Flebótomo), mientras que el segundo en un hospedero vertebrado (mamífero). En el intestino del vector se desarrolla la forma de promastigote, el cual es fusiforme, flagelado, móvil y mide entre 20 y 30 μ m. En el intestino del vector atraviesa por diferentes estadios hasta llegar a la forma de promastigote metacíclico, el cual pierde la capacidad de duplicarse y es el estadio infeccioso. Únicamente en el hospedero vertebrado se desarrolla el estadio de amastigote, el cual es ovoide, sin flagelo, se reproduce al interior de la célula hospedera y mide entre 2-5 μ m (Figura 1) (Kaye & Scott 2011; Bates 2007; CENAPRECE).

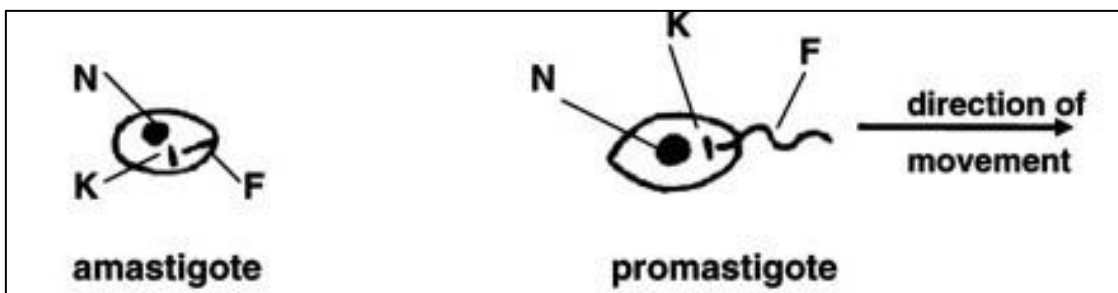


Figura 1. Esquema de los dos estadios morfológicos de *Leishmania*. El amastigote mide de 3-5 μ m, carece de flagelo y se desarrolla en el hospedero vertebrado. El promastigote es fusiforme, presenta flagelo y se desarrolla únicamente en el flebótomo. N: núcleo, K: cinetoplasto (DNA mitocondrial) y F: flagelo. (Bates 2007).

1.1.6.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Leishmania* se inicia cuando una mosca hematófaga infectada se alimenta de un hospedero vertebrado (p. ej. El humano), al alimentarse regurgita los promastigotes metacíclicos en la herida causada para alimentarse, ingresan a la dermis y ahí son fagocitados por las células hospederas. En el interior de la célula se hallan en vacuolas parasitóforas donde se diferencian al estadio de amastigote y comienzan a dividirse. La duplicación continúa hasta que lisan a la célula hospedera y son liberados

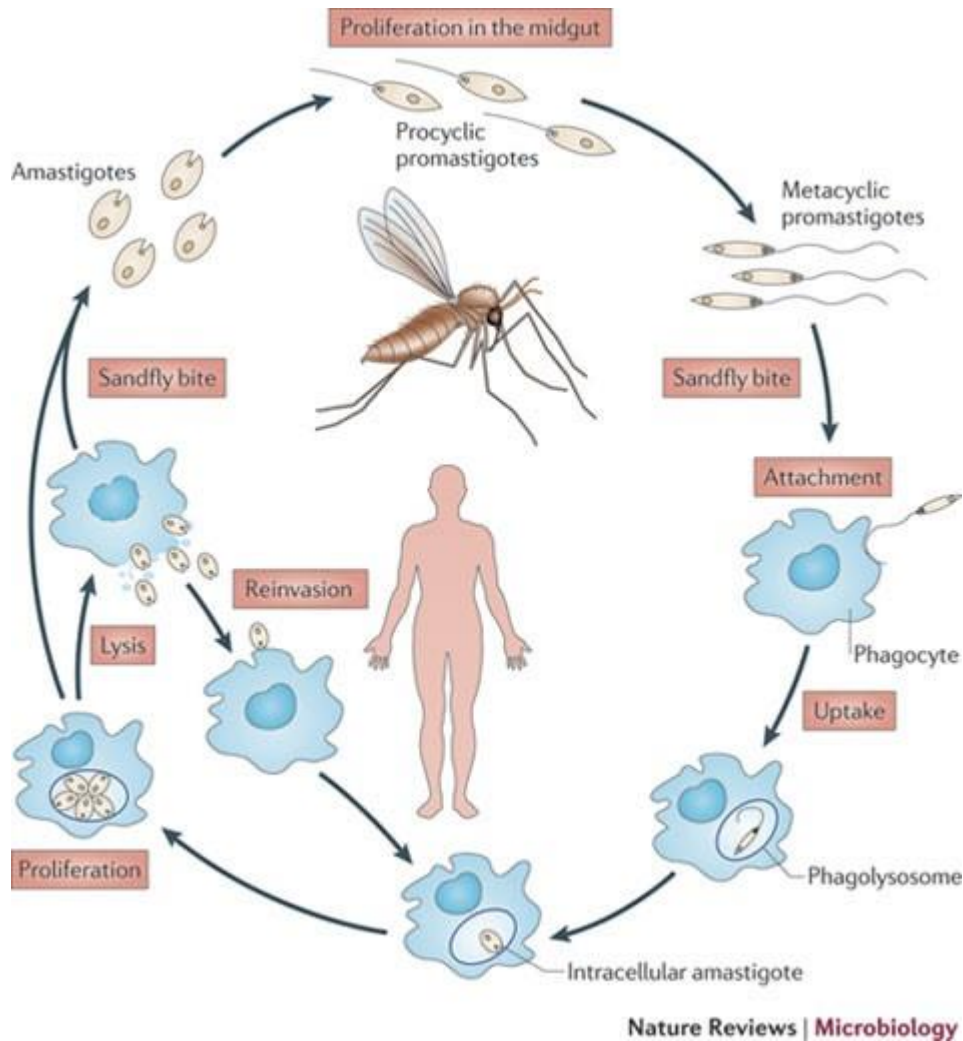


Figura 2. Diagrama del ciclo de vida de *Leishmania*. Se observa la diferenciación del parásito en la mosca transmisora y en el hospedero vertebrado (Kaye & Scott 2011).

al medio extracelular donde invaden nuevas células hospederas. El ciclo de vida se cierra cuando una mosca no infectada se alimenta de un hospedero vertebrado infectado y se infecta con amastigotes, en el intestino de la mosca se diferencian en promastigotes procíclicos y continúan dividiéndose hasta llegar al estadio de promastigote metacíclico (Figura 2) (Kaye & Scott 2011).

1.1.7 Respuesta inmune contra *Leishmania*

El desarrollo de la infección dependerá tanto de la respuesta inmune del hospedero, como de la especie de *Leishmania* que cause la enfermedad. En México se han reportado tres especies de *Leishmania*, *L. infantum* (antes *L. chagasi*) que produce leishmaniasis visceral, principalmente en niños, *L. braziliensis* que se ha asociado a la leishmaniasis mucocutánea y *L. mexicana* la cual es una especie particular ya que puede producir tanto LCL como LCD y esto dependerá de varios factores, principalmente de la respuesta inmune del hospedero (CENAPRECE).

En el modelo clásico de estudio de la leishmaniasis, los ratones de la cepa C57BL/6 (resistentes) infectados con *L. major* desarrollan una respuesta inmune Th1, la cual está mediada por las citocinas: interferón- γ (INF- γ), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y de interleucina 12 (IL-12) y esto a su vez se ha asociado con la resolución y resistencia a la infección. Mientras que la cepa de ratones BALB/c (susceptible) infectada con *L. major* desarrolla una respuesta Th2 con una elevada producción de la interleucina 4 (IL-4), lo que ha sido asociado con la susceptibilidad y progresión de la infección. En pacientes infectados con *L. mexicana* que presentan un cuadro clínico de LCL se ha observado que dominan las citocinas de la respuesta inmune Th1, mientras que en los pacientes que presentan un cuadro de LCD dominan las citocinas de la respuesta inmune Th2. En el caso de los pacientes que sufren de LMC o de LV se ha observado que hay una mezcla de citocinas de ambas respuestas (Scott & Novais 2016; Ameen 2010).

Las células hospederas de *Leishmania* más importantes son las células fagocíticas del sistema inmune, principalmente los macrófagos y las células dendríticas. El macrófago se encarga de eliminar al parásito, mientras que la célula dendrítica dirige el tipo de respuesta inmune contra el parásito.

1.2 Las células dendríticas

Las células dendríticas forman parte del sistema fagocítico mononuclear junto con los monocitos y los macrófagos, se pueden encontrar en órganos linfoides y en órganos no linfoides tales como los pulmones, el hígado, los riñones, el músculo o la piel. Tradicionalmente se les ha llamado células profesionales presentadoras de antígenos al igual que los macrófagos/monocitos y los linfocitos B, sin embargo, tal como menciona Steinman “las células dendríticas no son simples presentadoras de antígenos, sino que además, son células especializadas en iniciar la respuesta inmune”, ya que poseen los elementos necesarios para capturar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T vírgenes, así como de las señales coestimuladoras (moléculas de membrana y citocinas) necesarias para dirigir la respuesta inmune de los linfocitos T (Segura 2016; Steinman 2012).

Las células dendríticas fueron redescubiertas por el médico e investigador Ralph Steinman a principios de los años 1970, casi un siglo antes las describió por primera vez Paul Langerhans, sin embargo, él las describió como células pertenecientes al sistema nervioso debido a las proyecciones citoplásmicas o dendritas que observaba. Fue gracias a esta forma tan peculiar que Steinman logró identificarlas como un nuevo tipo celular diferente a los tan bien estudiados macrófagos, con características y funciones totalmente diferentes a la de estos.

El grupo de Steinman y otros alrededor del mundo han logrado describir muchas de las características y funciones de las células dendríticas tales como la elevada expresión en la membrana celular del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), la capacidad de activar a los linfocitos T, 100 veces mejor que los macrófagos o los linfocitos B. Cuando las células dendríticas se cubren con antígenos y son reintroducidas a sistemas *in vivo* son capaces de iniciar por si solas (sin necesidad de adyuvantes) la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺, funcionan como una red de vigilancia itinerante al capturar antígenos en tejidos periféricos para luego migrar a los órganos linfoides donde inician la respuesta inmune. También se ha observado que las células dendríticas en ausencia de señales de peligro pueden inducir la expansión de linfocitos T reguladores, lo que sugiere que las células dendríticas ayudan a evitar la autoreactividad. Las células dendríticas atraviesan por un proceso de maduración el cual ocurre una vez que han capturado antígenos lo que les permite activar a los linfocitos T. Cuando las células dendríticas capturan antígenos, pero no maduran ocurre un fenómeno llamado tolerancia, en el que las células dendríticas inducen la muerte de los linfocitos T en vez de activarlos (Bashyam 2007; Steinman 2012).

1.2.1 Maduración de las células dendríticas

El proceso de maduración es un punto crucial que determinará la funcionalidad de las células dendríticas y es crítico para iniciar la respuesta inmune adaptativa dependiente de linfocitos T. La maduración de las células dendríticas ocurre cuando hay estímulos en el medio que inducen la diferenciación de células inmaduras hacia células maduras. El estímulo puede ser de origen microbiano o bien de origen no microbiano como antígenos de células propias (cancerosas), de tejidos trasplantados, alérgenos, etc. Las células dendríticas inmaduras se caracterizan por ser fagocíticas, por no activar de manera eficiente a los linfocitos T, mientras que las células maduras pierden la capacidad de capturar antígenos y son las células más potentes para estimular la respuesta inmune específica mediada por linfocitos T. De esta manera, la iniciación de la respuesta inmune, por parte de las células dendríticas, depende de dos componentes principales: (1) la captura, procesamiento y presentación de los antígenos y (2) de la aparición de muchas “funciones accesorias”, que no se limitan a la coestimulación del receptor de los linfocitos T. Actualmente, la caracterización de la maduración de las células dendríticas se ha limitado a la “maduración fenotípica”, es decir a describir las moléculas de membrana que aumentan cuando las células maduran. Entre ellos están los marcadores CD40/80/86, PD-L1/PD-L2. Sin embargo, la maduración fenotípica no siempre es lo mismo que la maduración funcional. Resulta necesario ampliar los estudios relacionados a los cambios moleculares que ocurren durante el proceso de

maduración, que llevan a la iniciación apropiada o inapropiada de la respuesta inmune (Steinman 2012).

1.2.2 Subpoblaciones de las células dendríticas humanas

Además de la maduración otro factor que afecta en gran manera la funcionalidad de las células dendríticas es el tipo de célula dendrítica. Diversos estudios han demostrado que las células dendríticas son una población compuesta por varias subpoblaciones, las cuales se han logrado identificar y clasificar gracias a marcadores moleculares de la superficie celular. Sin embargo, estudios más recientes y con el desarrollo de las ómicas, se ha visto que es más preciso distinguir las subpoblaciones de células dendríticas a través de la ontogenia y la firma transcriptómica (Segura 2016).

El estudio de los subtipos de células dendríticas en humanos se ha visto condicionado a la disponibilidad de muestras, por lo que el grueso de la información se ha obtenido a partir de las células dendríticas de sangre periférica. La información de las células dendríticas de tejidos es limitada y se tienen que comparar con las células dendríticas de tejidos de ratón. Las células dendríticas de tejidos periféricos tienen la capacidad de migrar a través de la linfa hacia los nódulos linfáticos donde llegan con un fenotipo maduro. Mientras que las células dendríticas residentes de órganos linfoides no son migratorias y expresan bajos niveles de marcadores de maduración. A continuación, se describen brevemente algunas de las subpoblaciones de células dendríticas:

- Células dendríticas plasmacitoides (pDC): esta subpoblación fue descrita originalmente a partir de sangre periférica humana. El desarrollo de las pDC depende de la citocina hematopoyética Flt3-L. También se ha observado que el factor de transcripción E2-2 es fundamental para el desarrollo de las pDC. Son células especializadas en la secreción de interferón tipo I ante estímulos de origen viral. A diferencia de las pDC de ratón las de humano sí presentan antígenos a los linfocitos T y se ha observado que dependiendo del tipo de señales de maduración pueden inducir la polarización hacia la respuesta Th1 o generar linfocitos T reguladores. Las pDC pueden hacer presentación cruzada de antígenos (Durand & Segura 2015; Segura 2016).
- Células dendríticas clásicas (o mieloides) BDCA1/CD1c⁺ (cDC CD1c⁺): esta subpoblación se ha observado en sangre, bazo, amígdalas, nódulos linfáticos, pulmones, hígado e intestinos. El desarrollo de las cDC CD1c⁺ depende de los factores de transcripción zbtb46 e IRF8, así como de la citocina Flt3-L. Se ha observado que las cDC CD1c⁺ son homologas a las células dendríticas clásicas murinas dependientes de IRF4. En un estudio se demostró que las cDC CD1c⁺

de pulmón que han sido activadas por *Aspergillus fumigatus* son potentes inductoras de la respuesta Th17. Las cDC CD1c⁺ de los nódulos linfáticos en estado basal pueden inducir respuestas Th1 y Th2 y también pueden hacer presentación cruzada de antígenos. De manera interesante las cDC CD1c⁺ pueden hacer presentación cruzada a linfocitos T CD8 de memoria.

