



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ANALISIS DE LAS MOLECULAS QUE PARTICIPAN EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES DEL RECEPTOR TLR2 ACTIVADO POR LIPOFOSFOGLICANO DE Leishmania major EN CELULAS NK”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

EDITH ARACELI FERNANDEZ FIGUEROA



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA MAGDALENA AGUIRRE GARCIA

2005



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

m. 343545



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: **“ANÁLISIS DE LAS MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DEL RECEPTOR TLR2 ACTIVADO POR LIPOFOSFOGLICANO DE *Leishmania major* EN CÉLULAS NK”**

Realizado por **Edith Araceli Fernández Figueroa**

Con número de cuenta **09535196-0** , quien cubrió los créditos de la carrera de **Biología**.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

| | |
|----------------------------------|---|
| Director de Tesis Propietario | Dra. María Magdalena Aguirre García |
| Propietario | Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser |
| Propietario | Dra. María del Carmen Maldonado Bernal |
| Suplente | Dr. Emilio Rojas del Castillo |
| Suplente | Dr. Emilio Joaquín Córdoba Alarcón |

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunoparasitología, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General de México, bajo la dirección de la Dra. María Magdalena Aguirre García.

Apoyado por los proyectos: DGAPA IN 231602, DGAPA IN 210602 y CONACyT 37538M. Presentado en modalidad de cartel en el XVI Congreso Nacional de Parasitología, CONAPAR 2004 y en el XXV Congreso Nacional de Bioquímica, 2004 y en modalidad de exposición oral en el 1er Congreso Académico "Dr. Roberto Kretschmer Schmid", 2005.

La revisión del trabajo fue hecha por la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser, la Dra. María del Carmen Maldonado Bernal, el Dr. Emilio Rojas del Castillo y el Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón quienes fungieron como sinodales. Y la Dra. Norma Lilia Salaiza Suazo y la M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán como revisores externos.

A los que externo mi agradecimiento por tomarse el tiempo para dirigir, asesorar y revisar este trabajo, así como por compartir conmigo sus conocimientos y opiniones. Y sobretodo por su apoyo y amistad.

A Luz, mi hermana:
Por tu compañía, apoyo y
por ser como eres.

A Alex:
Gracias por estar conmigo y por ayudarme a
ver finalizado este trabajo tan importante. Te quiero.

A Rodolfo, Zochilt y Bryan:
Gracias por sus palabras y compañía.

A mi mamá:
Espero poder compartir mis triunfos contigo algún un día.

Agradezco a la Dra Magdalena Aguirre, su asesoría y apoyo personal para la realización y culminación de este trabajo. A la Dra. Ingeborg Becker por permitirme hacer mi tesis en su laboratorio y sobretodo a ambas les agradezco sus palabras de aliento cuando las necesitaba y por creer en mi y en mis capacidades.

A los proyectos: DGAPA IN 231602, DGAPA IN 210602 y CONACyT 37538M por el apoyo económico.

A Norma, Cristina, Alma y Miriam por su disposición para apoyarme en el laboratorio y aún mas agradezco compartir una amistad conmigo.

A Omar por su apoyo en la digitalización de las imágenes para este trabajo.

A mis amigos les doy las gracias por estar siempre junto a mi:

Brenda, Carmen, Pilar y Joram, mi C.F.I. Lilitiana, Adriana, Lorena, Alma son unas personas maravillosas llenas de virtudes extraordinarias los quiero mucho.

A la liga extraordinaria de mi facultad: Alberto, Luz, Arlette, Rocío, Jose Luis y los que me falten... gracias por su amistad y momentos de diversión junto a mi.

ÍNDICE

| | Páginas |
|--|----------------|
| ÍNDICE----- | I |
| Lista de figuras----- | III |
| Abreviaturas----- | V |
| Resumen----- | VIII |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN----- | 1 |
| | |
| 1.1 Leishmaniasis----- | 1 |
| 1.2 Agente etiológico de la enfermedad----- | 1 |
| 1.3 Clasificación de la leishmaniasis----- | 3 |
| 1.4 Superficie celular del parásito----- | 7 |
| 1.5 Aspectos inmunológicos de la leishmaniasis----- | 9 |
| 1.6 Respuesta Inmune----- | 10 |
| 1.7 Células NK (Asesinas Naturales) ----- | 12 |
| 1.8 Receptores tipo Toll (TLR, Toll-like receptor) ----- | 14 |
| | |
| II. JUSTIFICACIÓN----- | 25 |
| | |
| III. HIPÓTESIS----- | 26 |
| | |
| IV. OBJETIVOS----- | 26 |
| | |
| 4.1 Objetivo general----- | 26 |
| 4.2 Objetivos específicos----- | 26 |

| | |
|---|----|
| V. METODOLOGÍA | 27 |
| 5.1 Crecimiento del parásito | 27 |
| 5.2 Purificación del LPG | 27 |
| 5.3 Purificación de células NK | 28 |
| 5.4 Ensayo de interacción | 28 |
| 5.5 Lisis celular | 29 |
| 5.6 Purificación nuclear | 29 |
| 5.7 Cuantificación de proteína por el método DC (compatible con detergente) | 30 |
| 5.8 Ensayos de Western-blot (Wb) y revelado por quimioluminiscencia | 31 |
| 5.9 Ensayos de Inmunoprecipitación | 32 |
| VI. RESULTADOS | 34 |
| 6.1 Análisis de la presencia de moléculas que participan en la transducción de señales a través del receptor TLR2 | 35 |
| 6.2 Análisis del acoplamiento de las moléculas que participan en la señalización a través del receptor TLR2 | 47 |
| VII. DISCUSIÓN | 54 |
| VIII. CONCLUSIONES | 60 |
| IX. PERSPECTIVAS | 60 |
| X. BIBLIOGRAFÍA | 61 |
| APÉNDICE | 66 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura A | Promastigote metacíclico en medio de cultivo | 5 |
| Figura B | Amastigotes de <i>Leishmania</i> dentro del macrófago | 5 |
| Figura C | <i>Lutzomyia</i> sp | 5 |
| Figura D | Ulceración característica de leishmaniasis cutánea localizada | 5 |
| Figura E | Lesiones en un paciente con leishmaniasis cutánea difusa | 6 |
| Figura F | Paciente con leishmaniasis mucocutánea que presenta lesiones orofaríngeas | 6 |
| Figura G | Leishmaniasis visceral en un niño | 6 |
| Figura H | Estructura esquematizada del LPG de promastigotes de <i>Leishmania</i> | 8 |
| Figura I | Algunos ligandos reconocidos por TLRs | 16 |
| Figura J | Estructura del receptor tipo toll (TLR) | 17 |
| Figura K | Señalización vía TLR2 dependiente de MyD88 | 24 |
| Figura L | Purificación, lisis y determinación de proteína de células NK | 30 |
| Figura M | Western-blot e Inmunoprecipitación de extractos celulares | 33 |
| Figura 1 | Análisis del TLR2 en células NK | 35 |
| Figura 2 | Análisis de la proteína MyD88 en células NK | 36 |
| Figura 3 | Análisis de la proteína IRAK-1 en células NK | 37 |
| Figura 4 | Análisis de la proteína TRAF-6 en células NK | 38 |
| Figura 5 | Análisis de la proteína IKK- α en células NK | 39 |
| Figura 6 | Análisis de la proteína IKK- β en células NK | 40 |
| Figura 7 | Análisis de la proteína IKK- γ en células NK | 41 |
| Figura 8 | Análisis de la proteína I κ B- α en células NK | 42 |
| Figura 9 | Análisis de la proteína I κ B- β en células NK | 43 |
| Figura 10 | Análisis de la proteína I κ B- ϵ en células NK | 44 |
| Figura 11 | Análisis de la translocación nuclear de la proteína NF- κ B p50 | 45 |
| Figura 12 | Análisis de la translocación nuclear de la proteína NF- κ B p65 | 46 |
| Figura 13 | Acoplamiento de la proteína MyD88 con el TLR2 en células NK | 47 |
| Figura 14 | Acoplamiento de la proteína MyD88 a la proteína IRAK-1 en células NK | 48 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 15 | Acoplamiento de la proteína MyD88 a la proteína TRAF-6 en células NK | 49 |
| Figura 16 | Acoplamiento de la proteína IRAK-1 a la proteína TRAF-6 en células NK | 50 |
| Figura 17 | Acoplamiento de la proteína TRAF-6 a la proteína IKK- γ en células NK | 51 |
| Figura 18 | Co-inmunoprecipitación del TLR2 y la proteína IKK- α en células NK | 52 |
| Figura 19 | Co-inmunoprecipitación del TLR2 y la proteína I κ B- α en células NK | 53 |
| Figura 20 | Vía de señalización propuesta para la activación de células NK a través del TLR2 activadas con LPGm de <i>Leishmania major</i> | 59 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------|---|
| μg | Microgramo |
| μl | Microlitros |
| aa | Aminoácido (s) |
| Ab | Anticuerpo |
| ADN | Ácido desoxiribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| cels | células |
| DC | Compatible con detergentes |
| DD | Dominio de muerte |
| ECD | Ectodominios |
| EDTA | Ácido-etilén diaminotetra acético |
| ejem | Ejemplo |
| Fig | Figura |
| gp63 | Glicoproteína 63 |
| GPI | Glicosilfosfatidilinositol |
| IκB | Proteína inhibidora de κB |
| IKK | Cinasa de IκB |
| IL | Interleucina |
| IFN | Interferón |
| iNOS | Sintasa de óxido nítrico inducible |
| Ipp | Inmunoprecipitación |
| IRAK | Cinasa asociada al receptor de IL-1 |
| ITAMs | Motivos de activación ricos en tirosina de inmunoreceptores |
| ITIMs | Motivos de inhibición ricos en tirosina de inmunoreceptores |
| KD | Dominio central de cinasa |