- Células dendríticas clásicas (o mieloides) BDCA3/CD141⁺ (cDC CD141⁺): las cDC CD 141⁺ son muy similares a las cDC CD1c⁺, se distribuyen en los mismos tejidos, aunque las cDC CD 141⁺ se han observado también en la piel. El desarrollo de las cDC CD 141⁺ también depende de los factores de transcripción *zbtb46* e IRF8 y de la citocina Flt3-L. Las cDC CD 141⁺ se ha demostrado que son homologas a las células dendríticas clásicas murinas dependientes de Batf3. También pueden polarizar la respuesta inmune hacia Th1 o Th2 y hacer presentación cruzada de antígenos.

En pacientes con mutaciones en el gen IRF8 se ha observado que carecen de ambos tipos de células dendríticas clásicas (Durand & Segura 2015; Segura 2016).

- Células de Langerhans: esta subpoblación se ha observado en la epidermis y en las mucosas, son potentes activadoras de linfocitos T CD8 y CD4 y pueden polarizar la respuesta inmune hacia Th2. En humanos son un subtipo de célula dendrítica que no está relacionado ontológicamente con los demás subtipos de células dendríticas ya que en pacientes con mutaciones en GATA2 carecen de todos los subtipos de células dendríticas, mientras que las células de Langerhans se mantienen estables (Segura 2016).
- Células dendríticas derivadas de monocitos (moDC): son también llamadas células dendríticas inflamatorias ya que se diferencian a partir de monocitos reclutados durante procesos inflamatorios causados por patógenos o libres de patógenos, allí se diferencian en células con características de las células dendríticas tales como marcadores de superficie celular, capacidad de migrar a los nódulos linfáticos y procesamiento de antígenos. Las células dendríticas inflamatorias tienen una firma transcriptómica muy parecida a la de las moDC *in vitro* y de manera interesante ambas expresan el factor de transcripción *zbtb46*. Se ha observado que las células dendríticas inflamatorias provenientes de fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide pueden estimular linfocitos T CD4 vírgenes y polarizar la respuesta inmune hacia Th17 (Segura 2016; Chow et al. 2016).

1.2.3 Papel de las células dendríticas durante la leishmaniasis

Leishmania es un parásito exitoso gracias a que es capaz de modular la respuesta inmune del hospedero y de manera específica de modular la maduración de las células dendríticas.

Recientemente se ha descrito que simulando la infección que ocurre de manera natural, utilizando el modelo murino, los promastigotes de *L. major* infectan rápidamente a los macrófagos y neutrófilos que se encuentran en el sitio donde se inoculó al ratón. Los promastigotes logran entrar al macrófago sin activarlo, gracias a que lo hacen usando el receptor 3 del complemento (CR3), lo que apaga la vía de señalización de la IL-12. Dentro de los macrófagos, el promastigote se diferencia a amastigote y se comienza a dividir rápidamente. Posteriormente los amastigotes son liberados al medio extracelular y son fagocitados por otras células como las células dendríticas. Las células dendríticas fagocitan a los amastigotes a través de los receptores I y III para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas G (Fc γ I y Fc γ III), comienzan a secretar IL-12 (p40) y migran hacia los nódulos linfáticos próximos donde activan a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productores de INF- γ iniciando una respuesta Th1/Tc1, lo que permite que el ratón resuelva la infección. Sin embargo, las células dendríticas productoras de IL-12 sólo se han podido observar hasta la semana 4 posterior a la infección, con un pico en la semana 6, justo antes de que la respuesta inmune Th1/Tc1 productora de INF- γ se desarrolle completamente (von Stebut 2016). Hasta hace poco no se sabía por qué tardaba tanto la maduración de las células dendríticas, sin embargo, Iborra y colaboradores han descrito una vía que ayuda a entender el retraso en la maduración de las células dendríticas. Ellos describieron que los parásitos de *L. major* secretan un factor soluble que se une al receptor inducible de macrófagos de lectinas tipo C (Mincle) de las células dendríticas, lo que induce la inhibición de la maduración. Demostraron que al utilizar ratones deficientes en el receptor Mincle fueron capaces de controlar la reproducción del parásito y el tamaño de la lesión fue más pequeña, asociado con el incremento de la respuesta inmune Th1/Tc1 junto al aumento de la maduración y migración de las células dendríticas (Iborra et al. 2016).

No solo resulta importante la maduración de las células dendríticas sino también la subpoblación de célula dendrítica que inicia la respuesta inmune. Diversos grupos han demostrado que en la leishmaniasis cutánea, las células de Langerhans inducen una respuesta inmune de linfocitos T reguladores (Treg), mientras que las células dendríticas dérmicas de ratón (dDC) CD103⁺ son las responsables de inducir una respuesta inmune protectora (von Stebut 2016). Por lo que resulta de suma importancia explorar todas las subpoblaciones de células dendríticas durante la infección con *Leishmania*, tanto en el

modelo clásico (murino/*L. major*), como en pacientes infectados y con las diferentes especies de *Leishmania* (p. ej. *L. mexicana*).

Es poca la información sobre los mecanismos moleculares que utiliza *L. mexicana* para modular a las células dendríticas, ya sean de ratón o de humano. Se ha observado que al infectar ratones resistentes (a *L. major*) con *L. mexicana*, los ratones no resuelven la infección y la enfermedad se vuelve crónica, lo que ha sido asociado a la disminución del reclutamiento de monocitos, la reducción en la síntesis de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) en las moDC, junto con el decremento en la migración a los nódulos linfáticos, lo que redundo en la activación insuficiente de la respuesta inmune Th1 (Petritus et al. 2012). Al infectar células dendríticas de ratón con promastigotes de *L. mexicana*, se ha observado que el parásito rápidamente afecta los mecanismos moleculares de las células dendríticas necesarios para desarrollar una respuesta inmune protectora, entre ellos, aumenta la actividad de las fosfatasa de tirosina lo que se traduce en la inactivación de la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), disminuye la translocación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1, aunado a esto, también modula los marcadores de maduración de las células dendríticas, reduciendo la expresión en la superficie celular de moléculas presentadoras de antígenos y coestimuladoras (Contreras et al. 2014).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que en células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC) el lipofosfoliglicano purificado de promastigotes de *L. mexicana* induce una mayor producción de IL-12 y translocación del factor de transcripción NF- κ B, comparado con los monocitos (Argueta-Donohue et al. 2008). Infectando células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón con amastigotes, demostramos que se disminuye la producción de óxido nítrico y se regula de manera negativa la síntesis de la iNOS (Wilkins-Rodriguez et al. 2010).

Dado que *L. mexicana* es un parásito intracelular obligado es vital para su sobrevivencia lograr regular la apoptosis de la célula hospedera, ya que si muere demasiado pronto no logrará reproducirse para invadir nuevas células.

1.3 La apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que clásicamente se ha descrito utilizando marcadores morfológicos tales como la condensación de la cromatina, el encogimiento del citoplasma, la formación y separación de los cuerpos apoptóticos y que además no produce inflamación. Sin embargo, el comité de nomenclatura de muerte celular ha propuesto que la caracterización de la apoptosis (junto con todo tipo de

muerte celular) se debe hacer con base en parámetros bioquímicos cuantificables y no en términos de los parámetros morfológicos (Galluzzi et al. 2014).

La apoptosis se puede dividir en dos fases, la fase iniciadora en la que se activan los genes y las vías de señalización necesarias para llevar a cabo la apoptosis y la fase ejecutora en la que las enzimas encargadas de desensamblar a la célula están activas y se logran observar los cambios morfológicos característicos de la apoptosis.

La apoptosis se ha dividido según la fase iniciadora, de esta manera tenemos la vía extrínseca o activada por receptores, la vía perforina/granzima y la vía intrínseca o mitocondrial. La vía extrínseca es activada por procesos extracelulares a través de ligandos solubles que se unen a sus receptores asociados con dominios de muerte, como por ejemplo FAS/FASL. La vía perforina/granzima es iniciada por células citotóxicas del sistema inmune, como por ejemplo células NK y linfocitos T CD8⁺. La vía intrínseca es activada por procesos intracelulares tales como el daño al DNA o acumulación de proteínas mal plegadas y depende en gran manera de la actividad de la mitocondria (Figura 3). Sin embargo, dividir la apoptosis según la manera en que es iniciada es algo puramente didáctico, ya que las vías no son mutuamente excluyentes y se pueden activar unas a otras, a través de circuitos de retroalimentación positiva.

Además, todas las vías convergen en la fase ejecutora, la cual es iniciada con la activación de la procaspasa 3 y tiene como resultado final la fragmentación del DNA, la degradación de las proteínas nucleares y del citoesqueleto, expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas, formación de los cuerpos apoptóticos y finalmente la fagocitosis por células fagocíticas (Elmore 2007).

1.3.1 La vía extrínseca

Esta vía es iniciada por los receptores que son codificados por el gen de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), los miembros de esta familia de receptores se caracterizan por un dominio intracelular de aproximadamente 80 residuos de aminoácidos llamado el dominio de muerte (DD). Los mejor estudiados son el receptor de Fas y su ligando FasL (FasL/FasR), el receptor para el factor de necrosis tumoral 1 y su ligando el TNF- α (TNF- α /TNFR1), también se conocen, Apo3L/DR3, TRAIL/TRAILR, los receptores de netrina (UNC5A-D) aunque estos últimos sólo inducen la apoptosis cuando la concentración específica del ligando cae por debajo de un punto crítico (Elmore 2007; Galluzzi et al. 2012).

Cuando el FasL se une al receptor FasR, que en la superficie celular se encuentra como un homotrímero lábil, este se estabiliza e induce cambios conformacionales en el DD

para reclutar proteínas proapoptóticas tales como la proteína de unión a DD asociada a FAS (FADD), la proteína cinasa que interactúa con receptores (RIPK1), procaspasa iniciadoras (2, 8, 9 y 10), principalmente la 8 y la 10. También a proteínas antiapoptóticas tales como las proteínas celulares inhibitoras de la apoptosis (IAP), la ubiquitina ligasa E3, la proteína cFLIP que intervienen con la activación de las caspasas, entre otras. Todas estas proteínas unidas al trímero de FasR forman el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), lo que constituye una plataforma para la activación autocatalítica de la procaspasa 8 o 10. Una vez activada la caspasa 8 o 10 se inicia la fase ejecutora de la apoptosis. La caspasa 8 puede degradar a Bid y formar Bid truncado (tBid) e iniciar la vía extrínseca de la apoptosis (Figura 3) (Galluzzi et al. 2012).

1.3.2 La vía perforina/granzima

Esta vía es iniciada por células citotóxicas del sistema inmune, como las células NK, las cuales se encargan de eliminar células tumorales o infectadas por virus y otros parásitos intracelulares (p. ej. *L. mexicana*). Una vez que la célula citotóxica identifica a la célula blanco, secreta la perforina que se une a la membrana de la célula blanco y forma poros a través de los cuales vierte al interior gránulos que contienen proteasas de residuos de serina llamadas granzimas A y B. La granzima A inicia la apoptosis de manera independiente a las caspasas ya que degrada al complejo de proteínas de nucleosoma llamado SET, el cual se encarga de inhibir el gen *NM23-H1*, iniciando la síntesis de la DNAasa NM23-H1, la que a su vez inicia la fragmentación del DNA. La granzima B puede iniciar la apoptosis cortando y activando directamente a la procaspasa 3, también puede activar la procaspasa 10 e iniciar la cascada de activación de las caspasas hasta llegar a las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7), también puede degradar al inhibidor de la DNAasa activada por caspasas (ICAD). De manera interesante la granzima B puede cortar a Bid para formar tBid e iniciar la vía extrínseca de la apoptosis (Figura 3) (Elmore 2007).

1.3.3 La vía intrínseca o mitocondrial

Esta vía es iniciada por estrés celular, cuyo origen puede ser de diferentes fuentes tales como daño al DNA, estrés oxidativo, acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, radiación, hipoxia, privación de nutrientes, etc. Sin importar que origen tenga el estímulo, convergen en la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP), el cual, puede ser originado en la membrana externa de la mitocondria por la acción de las proteínas proapoptóticas Bak y Bax que se unen a la membrana formando un poro, un proceso denominado transición de la permeabilidad de la mitocondria (MPT), o bien por un proceso denominado transición de la permeabilidad por un complejo proteínico formador de poros (PTPC) que se origina en

la membrana interna de la mitocondria. Una vez que se da la MOMP, constituye un punto de no retorno durante el proceso apoptótico, pues ocurren múltiples procesos letales para la célula tales como (1) la disipación del potencial de membrana con la consecuente desaparición de la síntesis de ATP y los sistemas de transporte activo, (2) la liberación de proteínas tóxicas desde el espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma tales como el citocromo C, el factor inductor de apoptosis (AIF), la endonucleasa G (ENDOG), la proteína de unión directa a IAP con pI bajo (DIABLO o SMAC), la proteína con requerimiento de temperatura elevada A2 (HTRA2) y (3) la inhibición de la cadena respiratoria, favoreciendo la sobre producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que activa un circuito de retroalimentación positiva amplificando las señales apoptóticas. En el citoplasma el citocromo C se une a la proteína adaptadora APAF1 y la activa, lo que induce que se reclute la procaspasa 9 formando un complejo multiproteínico denominado apoptosoma, a través del cual se activa por autoproteólisis la procaspasa 9, la que a su vez activa a la procaspasa 3 iniciando la fase ejecutora de la apoptosis (Galluzzi et al. 2012).

Por otro lado, AIF y la EDOG se translocan al núcleo celular donde inician la fragmentación del DNA en fracciones de 50-300 kb llevando a cabo la apoptosis de manera independiente de las caspasas. Mientras que las proteínas SAMAC/DIABLO y HTRA2 se encargan de inhibir las funciones antiapoptóticas la familia de proteínas IAP, además HTRA2 tiene actividad de proteasa de residuos de serina lo que contribuye a la fase ejecutora de la apoptosis de manera independiente a las caspasas (Figura 3) (Elmore 2007; Galluzzi et al. 2012).