| | |
|----------------|--|
| kDa | Kilo Daltones |
| LCD | Leishmaniasis cutánea diseminada |
| LCL | Leishmaniasis cutánea localizada |
| LMC | Leishmaniasis mucocutánea |
| LPG | Lipofosfoglicano |
| LPS | Lipopolisacárido |
| LRR | Regiones ricas en leucina |
| LV | Leishmaniasis visceral |
| MHC | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| mM | Milimolar |
| min | Minutos |
| ml | Mililitros |
| mo | Microorganismo (s) |
| MyD88 | Proteína de diferenciación mieloide 88 |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NaF | Fluoruro de sodio |
| NF- κ B | Factor nuclear κ B |
| NK | Natural Killer (Célula Asesina Natural) |
| nm | Nanómetros |
| nM | Nanomolar |
| NO | Óxido nítrico |
| NP-40 | Nonident-p40 |
| °C | Grados centígrados |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PAMPs | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| PPG | Proteofosfoglicanos |
| PKC | Proteína cinasa C |
| PM | Peso molecular |
| PMA | Acetato de forbol-miristato |

| | |
|------|--|
| PNA | Lectina de cacahuete |
| PVDF | Membrana de polivinilidenodifluoruro |
| PRR | Receptores de reconocimiento patrón |
| RII | Respuesta Inmune Innata |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RPMI | Medio RPMI 1640 |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SN | Sobrenadante |
| TBST | Amortiguador tris, borato, salino, tween |
| TIR | Dominio del receptor de la familia Toll/IL-1 |
| TLR | Receptor tipo Toll |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TRAF | Factor asociado al receptor de TNF |
| U | Ubiquitinación |
| Wb | Western-Blot |

RESUMEN

El sistema inmune innato es la primer línea de defensa contra la invasión de microorganismos patógenos y los receptores tipo toll (TLRs; Toll-like receptor) forman parte de este sistema reconociendo patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como peptidoglicanos y lipopéptidos de microorganismos. La activación de estos receptores representa un componente clave en la transducción de señales que finaliza en la translocación al núcleo de factores de transcripción como NF- κ B. Se han reportado dos vías de señalización que se dan a través de los TLRs que pueden ser dependiente o independiente de MyD88. El parásito intracelular *Leishmania* está cubierto en su superficie por un glicocalix denso de diversas moléculas entre las que se encuentra el lipofosfoglicano (LPG), el cual ha sido relacionado con la sobrevivencia de *Leishmania* dentro de su vector. Esta molécula también participa en la regulación de la adhesión e invasión celular, así como en la resistencia a la lisis por el complemento. Nuestro grupo reportó recientemente que el LPG de *L. major* metacíclico que es la fase infectiva (LPGm) activa células NK a través del TLR2, induciendo la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue conocer si el LPGm induce a través del TLR2 una cascada de señalización semejante a la ya reportada para otros PAMPs. Por lo tanto, en este trabajo se analizó por Western-blot en extractos totales de células NK no estimuladas y células NK estimuladas con LPGm la presencia de moléculas como: TLR2, MyD88, IRAK-1, TRAF-6, IKK- α , IKK- β , IKK- γ , I κ B- α , I κ B- β e I κ B- ϵ . Una vez confirmada la presencia de estas moléculas, se analizó el acoplamiento de cada una de ellas por ensayos de inmunoprecipitación. Se encontró la unión de TLR2-MyD88, MyD88-IRAK-1, MyD88-TRAF-6, TRAF-6-IRAK-1 y TRAF-6-IKK- γ . Adicionalmente logramos coprecipitar TLR2-IKK- α y TLR2-I κ B- α . Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que la señalización inducida por LPGm de *Leishmania major* en células NK vía TLR2 es semejante a la inducida por PAMPs reportados de otros microorganismos. Resulta interesante investigar el efecto que ejerce el LPGm de *Leishmania* sobre vías de señalización en células NK de pacientes con diferentes formas clínicas de leishmaniasis.

I. INTRODUCCIÓN

1. 1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las enfermedades tropicales más importantes, por representar un problema de salud pública, causando altas tasas de morbilidad y mortalidad. Existen más de 10 millones de personas en el mundo infectadas y cientos de millones en riesgo ⁽¹⁾.

Esta enfermedad es causada por parásitos protozoarios intracelulares de la familia *Trypanosomatidae* y del género *Leishmania*. La sobrevivencia del parásito depende principalmente de la evasión del sistema inmune del hospedero, ya que el parásito penetra y se multiplica dentro de macrófagos y modula la respuesta inmune de estas células ⁽²⁾.

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis en humanos van desde lesiones cutáneas leves hasta infecciones viscerales que llegan a ser fatales. El espectro clínico está determinado por la especie del parásito involucrado en la infección y la eficacia de la respuesta inmune del hospedero.

1. 2 Agente etiológico de la enfermedad

El parásito *Leishmania* reside dentro del fagolisosoma de macrófagos del hospedero vertebrado y en el tracto digestivo de su vector ⁽³⁾.

Este parásito (*Leishmania*) presenta dos formas básicas en su ciclo de vida: el amastigote y el promastigote, ambas formas se reproducen por fisión binaria.

El amastigote (Figura A) se caracteriza por tener una forma oval o redondeada, de 2 a 5 μm de diámetro, núcleo esférico, excéntrico y compacto, cromatina granulosa,

cinetoplasto de forma bacilar y un rizoplasto que dará origen al flagelo en la etapa siguiente. Esta es una forma intracelular obligada de su célula blanco: el macrófago ⁽⁴⁾.

El promastigote (Figura B) es de forma fusiforme, tiene aproximadamente 12-20 μm de diámetro mayor, consta de un núcleo situado en la parte central del parásito y un flagelo anteronuclear, que nace de un cuerpo basal situado por delante del cinetoplasto y sale del cuerpo por el polo anterior, carece de membrana ondulante. Este pasa por dos fases: procíclica (logarítmica o de crecimiento) y una fase metacíclica (estacionaria e infectiva) ⁽⁴⁾.

Ciclo de vida del parásito

El ciclo de vida del parásito involucra a un hospedero invertebrado transmisor de la enfermedad (vector), el cual es un mosquito hembra perteneciente a los géneros *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo (Figura C). Estas especies pueden describirse como dípteros de 3-5 mm de longitud, con cuerpo y alas muy pilosos. Estos artrópodos conocidos comúnmente como: papalotillas o jejenes, tienen una gran capacidad vectorial transmitiendo los parásitos por la picadura y provocando la úlcera del chiclero a los humanos. Dentro de la República Mexicana estos insectos se distribuyen en 17 entidades. En el Golfo de México involucra los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo y Yucatán. En la región del Pacífico: Chiapas, Guerrero, Jalisco y Nayarit, afectando también estados como: San Luis Potosí, Morelos, Puebla e Hidalgo. Se ha reportado una mayor incidencia de leishmaniasis principalmente en los estados de Quintana Roo, Tabasco, Oaxaca y Nayarit ⁽⁴⁾.

El mosquito hembra adulto requiere de sangre como fuente de nutrientes y como un estímulo para su ovoposición. Cuando un mosquito parasitado por *Leishmania* se alimenta, inyecta su saliva contaminada con parásitos por medio de su probóscide dentro de la herida generada por la picadura. De esta forma, si el hospedero vertebrado

ya está infectado, el mosquito hembra puede ingerir los amastigotes de la sangre contaminada del hospedero. Al ser ingeridos los parásitos, se encuentran en forma de amastigotes los cuales se albergan en el tracto digestivo del artrópodo y sufren una transformación a promastigotes entre las 12 y 18 horas posterior a la ingestión, donde se denominan promastigotes procíclicos. Durante este estadio los parásitos proliferan y migran hacia la región del cárdias, donde ocurre la transformación a promastigotes metacíclicos (fase infectiva), etapa en la cual pueden migrar a faringe y probóscide del insecto ^(3, 5, 6, 7).

La saliva del mosquito es capaz de inhibir la producción de óxido nítrico (NO) en las células invadidas por *Leishmania*. Después de la deposición en la piel, los parásitos invaden los macrófagos (Figura A), residiendo dentro del fagolisosoma y diferenciándose a un estadio de amastigotes. En este momento el parásito debe resistir el ambiente hidrolítico e inhibir la activación del macrófago. Los amastigotes se adaptan a la vida en el medio ácido del fagolisosoma debido a que son metabólicamente más activos en un medio ácido que en un ambiente neutro ^(2, 7).

Los amastigotes dentro del fagolisosoma son capaces de reproducirse hasta provocar la lisis de la célula hospedera, quedando libres para infectar otras células fagocíticas donde vuelven a proliferar o también, a circular en sangre o líquido tisular pudiendo ser ingeridos por un mosquito hembra, comenzando de nuevo su ciclo ^(1, 8).

1. 3 Clasificación de la leishmaniasis

La leishmaniasis se ha clasificado de acuerdo a las manifestaciones clínicas que se presentan en 4 tipos:

- ❖ Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) también conocida como úlcera del chiclero ó botón de oriente, es la forma más común de la enfermedad, caracterizada por la presencia de un pequeño nódulo que posteriormente causa

ulceraciones en la piel después de 15 a 20 días de la picadura (Figura D). Estas ulceraciones son indoloras y tienden a la curación espontánea en pocos meses, excepto cuando se localizan en el pabellón auditivo, donde puede convertirse en una enfermedad crónica y en ocasiones mutilante. Especies como *L. major* provocan este tipo de leishmaniasis ^(4, 9).