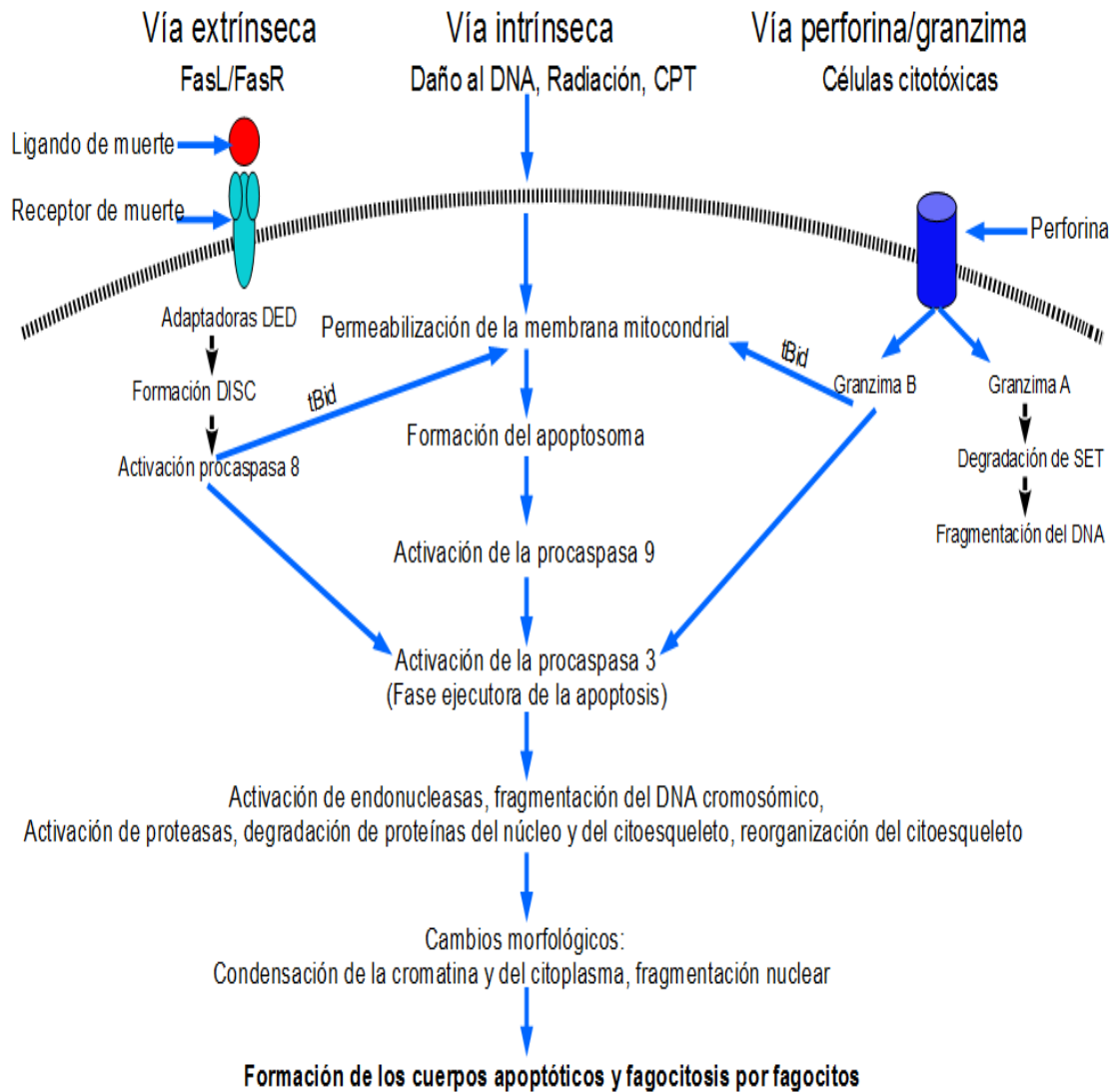


Figura 3. Esquema de las vías de inducción de la apoptosis. Las tres vías de inducción de la apoptosis, la vía extrínseca, la intrínseca y la perforina/granzima, convergen en la activación de la procaspasa 3 y poseen ciclos de retroalimentación positiva a través de proteínas proapoptóticas, como por ejemplo tBid (Elmore 2007).

1.3.3.1 Regulación de la vía extrínseca

Las proteínas que se encargan de regular la MOMP son las de la familia de Bcl-2, que se caracterizan por los dominios de homología llamados BH que van del 1 al 4. De esta manera, están las proteínas que poseen los cuatro dominios de homología BH y que tienen actividad antiapoptótica como, por ejemplo: Bcl-2, Bcl-xL, MCL-1, A1, etc. Las que tienen actividad proapoptótica se subdividen en dos grupos, las que poseen los dominios de homología de BH1 a BH3, Bax y Bak y que además son las efectoras ya que al polimerizarse en la membrana de la mitocondria se encargan de iniciar la MOMP. Por ultimo está el subgrupo de proteínas que poseen únicamente el dominio de

homología BH3 tales como Bad, Bid, Bik, Bmf, PUMA, NOXA, Hrk, etcétera, las cuales se encargan de censar las señales apoptóticas y de activar a Bax/Bak o de inhibir a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2. La caspasa 8 y la granzima B pueden cortar a Bid y formar Bid truncado, a través del cual, la vía perforina/granzima y la vía extrínseca son amplificadas por la vía intrínseca (Dai et al. 2016; Kolek et al. 2016).

1.3.4 Participación de las ROS durante la apoptosis

Durante la apoptosis se producen las especies reactivas del oxígeno (ROS), sin embargo, también se sabe que la sobreproducción de estas puede llevar directamente a la apoptosis de la célula a través de la vía intrínseca (Jeong & Joo 2016).

Las ROS son un grupo heterogéneo de moléculas pequeñas altamente reactivas que se derivan a partir del oxígeno molecular (O_2), de las cuales las que tienen mayor importancia fisiológica son los radicales tales como el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^-), mientras aquellos que no son radicales el más importante es el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Galadari et al. 2017). Las ROS se producen de manera constitutiva, principalmente en la mitocondria durante la actividad de la cadena de transporte de electrones, aunque también se pueden producir en el citoplasma por la NADPH oxidasa, mientras que la concentración se mantiene baja y en equilibrio a través de diversos procesos. Cuando las ROS están en homeostasis participan en diversos procesos celulares tales como el desarrollo del ciclo celular, la proliferación, la diferenciación y la migración. Sin embargo, ante un estímulo de estrés celular este puede conducir a la sobreproducción de las ROS y sobrepasar la capacidad de respuesta de los agentes antioxidantes, estos estímulos incluyen metales pesados, nano y micropartículas, radiación ionizante y UV, fármacos (quimioterapéuticos, trióxido de arsénico, sanguinarina, ciclohexamida, etc.). Una vez que las ROS exceden el umbral se inicia un proceso denominado estrés oxidativo, causando daño a las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, membranas y organelos, lo que favorece o induce la apoptosis de la célula. Las ROS han sido implicadas en la activación de diversas vías de señalización tales como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la activación de factores de transcripción como Nrf2 y p53, que en conjunto favorecen la apoptosis (Redza-Dutordoir & Averill-Bates 2016).

Se ha demostrado que las ROS pueden oxidar a Bcl-2 y de esta manera eliminar la actividad antiapoptótica, también que disminuye la ubiquitinación de Bax y Bad e incrementar la de Bcl-2 y de esta manera facilitar que sea degradado por el proteasoma. La proteína cinasa reguladora de señales apoptóticas 1 (ASK1) actúa como un importante mediador de la apoptosis inducida por las ROS, se ha demostrado que el

H₂O₂ induce la dimerización de ASK1 lo que provoca que se auto active y este a su vez active a la cinasa N-terminal c-Jun (JNK) y a p38 lo que desemboca en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Galadari et al. 2017). Además cuando JNK es activado por estrés oxidativo puede fosforilar e inactivar proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-xL y activar proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Redza-Dutordoir & Averill-Bates 2016).

Cuando el estrés oxidativo es bajo, la proteína supresora de tumores p53 induce el arresto del ciclo celular, la reparación del DNA y la senescencia. Sin embargo, cuando el estrés oxidativo es alto y el daño celular es demasiado severo, p53 regula negativamente la síntesis de proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2, Bcl-xL y las IAP, mientras que regula positivamente la síntesis de proteínas proapoptóticas tales como Bax, Bid, PUMA, NOXA y APAF1 (Redza-Dutordoir & Averill-Bates 2016).

Para mantener en homeostasis la concentración de ROS la célula utiliza diversos mecanismos, que en conjunto son llamados, sistemas antioxidantes. Los sistemas antioxidantes de la célula se pueden dividir en: (1) enzimáticos, entre los que destacan los del complejo de la tiorredoxina (TRX) y el complejo del glutatión (GSH), aunque también está la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, y los (2) no enzimáticos tales como el ácido ascórbico, el ácido lipóico, el α -tocoferol, etc. La SOD se encarga de dismutar el anión superóxido en H₂O₂ el cual a su vez es reducido a H₂O por el complejo TRX, el complejo GSH o por la catalasa (Figura 4) (Galadari et al. 2017).

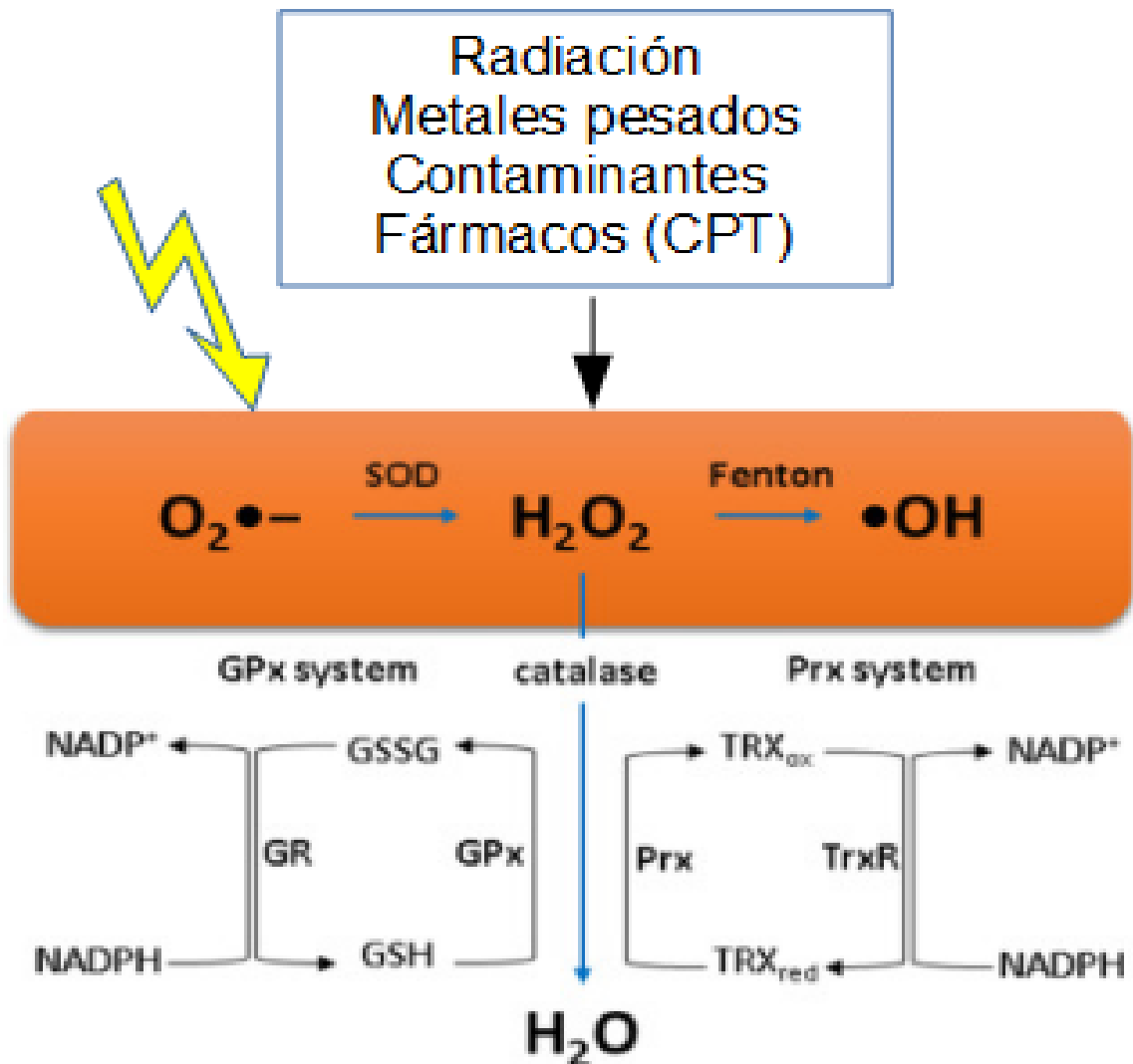


Figura 4. Mecanismos celulares antioxidantes. La sobreproducción de ROS inducida por estímulos de estrés celular activa los sistemas antioxidantes de la célula. La SOD se encarga de dismutar el anión superóxido en H_2O_2 , el cual es posteriormente reducido a H_2O por el complejo GSH o el TRX (Galadari et al. 2017).

1.4 El glutatión (GSH)

El glutatión en la forma reducida es un tripéptido formado enzimáticamente por residuos de glicina, cisteína y glutamato, que está presente en hongos, plantas y animales. La forma oxidada del GSH (GSSG) contiene dos moléculas de glutatión unidas por un puente disulfuro. Una buena manera de conocer el estado redox de la célula es medir la relación GSH/GSSG (Jeong & Joo 2016). Es el tiol no proteínico más abundante en las células de los mamíferos, actúa como un agente reductor y es el principal antioxidante intracelular encargado de mantener un estricto control del equilibrio redox. El GSH se encuentra tanto en el citoplasma como en los organelos, siendo más

abundante en el citoplasma, en el que se encuentra el 85% del total, aunque también se puede encontrar compartimentalizado en la mitocondria, los peroxisomas y el retículo endoplásmico. La síntesis del GSH se inicia a partir de la formación del γ -glutamilcistein a partir del glutamato y la cisteína y es catalizado por la γ -glutamilcistein sintetasa (γ -GCS). Posteriormente, se agrega la glicina por la acción de la GSH sintetasa (GS). Tanto la biodisponibilidad de la cisteína como la presencia de la γ -GCS son factores limitantes en la síntesis del GSH. La γ -GCS se puede inhibir a través del inhibidor específico L-butionina-sulfoximina (BSO) (Figura 5) (Franco & Cidlowski 2009).

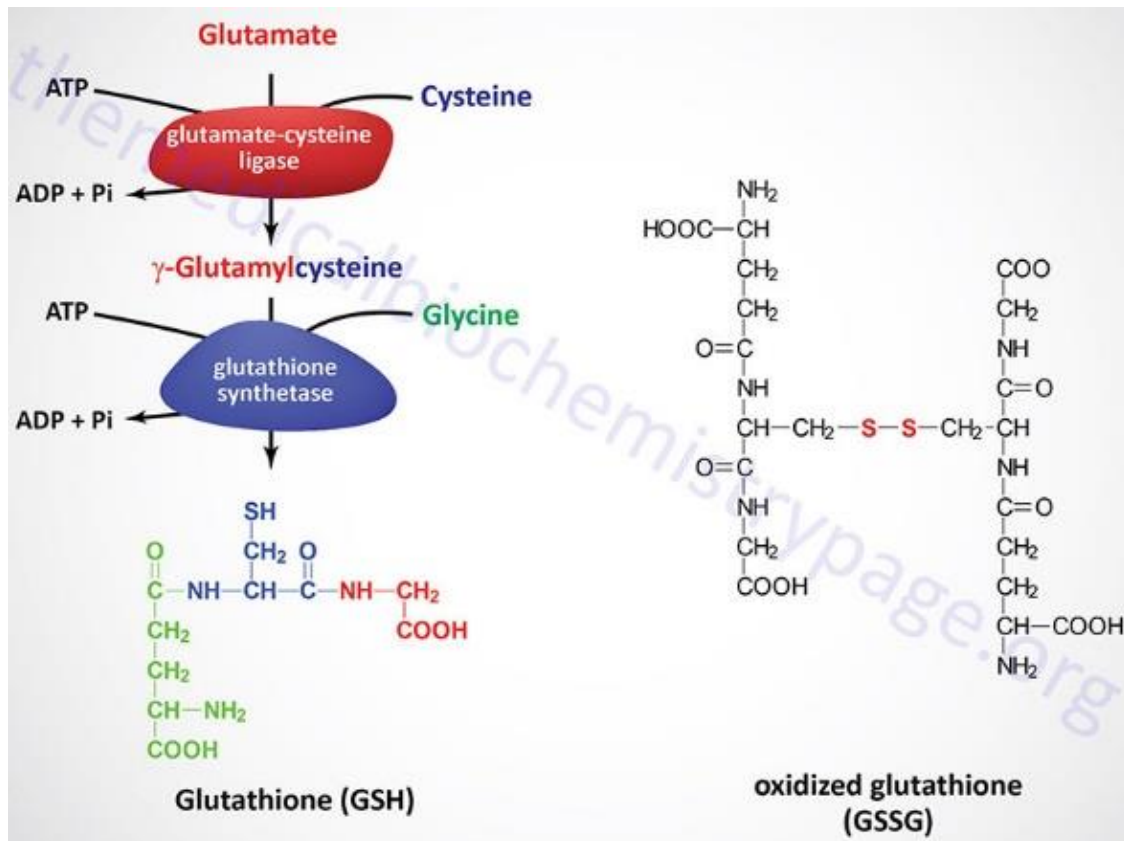


Figura 5. Esquema de la síntesis del GSH. La biosíntesis *de novo* del GSH se inicia con la unión del glutamato y de la cisteína, catalizado por la glutamyl-cistein ligasa, o también conocida como γ -glutamylcistein sintetasa (γ -GCS). Finalmente, la GSH sintetasa cataliza la unión de la glicina para formar el GSH. Ambas reacciones son dependientes de ATP. El glutatión oxidado es un homodímero unido por un puente disulfuro (tomado de: themedicalbiochemistrypage.org).

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar la participación del glutatión en el efecto de inhibición ejercido por *L. mexicana* en la apoptosis inducida en las células dendríticas.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Cuantificar la concentración del GSH en las células dendríticas en estado basal, tratadas con la CPT y/o infectadas con promastigotes de *L. mexicana*.
- 2) Determinar la producción de las ROS en las células dendríticas en estado basal, tratadas con la CPT y/o infectadas con promastigotes de *L. mexicana*.
- 3) Determinar el efecto del inhibidor de la síntesis del GSH, L-butionina sulfoximina (BSO), en los niveles del GSH en las células dendríticas en estado basal, tratadas con la CPT y/o infectadas con promastigotes de *L. mexicana*.
- 4) Analizar la expresión proteínica de Bcl-xL en las células dendríticas en estado basal, tratadas con la CPT y/o infectadas con promastigotes de *L. mexicana*.
- 5) Analizar la expresión proteínica de la caspasa3 en las células dendríticas en estado basal, tratadas con la CPT y/o infectadas con promastigotes de *L. mexicana*.

3 Antecedentes

Leishmania, al ser un parásito intracelular obligado, precisa de mecanismos para manipular a la célula hospedera, tanto para evadir la respuesta inmune, como para aumentar la supervivencia de la célula y de esta manera completar su ciclo de vida en ella. Uno de estos mecanismos es la inhibición de la apoptosis. La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se caracteriza por no causar inflamación, con cambios morfológicos y fisiológicos característicos y en la que participan una gran cantidad de moléculas que regulan las vías de activación y efectoras. Una de estas moléculas es el glutatión.

El GSH es el tiol no proteínico más abundante en las células de los mamíferos, actúa como un agente reductor y es el antioxidante más importante que mantiene la homeostasis en los niveles de óxido-reducción. La actividad de la γ -GCS y la disponibilidad de la cisteína son factores limitantes para la síntesis del GSH (Franco & Cidlowski 2009). Se ha observado que en ausencia de cisteína se induce la apoptosis por depleción del GSH. La amplia participación del GSH en la apoptosis ha sido demostrada también en ratones deficientes en la γ -GSC, los cuales mueren por apoptosis (Armstrong et al. 2004). En contra parte, al inducir la apoptosis en células que sobre expresan la γ -GSC se ha observado que son resistentes a los estímulos apoptóticos (Fan et al. 2005). La γ -GCS es un heterodímero con una subunidad catalítica y una reguladora, además la acción de esta enzima se puede inhibir con la butionina sulfoximina (BSO), induciendo el decremento del GSH intracelular. El promotor de la γ -GCS contiene regiones consenso con sitios de unión a factores de transcripción tales como la proteína activadora 1 y 2 (AP-1 y AP-2), el factor de transcripción nuclear κ -B (NF- κ B) y el elemento de respuesta electrofílica (EpRE), también llamado elemento de respuesta a antioxidantes (ARE). El EpRE es un elemento que interviene en la regulación de la expresión del gen del factor relacionado al factor nuclear eritroidina-2 (Nrf2) y se ha observado que la inhibición del Nrf2 reduce la expresión del gen de la γ -GCS, lo que conlleva a la reducción de los niveles del GSH y las enzimas relacionadas al mismo (Shih et al. 2003).

El GSH es una molécula muy importante en el mantenimiento de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS). Los ROS son determinantes en la activación de las MAP cinasas JNK y p38 que son cinasas que participan activamente en diferentes procesos celulares tales como crecimiento, diferenciación, respuesta inmune y apoptosis.

Leishmania, al ser un parásito intracelular obligado, requiere asegurar la sobrevivencia en la célula hospedera. Una de las estrategias para lograr esto es la inhibición de la apoptosis. Las células dendríticas son hospederas de este parásito y nuestro grupo de trabajo demostró que los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* inhiben la apoptosis inducida con camptotecina (CPT) en células dendríticas derivadas de monocitos humanos de sangre periférica (Valdes-Reyes et al. 2009; Gutierrez-Kobeh et al. 2013). Demostramos también que los promastigotes de *L. mexicana* inhiben la fosforilación de las MAP cinasas JNK1 y p38, inducida por la CPT, las cuales participan en la vía de activación de la apoptosis (Rodríguez-González et al. 2016). También demostramos que al infectar a las moDC con amastigotes de *L. mexicana* se inhibe la fosforilación de JNK y p38 inducida por la CPT, además que mantiene activa la vía de PI3K/AKT (Vázquez-López et al. 2015). Por otro lado, se ha demostrado que *Leishmania* activa la vía de señalización PI3K/AKT para inhibir la apoptosis inducida en los macrófagos murinos (Ruhland et al. 2007).

Se ha demostrado que las ROS pueden oxidar a Bcl-2 y de esta manera eliminar la actividad antiapoptótica, también que disminuye la ubiquitinación de Bax y Bad e incrementar la de Bcl-2 y de esta manera facilitar que sea degradado por el proteasoma. La proteína cinasa reguladora de señales apoptóticas 1 (ASK1) actúa como un importante mediador de la apoptosis inducida por las ROS, se ha demostrado que el H₂O₂ induce la dimerización de ASK1 lo que provoca que se auto active y este a su vez active a la cinasa N-terminal c-Jun (JNK) y a p38 lo que desemboca en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Galadari et al. 2017). Además cuando JNK es activado por estrés oxidativo puede fosforilar e inactivar proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-xL y activar proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Redza-Dutordoir & Averill-Bates 2016). El GSH es el agente más importante en mantener los niveles de las ROS, por ello es importante estudiar la participación del GSH en el contexto de la inhibición de la apoptosis por *L. mexicana* en las células dendríticas humanas.

4 Hipótesis

Leishmania mexicana aumenta los niveles de glutatión como un mecanismo inhibitor de la apoptosis

5 Metodología

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

Las moDC se obtuvieron a partir de concentrados de leucocitos o “buffy coats” de donadores sanos, los cuales fueron proporcionados por el banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo La Raza, IMSS. Las células mononucleares se separaron por centrifugación en un gradiente de densidad utilizando Histopaque® (Sigma, ST Louis, MO, EUA) según las especificaciones del fabricante. Las células mononucleares se marcaron con un anticuerpo monoclonal anti-CD14 acoplado a microperlas magnéticas, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Una vez que se purificaron los monocitos CD14⁺ se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Corning, Cellgro, Manassas, VA, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2mM de L-Glutamina, 100U/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomycin (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), 50mM de 2-mercaptoetanol (Sigma, ST Louis, MO, EUA), ajustado a pH 7.2 (R-10). Con el fin de diferenciar los monocitos humanos en células dendríticas, éstos se sembraron en medio R-10 adicionado con 1000 U/ml de IL-4 y 1000 U/ml de GM-CSF (BD Pharmingen, San José, CA, EUA) y se colocaron en placas de 24 pozos (Corning Life Sciences, NY, EUA) a una densidad de 1×10^6 células/ml en una incubadora con atmósfera húmeda, a 37° C con 5% de CO₂. En los días dos, cuatro y seis de cultivo se cambió el 50% de medio por medio fresco adicionado con las citocinas (Sallusto & Lanzavecchia 1994). En el día siete de cultivo se cosecharon las células no adherentes para caracterizarlas y utilizarlas en los experimentos.

5.2 Caracterización de las moDC y de los monocitos

Los monocitos y las moDC se caracterizaron por citometría de flujo mediante anticuerpos acoplados a fluorocromos dirigidos contra marcadores específicos de superficie. 1×10^6 monocitos o moDC se resuspendieron en 50ml de PBS suplementado con 5% de suero de caballo y 5mM de EDTA y se tiñeron con los siguientes anticuerpos: anti-CD14 PE, anti-CD1a PE, anti-HLA-DR FITC, anti-CD86 FITC y anti-CD3 PE-Cy5 (BD Pharmingen, San José, CA, EUA), durante 20 min a 4° C. La molécula CD14 es un marcador específico para monocitos humanos, mientras que el CD1a es específico para las moDC. Mientras que las moléculas HLA-DR y CD86 reflejan el estado de maduración de las moDC. Finalmente, la molécula CD3 es específica de los linfocitos humanos. Todos los anticuerpos se prepararon a una dilución 1:50. Las células se lavaron tres veces con PBS y se leyeron en el citómetro FACSsort con el software CellQuest (BD,

San José, CA, EUA). Si las células no se leyeron el mismo día, se fijaron con paraformaldehído al 2% y se leyeron al día siguiente. Mientras el análisis de los datos se realizó con la ayuda del programa WinMDI.

5.3 Cultivo de los promastigotes de *L. mexicana*

La cepa de *Leishmania mexicana* utilizada en este trabajo fue la LAC (MHOM/MX/2011/LAC), aislada de un paciente con LCL por el Biol. Arturo A. Wilkins Rodríguez. Los amastigotes se cultivaron en medio Grace suplementado con 100U/ml de penicilina, 100mg/ml estreptomycin (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) y con 20% de suero fetal bovino inactivado por calor (BioWest SAS, Nuaille, FR), ajustado a pH 5.4 a 33° C. Los amastigotes se subcultivaron en el día 7 a una densidad de 1×10^5 parásitos en frascos de cultivo celular de 25cm² (Corning Life Sciences, NY, EUA) en un volumen final de 10ml de medio Grace suplementado (Bates et al. 1992).

Para mantener la virulencia de la cepa, se inocularon 1×10^7 amastigotes del día 7 de cultivo en el cojinete plantar de ratones BALB/c. Una vez desarrolladas las lesiones, los parásitos se aislaron de acuerdo a la metodología descrita anteriormente (Hart et al. 1981; Mosser & Edelson 1985), con algunas modificaciones. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extirpó la pata infectada, la cual se maceró con el émbolo de una jeringa de 10ml sobre una malla de nylon con un poro de 100µm (BD Falcon, Bedford, MA, USA). La suspensión obtenida se centrifugó a 100×g durante 5min a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante y éste se centrifugó a 2000×g durante 10min para obtener a los amastigotes. Los amastigotes se lavaron dos veces más y se sembraron en medio de cultivo Grace suplementado.

Los promastigotes utilizados en los ensayos se obtuvieron diferenciándolos a partir de los amastigotes cultivados. En medio 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100U/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomycin y 2mM de L-Glutamina (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), ajustado a pH 7.2, se sembraron amastigotes a una densidad de 1×10^5 parásitos/ml en un volumen final de 10ml en cajas de cultivo celular de 25cm², a 26° C. En el día tres de cultivo los amastigotes ya se habían diferenciado completamente a promastigotes y con la finalidad de enriquecer el cultivo de promastigotes en fase metacíclica se tomaron 1×10^5 parásitos y se subcultivaron en medio Grace suplementado con 100U/ml de penicilina, 100mg/ml estreptomycin (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) y con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, ajustado a pH 5.4. Finalmente, los promastigotes enriquecidos en la fase metacíclica se cosecharon en el día 4 de cultivo se utilizaron en todos los ensayos de infección (Bates & Tetley 1993).

5.4 Infección y estímulo de las moDC

Las moDC se resembraron en placas de 24 pozos (Corning Life Sciences, NY, EUA) a una densidad de 1×10^6 células/ml de R-10 y se dejaron reposar durante dos horas a 37° C con 5% de CO₂. En el caso del ensayo de producción de las ROS, las moDC se resembraron en placas negras de 96 pozos de fondo plano, tratadas para cultivo celular (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), a una densidad de 90 000 células/90µl de R-10. Previo a iniciar la infección de las moDC, se incubaron durante 2 h con el BSO 100µM. Para favorecer la infección, las moDC se incubaron con los promastigotes de *L. mexicana* a un índice de infección de 10:1, durante dos horas a 26° C. Una vez infectadas las células, se adicionó la camptotecina 10µM (Sigma, ST Louis, MO, EUA) y se incubaron durante 12 horas a 37° C con 5% de CO₂. Como control negativo se utilizaron células en medio solo.