- ❖ Leishmaniasis cutánea difusa (LCD) inicia con un nódulo que no se ulcera, el parásito viaja por vía linfática llegando a diversas partes del cuerpo produciendo lesiones crónicas y diseminadas en la piel (Figura E), respetando palmas de las manos, plantas de los pies, axilas, cuero cabelludo e ingle. Debido a que hasta la fecha no existe un tratamiento efectivo, en etapas crónicas del padecimiento la enfermedad puede tener un desenlace fatal. *L. mexicana* es una de las especies que produce esta forma clínica ⁽⁴⁾.
- ❖ Leishmaniasis mucocutánea (LMC) o espundia. La manifestación más común son úlceras en la piel, que al extenderse causan la destrucción masiva de mucosas nasales y orofaríngeas (Figura F). Frecuentemente se presentan problemas de fonación, complicaciones respiratorias y adelgazamiento por la dificultad para deglutir. Las lesiones suelen ser dolorosas, no se autolimitan, ni curan y resisten a la quimioterapia específica. Este tipo de leishmaniasis es producida por especies como: *L. braziliensis* ⁽¹⁰⁾.
- ❖ Leishmaniasis visceral (LV) o kala-azar. Es la forma más seria de la enfermedad resultando fatal si no es tratada (Figura G). El período de incubación oscila de 10 a 12 meses y el cuadro clínico se inicia gradualmente. Los parásitos se multiplican abundantemente en bazo y médula ósea. Los signos y síntomas mas frecuentes son: fiebre, malestar general, anorexia, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, linfadenopatía y palidez de mucosas. Este tipo de leishmaniasis la producen especies como: *L. donovani* ⁽⁴⁾.

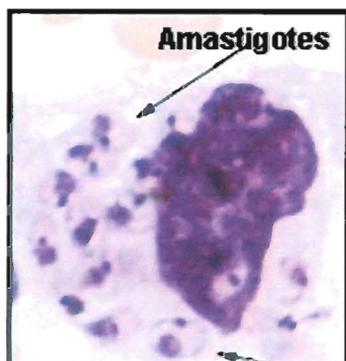


Fig. A Amastigotes de *Leishmania* dentro del macrófago. Tomado de: http://www.biosci.ohiostate.edu/~parasite/infected_macrophage



Fig. B Promastigotes metacíclicos en medio de cultivo. Tomado de: <http://www.who.int/topics/leishmania>



Fig. C *Lutzomyia* sp. Tomado de: <http://www.who.int/topics/leishmania>



Fig. D Ulceración característica de la leishmaniasis cutánea localizada. Tomado de: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis>



Fig. E Lesiones en un paciente con leishmaniasis cutánea difusa. Tomada en: Hospital General de México. Lab. de Inmunoparasitología.



Fig. F Paciente con leishmaniasis mucocutánea que presenta lesiones orofaríngeas. Tomado de: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis>

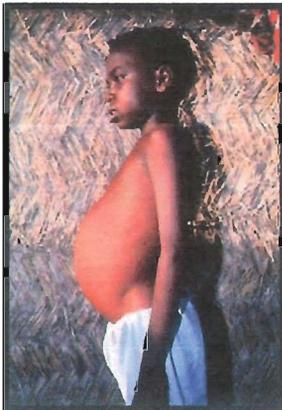


Fig. G Leishmaniasis visceral en un niño. Tomado de: <http://www.med.sc.edu:85/parasitology/lei>

1. 4 Superficie celular del parásito

Leishmania al ser un organismo que vive dentro de células fagocíticas, necesita un mecanismo especializado para penetrar su célula blanco ⁽⁵⁾.

Los promastigotes de *Leishmania* están cubiertos en su superficie por un glucocalix denso, compuesto por varias moléculas ancladas por glucosilfosfatidilinositol (GPI) como: proteofosfoglicanos (PPG), glucoinositolfosfoglicanos (GIPLS), fosfatasa ácida de secreción, lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína 63 (gp63). La gp63 es una metaloproteasa dependiente de zinc que entre otras funciones protege al parásito de la degradación ejercida por enzimas lisosomales, a través de la conversión proteolítica de C3b a C3bi en la superficie del parásito. El LPG y la gp63 han sido reconocidos como el enlace entre los promastigotes y la célula hospedera, además de participar en la inhibición de los procesos proteolíticos del macrófago ^(11,12).

Lipofosfoglicano (LPG)

El LPG es la molécula más abundante en la superficie de los promastigotes de *Leishmania*, es sintetizada por todas las especies del parásito (Figura H) y está compuesta por 4 regiones principales:

- ❖ I La región de anclaje de GPI, un lípido 1-O-alkil-2-liso-fosfatidilinositol.
- ❖ II Una región central de fosfosacáridos constituida por gluco heptasacáridos fosforilados.
- ❖ III Una región de disacáridos fosforilados, que es un gran dominio de fosfoglicanos con 15-30 unidades repetitivas de Gal-Man-P en el caso de *L. major* (dependiendo de la especie hay sustituciones de estos azúcares) y
- ❖ IV Un casquete terminal de oligosacáridos que puede estar constituido por galactosa o manosa ^(1,11).