5.5 Cuantificación de las ROS

En las moDC resembradas en las placas negras de 96 pozos y estimuladas de acuerdo a lo descrito anteriormente, se determinó la producción de las ROS utilizando el Fluorometric Intracellular ROS kit (MAK143, Sigma, ST Louis, MO, EUA) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De manera breve, una vez que se resembraron las moDC se centrifugaron a 800rpm durante 2min a temperatura ambiente. Se les agregó el inhibidor de la síntesis del glutatión, el BSO, y posteriormente se infectaron con los promastigotes de *L. mexicana* tal y como se describió anteriormente. Antes de colocar la CPT, se adicionaron 100µl por pozo de la mezcla maestra de reacción (20µl de la solución stock del reactivo de detección de las ROS por cada 10ml del amortiguador de ensayo) y se dejó incubar a 37° C con 5% de CO₂ durante una hora. Posteriormente se agregó el inductor de la apoptosis, la CPT, en un volumen de hasta 20µl y en el control negativo se agregó únicamente medio R-10. Finalmente, las moDC se incubaron durante 12 horas a 37° C con 5% de CO₂ y se leyeron en un espectrofluorómetro con una longitud de onda de excitación de 490nm y una de emisión de 525nm, con un punto de corte (“cutoff”) de 515nm y en el modo de lectura de fondo del pozo. Para determinar la fluorescencia intrínseca de las moDC, se sembraron células con el amortiguador de ensayo, pero sin la solución del reactivo de detección de las ROS y se usaron como blanco. El valor obtenido de la lectura del blanco se restó a las muestras. Todas las muestras se hicieron por duplicado.

5.6 Cuantificación del GSH

Las moDC estimuladas e infectadas se cosecharon y se lavaron tres veces con D-PBS a 600xg durante 10min a 4° C. Con una micropipeta se eliminó por completo el

sobrenadante y se midió el volumen del pellet para agregar tres veces ese volumen de ácido sulfosalicílico (SSA) al 5%. Luego, se hicieron tres ciclos de congelamiento-descongelamiento en nitrógeno líquido y baño maría, con una duración de 6 min cada ciclo. La suspensión de células se centrifugó a 10 000×g durante 10min a 4° C. Se recuperó el sobrenadante y se procedió a hacer la cuantificación del GSH. Si la cuantificación no se realizó dentro de las primeras dos horas el sobrenadante se congeló a -70° C, hasta por diez días.

La cuantificación del GSH total (GSH + GSSG) se realizó con el Glutathione Assay Kit (CS0260, Sigma, ST Louis, MO, EUA) siguiendo las especificaciones del fabricante. De manera breve, la curva patrón se realizó en placas transparentes de 96 pozos de fondo plano (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA). A partir del estándar de GSH 10mM se hicieron diluciones seriadas (0.5nmoles, 0.25nmoles, 0.125nmoles, 0.625nmoles y 0.3125nmoles) con ácido sulfosalicílico al 5%, ajustando a un volumen final de 50µl, posteriormente se colocaron 10µl de cada dilución en la placa de 96 pozos. Para las muestras problema, se agregaron 1µl de cada muestra y se ajustó a 10µl con ácido sulfosalicílico al 5%. Todas las muestras se hicieron por duplicado. A continuación, a cada pozo se agregaron 150µl de la mezcla de trabajo (100mM de fosfato de potasio pH 7.0, 1mM de EDTA, 6U/ml de glutatión reductasa y 1.5 mg/ml de DTNB). Se dejó incubar durante 5min a temperatura ambiente y a cada pozo se agregaron 50µl de NADPH (0.16 mg/ml). Finalmente, la placa se leyó 5 veces a intervalos de 1 min en un espectrofotómetro para microplacas a 412nm.

Para calcular la concentración de GSH total se siguió la formula dada por el fabricante:

$$\text{nmoles de GSH por ml de muestra} = \frac{\Delta A_{412}/\text{min}(\text{muestra}) \cdot \text{dil}}{\Delta A_{412}/\text{min}(1\text{n mole}) \cdot \text{vol}}$$

Donde:

$\Delta A_{412}/\text{min}(\text{muestra})$ = pendiente de la curva generada por la muestra (después de restar el valor del blanco)

$\Delta A_{412}/\text{min}(1\text{n mole})$ = la pendiente calculada para la curva patrón de 1nmole de GSH

dil = el factor de dilución de la muestra original

vol = volumen de la muestra en la reacción, en ml

5.7 Análisis por Western Blot de la expresión de la caspasa 3 y de Bcl-xL

Las moDC, estimuladas en la forma descrita anteriormente, se cosecharon y se lavaron tres veces con PBS a 500xg durante 10min a 4° C. La pastilla se resuspendió en 40 µl de amortiguador de lisis (100mM de Tris-HCL, 2mM de EDTA, 100mM de NaCl y 1% de Triton X-100), suplementado con el coctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA). El lisado celular se centrifugó a 14 000xg durante 10 min a 4° C y se colectó únicamente el sobrenadante (extracto total) para eliminar los restos celulares. Al extracto total se le determinó la concentración de proteína utilizando el BCA Protein Assay Kit (71285 Novagen, Merck Millipore, Billerica, MA, EUA). Las proteínas obtenidas se analizaron por SDS-PAGE en un gel preparado al 12% se cargaron 40µg de proteína y se corrieron a 120V durante 90min. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) en una cámara de electrotransferencia semi-seca (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a 20V durante 45min. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) en amortiguador Tris-salino/Tween 20 al 0.05% (TBST: 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.05% de Tween 20) durante 30min. Las membranas se lavaron tres veces cada 5min con TBST. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4° C en agitación constante con los anticuerpos primarios contra la caspasa 3, monoclonal hecho en ratón (Chemicon, Merck Millipore, Billerica, MA, EUA), contra la Actina, policlonal hecho en cabra y contra Bcl-xL, monoclonal hecho en ratón (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), en TBST con leche descremada al 5%. El anticuerpo contra Bcl-xL se utilizó en una dilución 1:500. Mientras que el anticuerpo contra la caspasa 3 se utilizó 1:3 000 para detectar el zimógeno y 1:500 para detectar la subunidad pequeña (17kD, aproximadamente). Las membranas se lavaron nuevamente con TBST tres veces cada 5min. Las membranas se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios contra las IgG de ratón (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA; diluidos 1:5 000 en leche descremada al 5%) y contra las IgG de cabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; diluido 1:10 000 en leche descremada al 5%). Todos los anticuerpos secundarios estaban acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP). Después de lavar cuatro veces con TBST cada 5min, las membranas se revelaron usando un substrato quimioluminiscente (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) y se expusieron a películas para rayos-X (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). El análisis de densitometría se realizó con el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

5.8 Tinción de las moDC

Para verificar que las moDC fagocitaron a los promastigotes de *L. mexicana* y que estos se lograron transformar en amastigotes, las células se tiñeron con el colorante Giemsa. De manera breve, antes de que las moDC se resembraran en las placas de 24 pozos se colocaron cubreobjetos estériles de vidrio en el fondo de cada pozo. Posteriormente las células se estimularon tal y como se indicó anteriormente. Después de 24 horas, a cada pozo se le retiró el medio y se agregó D-PBS, todo con mucho cuidado para no despegar a las células unidas a los cubreobjetos. Se hicieron dos lavados más con D-PBS. A continuación, las células se fijaron con metanol a 4° C durante 10min, se eliminó el exceso de metanol y se procedió a teñir las células con el colorante Giemsa. Una vez teñidas las células, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con resina sintética. Cada condición se fotografió utilizando una cámara Olympus SC30 acoplada a un microscopio invertido Olympus CKX41.

5.9 Análisis de la viabilidad de los amastigotes liberados de las moDC

Con la finalidad de determinar la viabilidad de los amastigotes que se encontraban en el interior de las moDC, aún después de haber sido expuestos al BSO y a la CPT, se indujo la transformación a promastigotes en medio 199, de acuerdo a la metodología descrita en la literatura (Rogers et al. 2009). De manera breve, después de que las moDC se infectaron y estimularon, la placa de 24 pozos se centrifugó a 400×g a 4° C durante 10min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se hicieron tres lavados con D-PBS, centrifugando a 400×g a 4° C durante 10min. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 200µl de SDS al 0.01% en D-PBS, se incubó durante 10min a 37° C con 5% de CO₂. Una vez que se lisaron las moDC se agregaron 800µl de R-10 y se centrifugó la placa a 3 000×g a 4° C durante 10min para que los amastigotes liberados se concentraran en el fondo del pozo. Los amastigotes liberados de las moDC se resuspendieron en medio 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100U/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomina y 2mM de L-Glutamina (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), ajustado a pH 7.2. La placa se incubó durante 48 horas a 26° C. Finalmente, los promastigotes transformados a partir de los amastigotes viables liberados de las moDC se contaron en una cámara de Neubauer.

5.10 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó una ANOVA de una vía y posteriormente se aplicó una prueba de Tukey para la comparación multipareada, con la ayuda del programa

GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA). Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

6 Resultados

6.1 Citometría de flujo de los monocitos de sangre periférica humana

Los monocitos de sangre periférica humana, obtenidos por selección magnética positiva a través del anticuerpo monoclonal contra el marcador de superficie celular CD14 acoplado a microperlas magnéticas, se caracterizaron por citometría de flujo utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos: anti-CD14 PE, anti-HLA-DR FITC, anti-CD86 FITC y anti CD3 PECy5. Aproximadamente el 70% de la población celular fue positiva para el marcador CD14, 73% positiva para el marcador HLA-DR y 42% positiva para el marcador CD86. Mientras que al analizar la presencia de linfocitos en la población celular se encontró que esta era de apenas 1% (Figura 6).

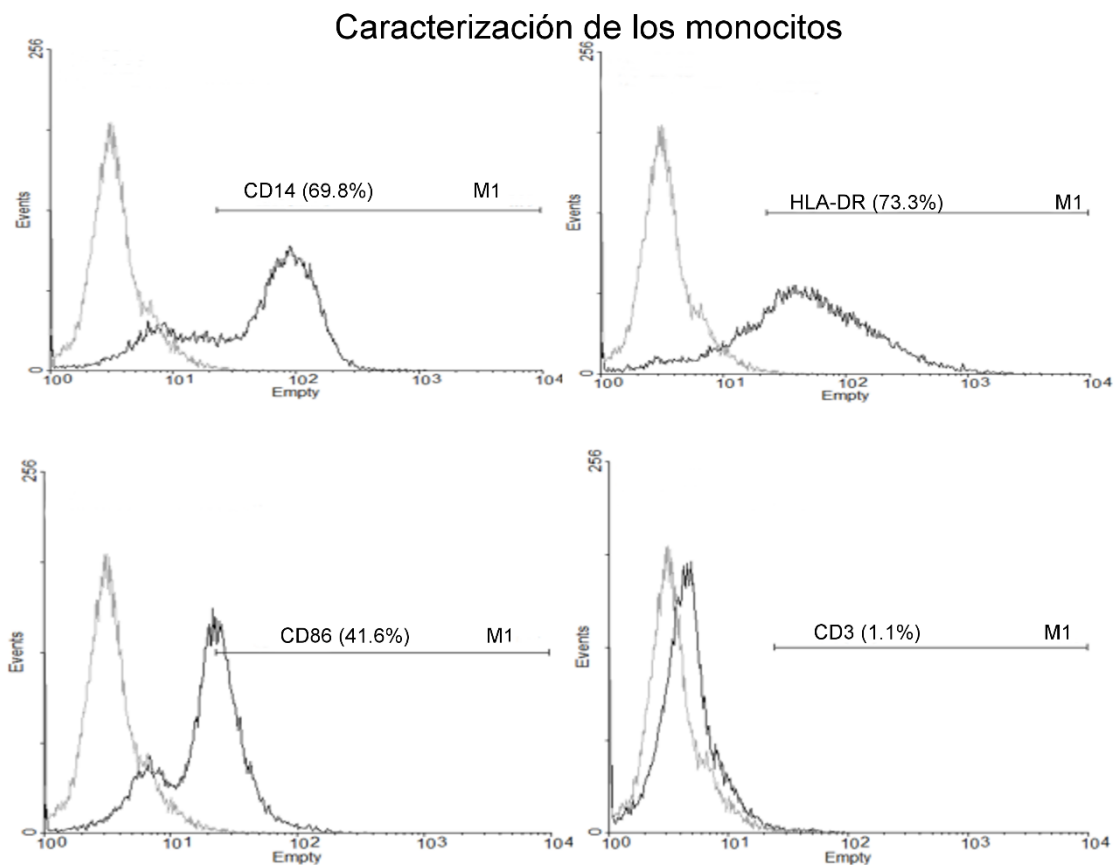


Figura 6. Expresión de diferentes moléculas de superficie en los monocitos humanos analizados por citometría de flujo. Los monocitos purificados expresaron altos niveles de CD14 (70%), HLA-DR (73%), medios de CD86 (42%) y muy bajos niveles de células con el marcador CD3 (1%).

6.2 Citometría de flujo de las moDC

Los monocitos obtenidos se sembraron en medio R-10 suplementado con las citocinas GM-CSF e IL-4 y se incubaron durante 7 días a 37° C con el 5% de CO₂, se les cambio el 50% de medio por medio fresco con las citocinas en los días dos y cuatro de cultivo. Las células se cosecharon en el séptimo día de cultivo y se caracterizaron por citometría de flujo utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos: anti-CD1a PE, anti-CD14 PE, anti-HLA-DR FITC, anti-CD86 FITC y anti CD3 PECy5. De la población que se analizó el 90% fue positiva para el marcador CD1a, el 91% fue positiva para el marcador HLA-DR y el 21% positiva para CD86. Mientras que el marcador de monocitos, el CD14, se redujo al 3% junto con el marcador para linfocitos, el CD3, que bajó hasta el 0.5% (Figura 7). Lo que indica que la pureza de las moDC obtenidas fue alta, en estadio inmaduro y con poca contaminación de linfocitos.

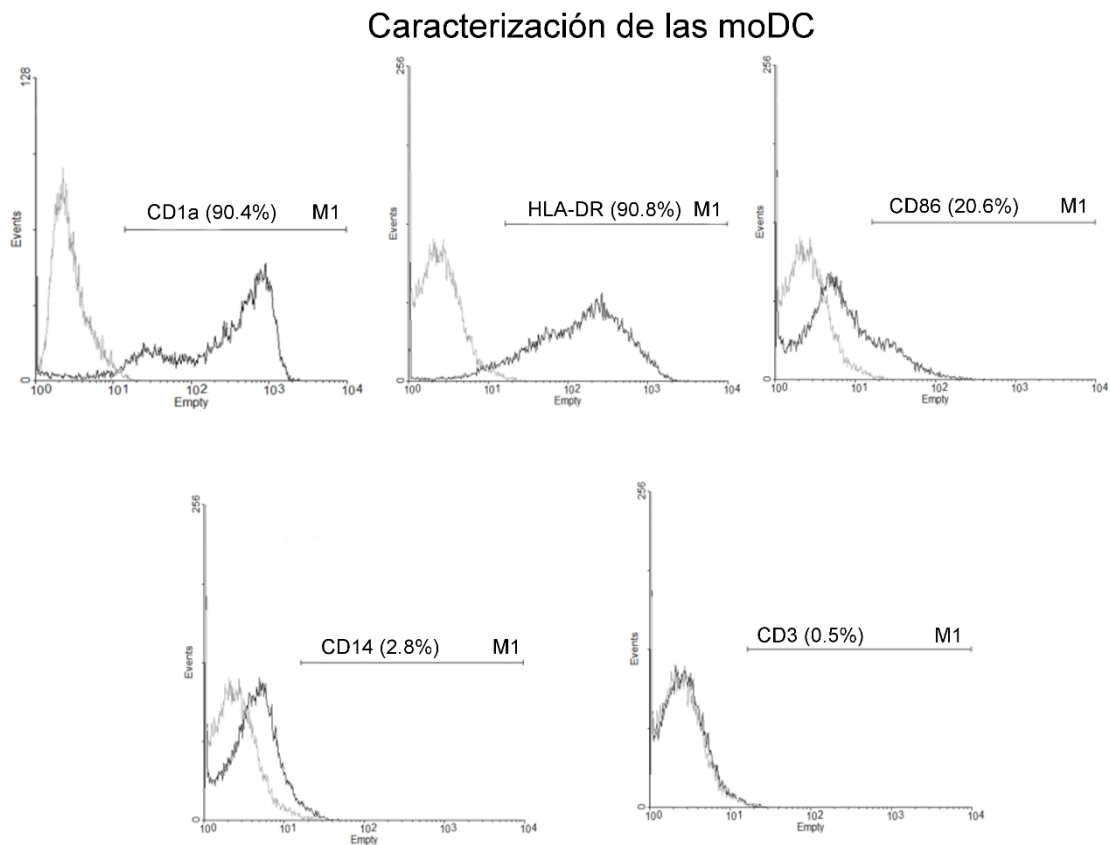


Figura 7. Expresión de diferentes moléculas de superficie en las moDC analizadas por citometría de flujo. Después del séptimo día de cultivo las moDC se caracterizaron y obtuvo que expresaban altos niveles de CD1a y de HLA-DR, niveles bajos de CD86 (lo que sugiere un estadio inmaduro de las moDC). Mientras que los niveles de CD14 y CD3 decrecieron hasta ser casi nulos.

6.3 *Leishmania mexicana* inhibe la apoptosis inducida por la CPT

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado ampliamente que *L. mexicana* inhibe la apoptosis inducida por la CPT (Valdes-Reyes et al. 2009; Gutierrez-Kobeh et al. 2013; Vázquez-López et al. 2015; Rodríguez-González et al. 2016), sin embargo, para que este trabajo estuviera completo decidimos demostrar que bajo las nuevas condiciones experimentales se conservaba dicho fenómeno. Con tal finalidad se analizó la presencia de la caspasa 3, específicamente de la subunidad de 17kD ya que esta es la que tiene actividad proteolítica, utilizando la técnica de WesternBlot. Tal y como se esperaba, la CPT (10 μ M) induce la presencia de la caspasa 3 en las moDC, no así el inhibidor de la síntesis del GSH, el BSO (100 μ M), al menos en un tiempo de 12 horas. Mientras que en las moDC infectadas con los promastigotes de *L. mexicana* la presencia de la caspasa 3 disminuye, al igual que en las moDC tratadas con el BSO e infectadas con los promastigotes (Figura 8).

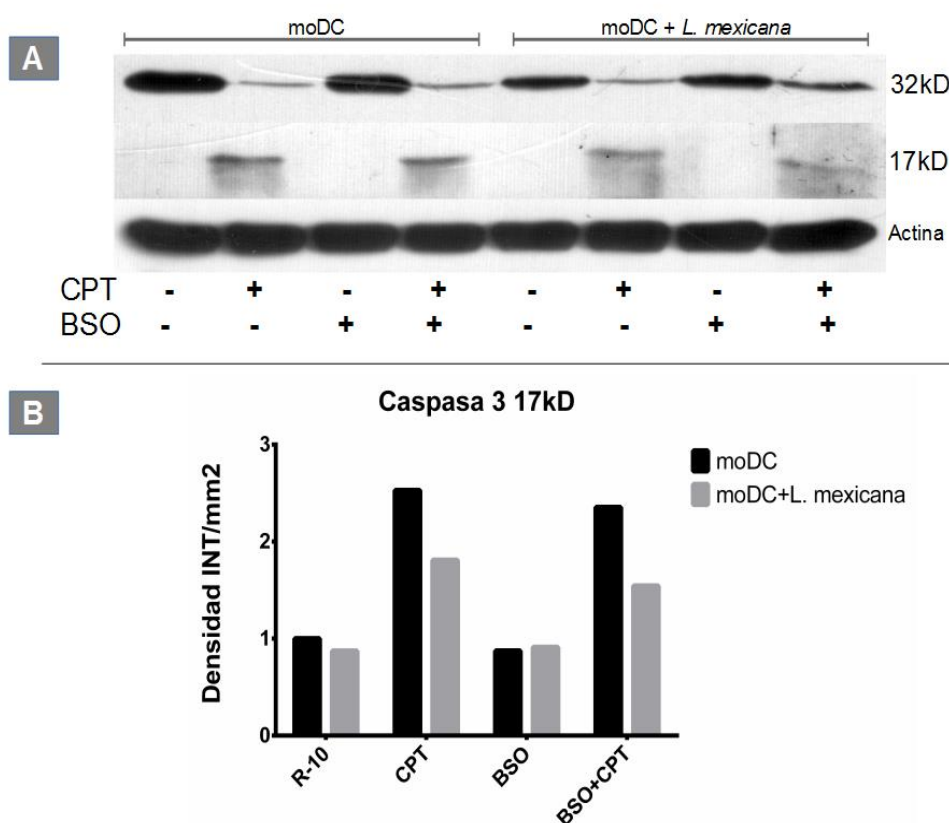


Figura 8. *Leishmania mexicana* inhibe la presencia proteínica de la caspasa 3 (17kD). Las moDC se trataron con el BSO (100 μ M), se infectaron con los promastigotes de *L. mexicana* y se estimularon con la CPT (10 μ M) durante 12 h. Posteriormente, las células se lisaron y los extractos (40 μ g/pozo) se resolvieron por SDS-PAGE al 12%. (A) La presencia proteínica de la procaspasa 3 (32kD) y de la caspasa 3 (17kD) junto con la actina (control de carga) se analizó con la técnica de Western Blot. (B) El análisis densitométrico de la caspasa 3 se realizó ajustando a 1 el valor del basal.

6.4 *Leishmania mexicana* inhibe la sobreproducción de las ROS en las moDC tratadas con el BSO y la CPT

Las moDC se resembraron en placas de 96 pozos, negras, estériles y tratadas para cultivo celular, se trataron con el BSO y posteriormente se infectaron. Antes de inducir la apoptosis con la CPT se agregó la mezcla de reacción para detectar las ROS y entonces se estimularon con la CPT. Después de 12h de estímulo, la placa se leyó en un espectrofluorómetro. La CPT induce la sobreproducción de las ROS junto con el BSO, sin embargo, cuando las moDC están infectadas con los promastigotes de *L. mexicana* y tratadas con el BSO y la CPT disminuye la producción de las ROS. Las diferencias significativas están representadas por asteriscos (** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$, $n = 5$) (Figura 10).

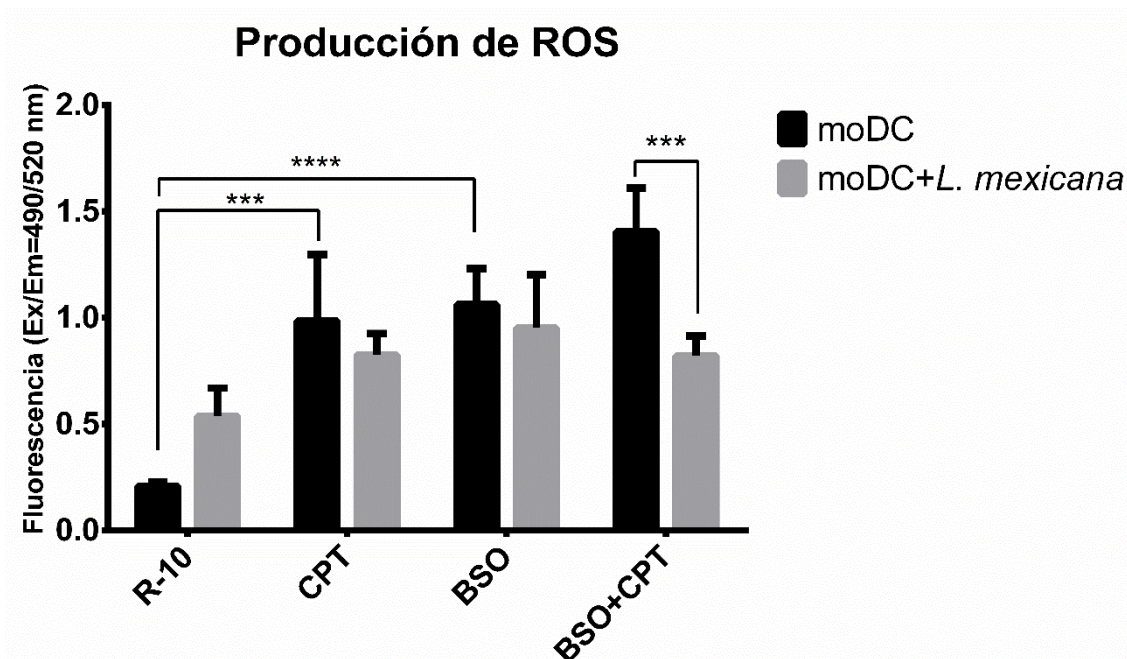


Figura 9. La CPT induce la sobreproducción de las ROS en las moDC, mientras que *L. mexicana* inhibe la sobreproducción de las ROS en las moDC tratadas con el BSO y la CPT. Las moDC se trataron con el BSO (100 μ M), se infectaron con los promastigotes de *L. mexicana* y se estimularon con la CPT (10 μ M) durante 12h. Posteriormente la placa se leyó en un espectrofluorómetro a una longitud de onda de excitación de 490nm y de emisión de 520nm con un "cutoff" de 515nm y leyendo el fondo de la placa. Los asteriscos representan las diferencias significativas (** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$, $n = 5$).

6.5 La CPT disminuye la concentración de GSH, aún en las moDC infectadas

El GSH juega un papel muy importante en la detoxificación de la célula pues se encarga de neutralizar a las especies reactivas del oxígeno (ROS). Se sabe que al inducir la apoptosis la concentración de GSH intracelular decrece y que al disminuir o eliminar la síntesis del GSH se logra inducir la apoptosis, por el contrario, cuando se sobreexpresa el GSH se protege a la célula contra un estímulo apoptótico. Por tal motivo, decidimos analizar si *L. mexicana* modula positivamente la síntesis del GSH y de esta manera confiere resistencia a las moDC contra la apoptosis inducida con la CPT. Al analizar los datos normalizados de la cuantificación del GSH observamos que tanto la CPT como el BSO inducen el decremento del GSH, de manera conjunta o separada. Mientras que la infección con los promastigotes de *L. mexicana* no parece prevenir este fenómeno. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre las diferentes condiciones (** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$, $n=5$) comparadas con las moDC que estuvieron únicamente en presencia del medio R-10 (Figura 9).

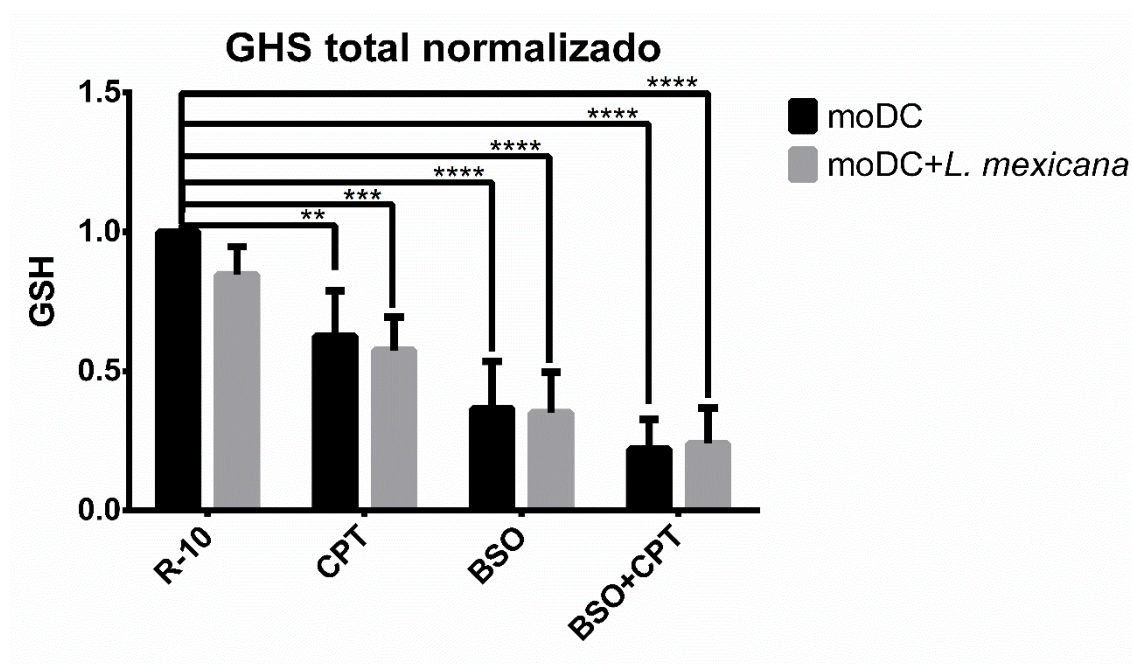


Figura 10. La concentración intracelular del GSH disminuye significativamente al inducir la apoptosis con la CPT en las moDC infectadas. Las moDC se trataron con el BSO (100 μ M), se infectaron con los promastigotes de *L. mexicana* y se estimularon con la CPT (10 μ M) durante 12h. Posteriormente las células se lisaron y a los extractos se les determinó la concentración de GSH. Los valores obtenidos se normalizaron para el análisis estadístico. Los asteriscos muestran las diferencias significativas con respecto al basal (** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$, $n=5$).

6.6 Las moDC se infectan con los promastigotes de *L. mexicana* y estos siguen viables, aún en presencia del BSO y de la CPT

Para determinar si los promastigotes de *L. mexicana* seguían viables después de haber sido fagocitados por las moDC y expuestos a la CPT y el BSO, decidimos corroborar que las moDC estuvieran infectadas y que el promastigote se diferenciara a amastigote a través de una tinción con Giemsa. Posteriormente, determinamos si los amastigotes liberados de las vacuolas parasitóforas de las moDC seguían viables colocándolos en medio de cultivo 199 con el 10% de suero fetal bovino a 26° C durante 48 horas. Finalmente se contaron los promastigotes que lograron crecer en el medio 199 y se graficaron los resultados. A pesar de la presencia del BSO y de la CPT, las moDC logran fagocitar a los promastigotes de *L. mexicana*. Los amastigotes liberados de las moDC también se logran transformar en promastigotes, aunque en presencia de la CPT la cantidad de parásitos por mililitro disminuye significativamente (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, $n = 3$) (Figura 11).