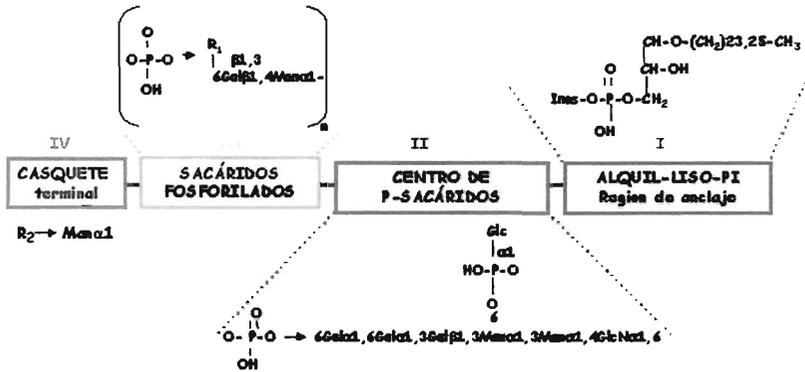


Fig. H Estructura esquematizada del LPG de promastigotes de *Leishmania*.
Tomado de Turco & Descoteaux, 1992.

El LPG ha sido relacionado con la sobrevivencia de *Leishmania* dentro del vector y en la regulación de la adhesión e invasión celular dentro de la célula hospedera. Se ha reportado que el LPG participa en la resistencia al complemento evadiendo el complejo de ataque a membrana C5b-C9, así como en la protección contra productos tóxicos del macrófago, debido probablemente a la elongación del LPG en la superficie del parásito. Parásitos de *L. major* deficientes en LPG son incapaces de establecer una infección en ratones y en macrófagos ⁽¹⁾.

También se ha reportado que el LPG es capaz de inhibir el estallido oxidativo en un 70% a través de la inhibición de la actividad de la proteína cinasa C (PKC) y de su translocación a la membrana celular. Por otro lado, el LPG es capaz de inhibir la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) provocando la disminución de la síntesis de óxido nítrico (NO) ⁽⁵⁾.

El papel del LPG en la evasión inmune parecen ser complementado por la función de la gp63. Se ha visto que durante los estadios iniciales de infección del macrófago por *Leishmania donovani*, el LPG promueve la sobrevivencia intracelular de los promastigotes

por medio de la inhibición de la fusión de los lisosomas con los fagosomas que contienen a los parásitos. Si el fagolisosoma no se forma, la gp63 asume una función protectora inhibiendo enzimas fagosomales degradadoras ⁽²⁾.

El LPG también inhibe la quimiotaxis de monocitos y leucocitos polimorfonucleares. Además, altera la expresión de moléculas de adhesión en las células de langerhans y disminuye su actividad migratoria ^(13,14).

Por todo lo anterior se ha postulado al LPG como un importante factor de virulencia durante el ciclo de infección de *Leishmania* en mamíferos ⁽¹⁾.

1. 5 Aspectos inmunológicos de la leishmaniasis

Cuando los parásitos de *Leishmania* son transmitidos por el vector a un hospedero vertebrado se enfrentan como primer barrera a los componentes del suero de su hospedero, activando las vías clásica y alterna del complemento. Al entrar en contacto con el macrófago (célula blanco), el parásito debe resistir este ambiente citotóxico. Se sabe que el parásito interfiere con vías de señalización responsables normalmente de la destrucción de patógenos intracelulares ^(1, 4).

El parásito sobrevive dentro del macrófago inhibiendo la apoptosis, la presentación antigénica por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y la respuesta por citocinas ⁽²⁾.

La infección por *Leishmania* produce una estimulación de la respuesta inmune celular, mediada por los linfocitos T con la participación de las células presentadoras de antígeno, así como de la respuesta inmune humoral, mediada por linfocitos B.

Dentro de los linfocitos T existen las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ (por sus marcadores de superficie). Entre linfocitos CD4⁺ existen dos subpoblaciones: la Th1 y Th2, las cuales

se diferencian por su patrón de secreción de citocinas. La primera subpoblación secreta citocinas capaces de activar macrófagos (IFN- γ , TNF) incrementando su función microbicida. Esta respuesta Th1 ha sido reportada como protectora contra infecciones por parásitos intracelulares como *Leishmania*. Por otro lado, una respuesta Th2 está asociada a susceptibilidad ya que exagera la leishmaniasis debido a que produce citocinas (IL-4, IL-10) que inhiben a Th1 y al macrófago, favoreciendo la multiplicación incontrolada del parásito ⁽⁴⁾.