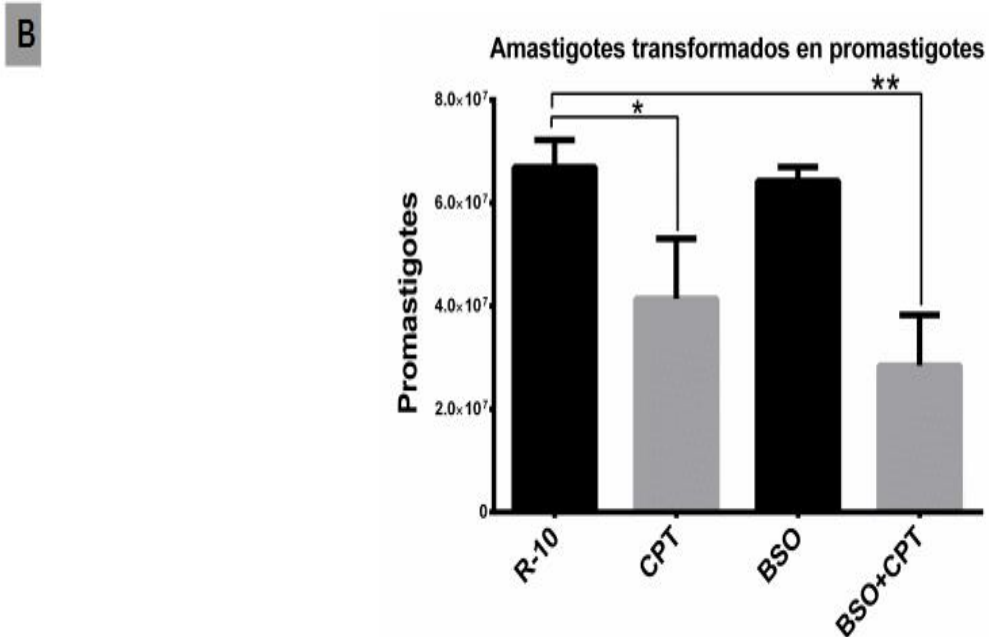
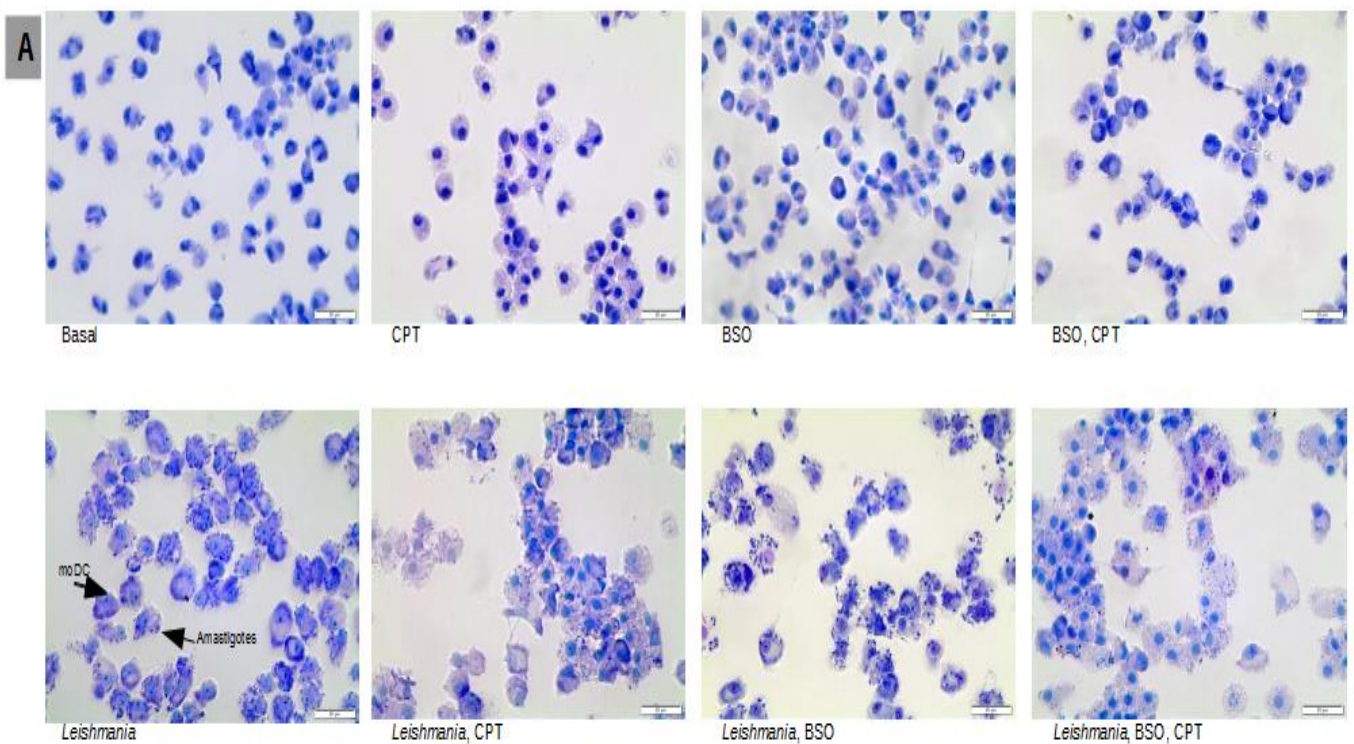


Figura 11. *Leishmania mexicana* logra sobrevivir después de haber sido fagocitado por las moDC y haber sido expuesto al BSO y/o la CPT. Las moDC se trataron con el BSO (100 μ M), se infectaron con los promastigotes de *L. mexicana* y se estimularon con la CPT (10 μ M) durante 12h. Posteriormente, se liberaron los amastigotes con SDS (0.01%) y se induce la transformación a promastigotes en medio 199. (A) Micrografías de las moDC no infectadas con *L. mexicana* y no infectadas, tratadas con BSO y/o CPT. (B) Numero de promastigotes por mililitro de medio después de 48 horas de cultivo en medio 199. Los asteriscos representan las diferencias significativas contra las moDC infectadas que únicamente estuvieron en contacto con el medio R-10 (* p <0.05, ** p <0.001, n =3).

6.7 *Leishmania mexicana* induce la sobreexpresión de Bcl-xL en las moDC

Bcl-xL es una proteína antiapoptótica que se encarga de bloquear la acción de proteínas proapoptóticas como Bax y Bak, por lo que decidimos analizar si *L. mexicana* induce la sobreexpresión de Bcl-xL utilizando la técnica de Western Blot. Las moDC tratadas con el BSO, infectadas con los promastigotes y estimuladas con la CPT durante 12h se lisaron y los extractos se resolvieron por SDS-PAGE al 12%. La presencia proteínica de Bcl-xL y de la actina se analizó con la ayuda de anticuerpos específicos. *L. mexicana* induce la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xL en las moDC tratadas con la CPT y/o con el BSO. Las diferencias significativas están señaladas con asteriscos (** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$, $n = 4$) (Figura 12).

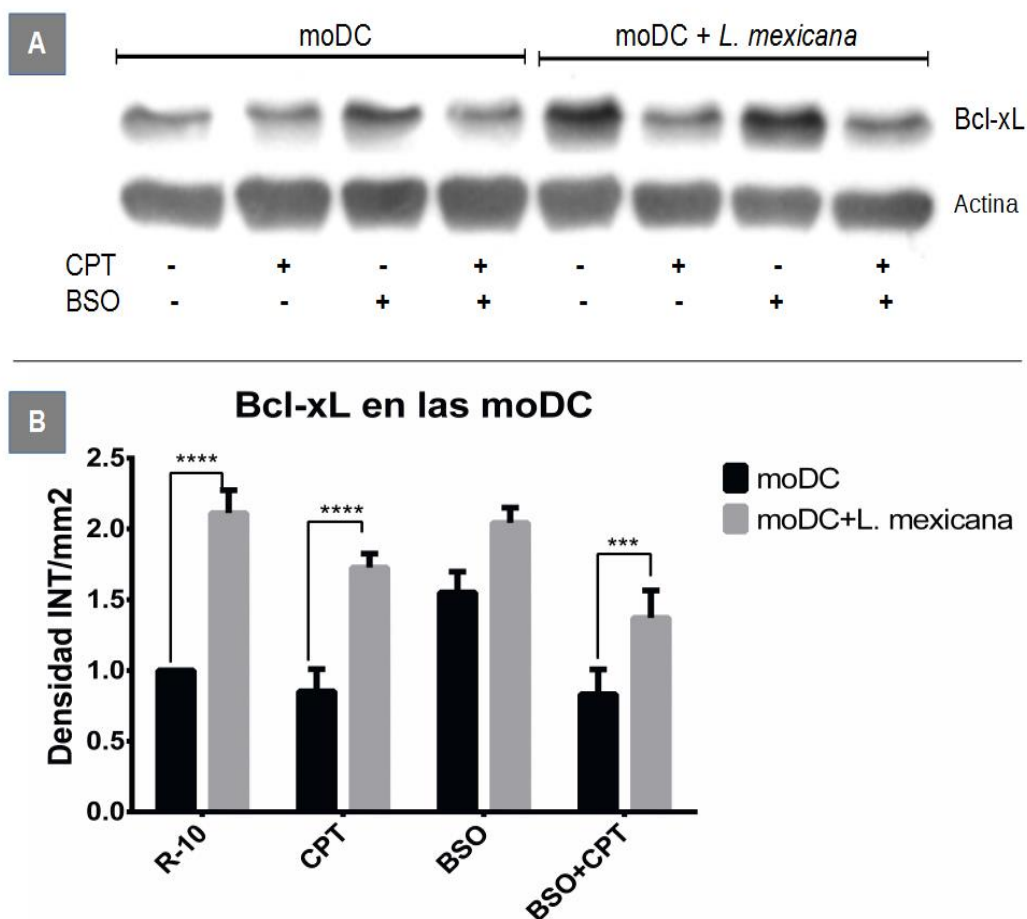


Figura 12. *Leishmania mexicana* induce la sobreexpresión de Bcl-xL. Las moDC se trataron con el BSO (100 μ M), se infectaron con los promastigotes de *L. mexicana* y se estimularon con la CPT (10 μ M) durante 12 h. Posteriormente, las células se lisaron y los extractos (40 μ g/pozo) se resolvieron por SDS-PAGE al 12%. (A) La presencia proteínica de Bcl-xL y de la actina (control de carga) se analizó con la técnica de Western Blot. (B) Análisis densitométrico de Bcl-xL. Los asteriscos representan las diferencias significativas (** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$, $n = 4$).

7 Discusión

Leishmania mexicana es un parásito intracelular obligado que infecta principalmente a macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, aunque también se ha observado en otros tipos celulares tales como los fibroblastos. Tanto en los macrófagos como en las células dendríticas logra sobrevivir y reproducirse al interior del fagosoma. A lo largo de la historia evolutiva del parásito, se han desarrollado diversas estrategias para lograr tal portento. Entre ellas figura la inhibición de la unión del fagosoma con el lisosoma, pero sin duda alguna, una de las más interesantes e inquietantes es la capacidad del parásito para modular un proceso tan importante, como lo es, la apoptosis.

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada altamente regulada, que incluye dos fases, la primera es la de iniciación, en la que se da la activación de genes y de vías de señalización necesarios para llevar a término la apoptosis de la célula. La otra fase es la ejecutora, en la que se ha activado la maquinaria celular (principalmente las caspasas ejecutoras, 3, 6 y 7) necesaria para llevar a cabo el desmantelamiento de la célula y es entonces que se logran observar los cambios fenotípicos clásicos de la apoptosis tales como, la condensación de la cromatina, la exposición de la fosfatidilserina, el encogimiento del citoplasma, la fragmentación del DNA nuclear y finalmente la formación de los cuerpos apoptóticos.

Durante la fase iniciador de la apoptosis se incrementa la producción de las ROS y una vez que los mecanismos antioxidantes de la célula son incapaces de mantener en homeostasis los niveles de las ROS, estas comienzan a dañar proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, membranas y organelos, creando un círculo de retroalimentación positiva a favor de la apoptosis. Cuando se da este fenómeno, las ROS también son capaces de activar vías de señalización para inducir la apoptosis como es el caso de ASK1, el que a su vez puede activar a JNK y p38, y estas cinasas finalmente pueden inhibir proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2, o activar proteínas proapoptóticas tales como Bax (Redza-Dutordoir & Averill-Bates 2016; Galadari et al. 2017).

En trabajos anteriores reportamos que tanto los promastigotes como los amastigotes de *L. mexicana* reducen la fosforilación de JNK y p38 inducida por la CPT en las moDC (Vázquez-López et al. 2015; Rodríguez-González et al. 2016). Por este motivo, en el presente trabajo decidimos averiguar si ante la inducción de la apoptosis con la CPT en las moDC se incrementaban las ROS. Logramos documentar que al inducir la apoptosis con la CPT se incrementa de manera significativa la cantidad de especies reactivas del oxígeno y que lo mismo sucede si usamos el inhibidor de la síntesis del GSH (BSO), lo que confirma que en las moDC el GSH juega un papel central en la homeostasis del

estado redox. De manera interesante, también observamos que únicamente en las moDC infectadas y tratadas con el BSO y la CPT se redujo significativamente la cantidad de ROS con respecto a las moDC únicamente tratadas con el BSO y la CPT, lo que sugiere que el parásito podría estar modulando la producción de las ROS cuando estas sobrepasan un umbral crítico, a través de una vía distinta a la del GSH.

El GSH es el tiol no proteínico más abundante en las células de los mamíferos y es el principal agente antioxidante de las células encargado de mantener en equilibrio el estado redox. En otros modelos celulares ha sido demostrado que el GSH participa ampliamente en la regulación de la apoptosis a través de la regulación de las ROS. Al crear ratones KO para el gen de la subunidad catalítica de la γ -GSC observaron que los embriones de estos ratones morían antes del día 13 de gestación (Dalton et al. 2000). Al inducir la sobreexpresión del factor de transcripción Nrf2 en células neuronales observaron que aumenta la síntesis y secreción del GSH, lo que protege a las células ante el estrés oxidativo y la apoptosis (Shih et al. 2003). En otro estudio demostraron que al privar de cisteína a las células epiteliales pigmentadas humanas de la retina (hRPE), se incrementaba significativamente la producción de las ROS, lo resultaba en la pérdida del potencial de membrana y finalmente en la muerte de la célula (Armstrong et al. 2004). También, se ha demostrado en la línea de células embrionarias de riñón (HEK293) que al sobre expresar la subunidad catalítica de la γ -GSC disminuye la apoptosis inducida por la exposición a radiación UV a través de la modulación de JNK1 (Fan et al. 2005). En la línea de células neuronales SH-SY5Y observaron que la apoptosis inducida con la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es inhibida al coincubar con el ácido carnosico, junto con la condensación nuclear, la producción de las ROS, la activación de la caspasa 3 y la escisión de PARP. También observaron que al inducir la apoptosis con la 6-OHDA se incrementaba la fosforilación de JNK y p38, mientras que al coincubar con el ácido carnosico la fosforilación de estas cinasas disminuía. Cuando incubaron las células con el ácido carnosico observaron que se incrementaban los niveles del GSH junto con las dos subunidades de la γ -GSC. Mientras que al silenciar el gen del factor de transcripción Nrf2, el efecto protector del ácido carnosico disminuía y nuevamente, se incrementaba la fosforilación de JNK y p38 (Chen et al. 2012). Cuando nosotros analizamos la concentración de GSH en las moDC encontramos que al inducir la apoptosis con la CPT o al incubar con el BSO baja la concentración del GSH, mientras que al coincubar con la CPT y el BSO el decremento es significativo. Sin embargo, al comparar con las moDC infectadas no se observaron diferencias. Lo que sugiere que los promastigotes de *L. mexicana*, a pesar de que modulan la producción de las ROS, no lo hacen a través del GSH.

Con el fin de corroborar que los promastigotes no modulan la producción del GSH nos dispusimos a comprobar que las moDC estuvieran infectadas y que los parásitos siguieran viables, aún después de la exposición a la CPT y al BSO. Las micrografías demuestran que las moDC se logran infectar con los parásitos y que esto se transforman en amastigotes dentro del fagosoma, formando una vacuola parasitófora. Al liberar a los parásitos de las moDC y cultivarlos de manera axénica en medio 199, observamos que estos se logran diferenciar en promastigotes y que el número de parásitos aumenta en relación al tiempo de cultivo. Por lo que podemos descartar la posibilidad de que el los promastigotes de *L. mexicana* mueran y por este motivo no se observe efecto alguno sobre la producción del GSH. Otro grupo de investigación demostró que al infectar macrófagos de ratón con promastigotes de *L. donovani* se incrementaba la producción de las proteínas SOCS 1 y 3 y de manera interesante, también de la tiorredoxina la cual es fundamental para el complejo TRX que a su vez se encarga de inactivar a las ROS, principalmente al peróxido de hidrogeno. Aunque ellos no observaron cambios en la producción de las ROS (Srivastav et al. 2014). En virtud de lo anterior, resultaría importante, para el entendimiento de la interacción hospedero-parásito a nivel molecular, el estudio de la producción de la tiorredoxina en las moDC infectadas con el parásito *L. mexicana*.

En el año 2009, un grupo demostró por primera vez que al infectar macrófagos de la línea celular RAW 264.7 con promastigotes de diferentes cepas de las especies *L. major* y *L. donovani* inducen la sobreexpresión de Bcl-xL y que el nivel de regulación dependía de la cepa (Donovan et al. 2009). Posteriormente, también se demostró que al infectar neutrófilos humanos con promastigotes de *L. major* se incrementaba la expresión de Bcl-2 y de Bfl-1, lo que estaba asociado a la activación de ERK 1 y 2 (Sarkar et al. 2013). Otro grupo demostró que al inducir la apoptosis con actinomicina-D en macrófagos murinos infectados con promastigotes de *L. donovani* se incrementa la expresión de Mcl-1 (proteína antiapoptótica de la familia de Bcl-2) tanto a nivel de mRNA como de proteína, lo que está asociado al factor de transcripción CREB, ya que al silenciar a CREB se revierte el efecto protector del parásito y disminuye la expresión de Mcl-1 (Giri et al. 2016). Al infectar monocitos humanos de la línea THP-1 o macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica con promastigotes de *L. donovani*, observaron que se incrementa la expresión de Bcl-2. De manera interesante, demostraron que al inhibir la síntesis de Bcl-2 con el uso de siRNA, o al utilizar inhibidores específicos, aumenta la producción de NO por lo que disminuye la sobrevivencia de los parásitos y la carga parasitaria. También observaron que en pacientes con LV se sobreexpresa Bcl-2 y que la cantidad de NO es apenas detectable (Pandey et al. 2016).

Por este motivo, decidimos analizar si en las moDC infectadas con promastigotes de *L. mexicana* induce la sobreexpresión de Bcl-xL. Nuestros resultados demuestran que la infección de las moDC con los promastigotes de *L. mexicana* induce la sobreexpresión de Bcl-xL, lo que sugiere que la regulación de la apoptosis por parte de *Leishmania mexicana* depende de la modulación de las proteínas antiapoptóticas más que de la regulación del estado redox.

Recientemente se ha implicado la vía de señalización de AKT en la inhibición de la apoptosis de la célula hospedera ejercida por *Leishmania*. En macrófagos murinos infectados con promastigotes de *L. donovani* demostraron que AKT es activado, lo que permite que GSK-3 β sea inactivado por lo que se incrementa la cantidad del factor de transcripción β -catenina, el cual su vez puede iniciar la síntesis de proteínas antiapoptóticas. También demostraron que la activación de AKT promueve la inactivación del factor de transcripción FOXO-1 lo que resulta en la disminución de la síntesis de proteínas proapoptóticas. Además, observaron que al transfectar con un constructo doble negativo para AKT (*AKT^{-/-}*) a los macrófagos infectados con los promastigotes de *L. donovani*, disminuye la producción de citocinas antiinflamatorias, se incrementa la apoptosis de los macrófagos y finalmente se reduce la sobrevivencia del parásito, lo mismo se observó al transfectar con un constructo constitutivamente activo de GSK-3 β . Mientras que al silenciar a la β -catenina, se incrementó la disrupción del potencial de membrana de la mitocondria junto con la actividad de la caspasa 3 y la producción de IL-12 y finalmente disminuye la sobrevivencia del parásito. Finalmente y de manera interesante, observaron que al administrar un inhibidor específico de AKT en ratones infectados con *L. donovani* disminuye significativamente la carga parasitaria del bazo y el perfil de citocinas cambia en favor del hospedero (Gupta et al. 2016).

Nuestros resultados junto con los resultados de otros grupos demuestran que la regulación de la apoptosis está más relacionada con el desarrollo de la enfermedad de lo que se había pensado, pues ya que al eliminar las proteínas que el parásito modula para inhibir la apoptosis de la célula hospedera se disminuye la sobrevivencia del parásito, lo que también demuestra que la inhibición de la apoptosis es vital para que el parásito se establezca exitosamente en el hospedero. Sin embargo, y a pesar de los avances logrados, seguimos describiendo como es que el parásito inhibe la apoptosis, pero aún no sabemos qué hace el parásito para modular las vías de señalización y la síntesis de proteínas de la célula hospedera. Por lo que resulta de suma importancia seguir estudiando la modulación de la apoptosis, sobre todo en las células dendríticas, ya que estas son las encargadas de iniciar y dirigir la respuesta inmune en contra del parásito. Sería interesante saber si la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas interfiere

con la maduración de las células dendríticas, con el procesamiento antigénico del parásito o con la presentación y activación de los linfocitos T específicos. Si al silenciar la síntesis de Bcl-2 o de AKT, que favorecen la inhibición de la apoptosis por parte del parásito, se disminuye la carga parasitaria y se favorece la respuesta inmune Th1 ¿Qué pasaría si eliminamos la o las moléculas del parásito que inducen la inhibición de la apoptosis de las células dendríticas?

8 Conclusión

En el presente trabajo logramos demostrar que al inducir la apoptosis en las moDC con la CPT se incrementa la producción de las ROS y disminuye la concentración del GSH y que la infección de las moDC con promastigotes de *L. mexicana* no revierte el decremento del GSH. Mientras que la infección con promastigotes de *L. mexicana* induce la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xL en las moDC.

9 Literatura citada

http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/Manual_Leishmaniasis2015.pdf

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>

<https://themedicalbiochemistrypage.org/images/glutathione.jpg>

Ameen, M., 2010. Cutaneous leishmaniasis: Advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clinical and Experimental Dermatology*, 35(7), pp.699–705.

Argueta-Donohue, J. et al., 2008. Leishmania mexicana: participation of NF-kappaB in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Experimental parasitology*, 120(1), pp.1–9.

Armstrong, J.S. et al., 2004. Cysteine starvation activates the redox-dependent mitochondrial permeability transition in retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(11), p.4183. Available at: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.04-0570>.

Bashyam, H., 2007. Ralph Steinman: dendritic cells bring home the Lasker. *The Journal of experimental medicine*, 204(10), pp.2245–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2118467&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Bates, P.A. et al., 1992. Axenic cultivation and characterization of Leishmania mexicana amastigote-like forms. *Parasitology*, 105 (Pt 2, pp.193–202.

Bates, P.A., 2007. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), pp.1097–1106. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751907001269>.

Bates, P.A. & Tetley, L., 1993. Leishmania mexicana: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. *Experimental parasitology*, 76(4), pp.412–423.

Chen, J.H. et al., 2012. Carnosic acid prevents 6-hydroxydopamine-induced cell death in SH-SY5Y cells via mediation of glutathione synthesis. *Chemical Research in Toxicology*, 25(9), pp.1893–1901.

Chow, K. V et al., 2016. Heterogeneity, functional specialization and differentiation of monocyte derived dendritic cells. *Immunology and Cell Biology*, (October), pp.1–8.

Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/icb.2016.104>.

- Contreras, I. et al., 2014. Impact of *Leishmania mexicana* infection on dendritic cell signaling and functions B. L. Kelly, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(9), p.e3202. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003202>.
- Corliss, J.O., 1994. An interim utilitarian (Users-friendly) hierarchical-classification and characterization of the Protists. *Acta Protozoologica*, 33(1), pp.1–51.
- Dai, H., Meng, X.W. & Kaufmann, S.H., 2016. Mitochondrial apoptosis and BH3 mimetics.5(0), p.2804. Available at: <https://f1000research.com/articles/5-2804/v1>.
- Dalton, T.P. et al., 2000. Knockout of the mouse Glutamate Cysteine Ligase catalytic subunit (Gclc) gene: embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), pp.324–329. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X00939305>.
- Donovan, M.J. et al., 2009. *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Experimental Parasitology*, 123(1), pp.58–64. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.05.012>.
- Durand, M. & Segura, E., 2015. The known unknowns of the human dendritic cell network. *Frontiers in Immunology*, 6(MAR), pp.2–8.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), pp.495–516. Available at: <http://tpx.sagepub.com/content/35/4/495.full>.
- Fan, Y. et al., 2005. Human glutamylcysteine synthetase protects HEK293 cells against UV-induced cell death through inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase. *Cell Biology International*, 29(8), pp.695–702.
- Franco, R. & Cidlowski, J. a, 2009. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death and Differentiation*, 16(10), pp.1303–1314. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.107>.
- Galadari, S. et al., 2017. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine*, 104(2), pp.144–164. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004%0Awww.elsevier.com>.
- Galluzzi, L. et al., 2014. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, 22(2014), pp.1–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25236395>.

- Galluzzi, L. et al., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*, 19(1), pp.107–20. Available at: <http://www.nature.com/cdd/journal/v16/n1/pdf/cdd2008150a.pdf>.
- Giri, J. et al., 2016. Leishmania donovani exploits Myeloid Cell Leukemia 1 (MCL-1) protein to prevent mitochondria-dependent host cell apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 291(7), pp.3496–3507. Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M115.672873>.
- Gupta, P. et al., 2016. Leishmania donovani inhibits macrophage apoptosis and pro-inflammatory response through AKT-mediated regulation of β -catenin and FOXO-1. *Cell Death and Differentiation*, 23(11), pp.1815–1826. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cdd.2016.101>.
- Gutierrez-Kobeh, L. et al., 2013. Inhibition of dendritic cell apoptosis by Leishmania mexicana amastigotes. *Parasitology research*, 112(4), pp.1755–1762.
- Hart, D.T., Vickerman, K. & Coombs, G.H., 1981. A quick, simple method for purifying Leishmania mexicana amastigotes in large numbers. *Parasitology*, 82(Pt 3), pp.345–355.
- Iborra, S. et al., 2016. Leishmania uses mincle to target an inhibitory ITAM signaling pathway in dendritic cells that dampens adaptive immunity to infection. *Immunity*, 45(4), pp.788–801.
- Jeong, C.-H. & Joo, S.H., 2016. Downregulation of Reactive Oxygen Species in Apoptosis. *Journal of Cancer Prevention*, 21(1), pp.13–20. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4819661&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kaye, P. & Scott, P., 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews. Microbiology*, 9(8), pp.604–615. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>.
- Kollek, M. et al., 2016. Bcl-2 proteins in development, health, and disease of the hematopoietic system. *FEBS Journal*, 283, pp.2779–2810.
- Mosser, D.M. & Edelson, P.J., 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of Leishmania promastigotes. *The Journal of Immunology*, 135(4), p.2785 LP-2789. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/135/4/2785.abstract>.

- Pandey, R.K. et al., 2016. Leishmania donovani-Induced Increase in macrophage Bcl-2 favors parasite survival. *Frontiers in Immunology*, 7(OCT). Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00456/full>.
- Petritus, P.M. et al., 2012. Leishmania mexicana induces limited recruitment and activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells early during infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(10), p.e1858.
- Redza-Dutordoir, M. & Averill-Bates, D.A., 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), pp.2977–2992. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>.
- Rodríguez-González, J. et al., 2016. Leishmania mexicana promastigotes down regulate JNK and p-38 MAPK activation: Role in the inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Experimental Parasitology*, 163, pp.57–67.
- Rogers, M. et al., 2009. Proteophosphoglycans regurgitated by Leishmania-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival J. M. C. Ribeiro, ed. *PLoS Pathogens*, 5(8), p.e1000555. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19696894>.
- Ruhland, A., Leal, N. & Kima, P.E., 2007. Leishmania promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cellular Microbiology*, 9(1), pp.84–96.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine*, 179(4), pp.1109–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8145033>.
- Sarkar, A. et al., 2013. Infection of neutrophil granulocytes with Leishmania major activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. *Medical Microbiology and Immunology*, 202(1), pp.25–35. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00430-012-0246-1>.
- Scott, P. & Novais, F.O., 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Publishing Group*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.72>.

- Segura, E., 2016. Review of mouse and human dendritic cell subsets. In *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. pp. 3–15. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X02006126>.
- Shih, A.Y. et al., 2003. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), pp.3394–3406.
- Srivastav, S. et al., 2014. Leishmania donovani prevents oxidative burst-mediated apoptosis of host macrophages through selective induction of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 289(2), pp.1092–1105. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M113.496323>.
- von Stebut, E., 2016. Parasites dampen dendritic cell activation to ensure their survival. *Trends in Parasitology*, xx, pp.1–2. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492216302239>.
- Steinman, R.M., 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annual Review of Immunology*, 30(1), pp.1–22.
- Valdes-Reyes, L. et al., 2009. Leishmania mexicana: inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Experimental parasitology*, 121(3), pp.199–207.
- Vázquez-López, R. et al., 2015. Leishmania mexicana amastigotes inhibit p38 and JNK and activate PI3K/AKT: role in the inhibition of apoptosis of dendritic cells. *Parasite immunology*, 37(11), pp.579–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26352010>.
- Wilkins-Rodriguez, A.A. et al., 2010. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by Leishmania mexicana amastigotes in murine dendritic cells. *Experimental parasitology*, 126(3), pp.426–434.