Adicionalmente, se ha encontrado que los promastigotes metacíclicos de *Leishmania major* inhiben la producción de IL-12 por mamíferos a nivel de su expresión génica. La IL-12 es el promotor fisiológico más potente para la producción de IFN- γ producido entre otras células por las NK. El IFN- γ es capaz de activar macrófagos los cuales son capaces de eliminar a los parásitos de *Leishmania*. Esta habilidad de suprimir la producción de IL-12 se podría considerar una ventaja de sobrevivencia del parásito ⁽²⁾.

1. 6 Respuesta Inmune

La función fisiológica del sistema inmune es la defensa contra microorganismos infecciosos mediada por las reacciones tempranas de la respuesta inmune innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa ⁽¹⁵⁾.

Los vertebrados han desarrollado dos mecanismos de protección que actúan como guardianes contra las infecciones, estas son: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa, las cuales forman un sistema integrado de defensa en el que existe una cooperación funcional de numerosas células y moléculas. La inmunidad innata no proporciona sólo una primera defensa contra los microorganismos, sino también desempeña diversas funciones importantes en la inducción de la respuesta inmune adaptativa. Fenómenos de la respuesta inmune innata como la inflamación, proporcionan una señal de alarma que dispara respuestas inmunitarias adaptativas. Así mismo, la activación del complemento representa un mecanismo de la inmunidad innata

en la cual participa la respuesta inmune adaptativa mediante la activación de la vía clásica por anticuerpos específicos. Para la eliminación eficaz de un microorganismo es indispensable la participación del sistema inmune innato apagado en etapas tardías por el sistema inmune adaptativo que intensifica la respuesta mediante la producción de anticuerpos específicos, así como linfocitos T con capacidad de secretar citocinas que incrementan la capacidad efectora de las células del sistema inmune innato ^(15,16).

Respuesta Inmune Innata (RII)

La respuesta inmune innata (inmunidad natural) es la primer línea de defensa contra microorganismos (mo) patógenos. El reconocimiento de los patógenos por parte de la RII es relativamente bajo, de diversidad limitada, no existe memoria y su función es muy parecida frente a diferentes de agentes infecciosos. La RII tiene un alto grado de especificidad en su habilidad por discriminar lo propio de lo extraño, como lo son los mo patógenos ⁽¹⁶⁾.

Los elementos esenciales de la inmunidad innata consisten de mecanismos de defensa como lo son barreras físicas y químicas (ejem. epitelios y sustancias antimicrobianas, el sistema del complemento, etc). En la especificidad de la RII están involucradas células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas, leucocitos polimorfonucleares y las células NK (asesinas naturales). Todas estas células a través de receptores celulares denominados receptores de reconocimiento patrón (PRR, Pattern Recognition Receptors), reconocen moléculas comunes en varios mo, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; Pathogen Associated Molecular Patterns) ^(16,17).

Los PAMPs tienen características que permiten que las células involucradas en despertar una RII puedan actuar contra mo patógenos como: ser generalmente expresados por mo patógenos, mostrar una pequeña variación entre mo de diferente clase y que esta expresión sea esencial para la sobrevivencia del mo ⁽¹⁵⁾.

1. 7 Células NK (Asesinas Naturales)

Llamándolas inicialmente células nulas, actualmente se conoce a las células NK como un componente central del sistema inmune innato. Las células NK fueron originalmente identificadas por su habilidad para lisar células tumorales en ausencia de estimulación previa. Estas células que representan una tercera población de linfocitos, no expresan marcadores de células T o B y pueden ser distinguidas de los otros linfocitos dado que no expresan receptores de distribución clonal para antígenos ⁽¹⁹⁾.

Bajo condiciones normales, las células NK se encuentran principalmente en sangre periférica (10-20% de linfocitos totales), bazo, hígado y médula ósea, pero pueden migrar hacia tejidos inflamados en respuesta a diferentes quimioatrayentes ^(19, 20).

Las células NK juegan un papel importante en el control del crecimiento tumoral y prevención de la rápida diseminación de tumores metastásicos en modelos murinos. Además, son fundamentales en la defensa contra infecciones virales (principalmente de herpesvirus), bacterianas (Gram-positivas y Gram-negativas) y parásitos protozoarios intracelulares como *Leishmania* ^(21, 22).

La activación de células NK incrementa la síntesis de quimiocinas y citocinas que inducen respuestas inflamatorias, modulan la hematopoyesis, controlan el crecimiento de monocitos y granulocitos e influyen en el tipo de respuesta adaptativa subsecuente ⁽¹⁹⁾.

En la leishmaniasis humana y experimental, se ha visto que las células NK son un suministro temprano de IFN- γ , el cual es un mediador crucial de la resistencia innata contra el parásito *Leishmania*, así como un potente activador de macrófagos. La producción temprana de IL-12 induce la activación de células NK. Ahora se sabe que *Leishmania* es capaz de inhibir la síntesis de IL-12 en macrófagos, lo que limita la activación de células NK ^(23, 24, 25).

Las células NK reconocen moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I) a través de receptores de superficie que transmiten señales supresoras de función de las células NK. De este modo las células NK matan aquellas células que no presentan o que expresan insuficientes cantidades de MHC I. Lo anterior sucede frecuentemente con células tumorales y células infectadas con virus ⁽²⁶⁾.

En humanos, las células NK tienen receptores inhibitorios, que pertenecen a tres familias: la familia de los receptores KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors), los cuales son expresados sólo en determinadas células NK y reconocen diferentes grupos alélicos de moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C. La segunda familia de receptores inhibitorios consta de los receptores ILT de tipo Ig, un miembro de esa familia es el ILT2, que presenta una especificidad amplia por muchos alelos del MHC I. La tercer familia consta de heterodímeros compuestos de las lectinas tipo C NKG2A o NKG2B unidas en forma covalente a CD94 ^(19, 26, 53).

Los receptores con función inhibitoria de las células NK se caracterizan por su habilidad en reclutar y activar las proteínas con función de tirosina fosfatasas SHP-1 y SHP-2 a través de ITIMs presentes en sus tallos citoplasmáticos. Estos receptores inhibitorios impiden la activación de células NK al reconocer moléculas MHC I sin alteraciones presentes en todas las células nucleadas. Algunos miembros de las familias KIR y CD94/NKG2 no contienen ITIM, sino que se asocian a moléculas accesorias portadoras de ITAM (como DAP2) produciendo señales activadoras en estas células ^(19, 27).

Los receptores con función activadora de las células NK incluyen varios grupos de moléculas con estructuras diferentes y solo se conocen algunos de los ligandos a los que se unen. Estos receptores están asociados con moléculas de señalización que contienen dominios ITAM como las proteínas FcεR1γ, ξ y DAP12. Los receptores activadores de NK intervienen en vías de transducción de señales en las que participan las proteínas tirosinas cinasas Syk y ZAP-70, así como moléculas adaptadoras que se asocian a receptores antigénicos de linfocitos y de los receptores Fc de Ig. CD16 es uno de los receptores activadores de las células NK, los receptores NKp46, NKp30 y

NKp44 son denominados receptores de citotoxicidad natural, que se asocian a FcR γ y ξ y se expresan solo en las células NK ⁽²⁷⁾.

Los receptores activadores reconocen estructuras alteradas asociadas al MHC I y su activación lleva a la inducción de la actividad citolítica de las células NK, destruyendo todas aquellas células que expresen alteraciones en el número o estructuras del MHC I, como ocurre durante algunas infecciones virales o en células tumorales ^(19, 27).

Adicionalmente, existe la evidencia de un reconocimiento directo de moléculas de algunos patógenos por receptores de células NK. Entre estos se encuentra el parásito *Leishmania*.

La forma en la cual los promastigotes de *Leishmania* activan directamente a las células NK no es clara pero se propone que pueden ser activadas directamente por polisacáridos ya que las células NK tienen receptores que reconocen estructuras de carbohidratos. Uno de los receptores que participa en el reconocimiento es TLR2 que reconoce el LPG de *Leishmania* en fase procíclica y metacíclica. Este reconocimiento provoca el incremento de la expresión del receptor TLR2 en la membrana de células NK e induce la secreción de IFN γ , TNF- α y la translocación nuclear de NF- κ B en células NK ^(23, 24, 26).

1. 8 Receptores tipo Toll (TLRs; Toll-like receptors)

El descubrimiento de la familia de los TLRs comienza con la identificación del receptor Toll; un receptor que es expresado por insectos, y siendo esencial para el establecimiento del eje dorso-ventral durante la embriogénesis en *Drosophila*. Si algún componente en la vía de señalización de Toll está ausente durante este proceso genético, no se desarrollan los tipos celulares laterales o ventrales ⁽²⁸⁾.

Los receptores Toll también tienen un papel esencial en la respuesta inmune innata de los insectos contra infecciones fúngicas en etapas adultas. El papel de los receptores Toll en la señalización de la respuesta inmune de *Drosophila* es inducir una respuesta contra infecciones microbianas y una de ellas es la inducción transcripcional de una serie de genes codificadores de péptidos antimicrobianos, que incluyen elementos κ B, y sugieren que proteínas como NF- κ B/Rel podrían ser activadores de la respuesta inmune en insectos. Las proteínas nucleares Dorsal, Dif y Relish de *Drosophila* participan en la regulación de la transcripción a través de sitios κ B, y son consideradas proteínas activadoras en respuesta a infecciones. Proteínas como: Spätzle, Toll, Pelle, Tube y Cactus son requeridas en respuesta a infecciones para la rápida inducción transcripcional de genes que codifican para péptidos antimicrobianos, como la drosomicina ^(29, 58).

Los TLRs son receptores de superficie celular e iniciadores de respuestas inflamatorias contra patógenos. Hasta la fecha han sido identificados trece receptores tipo toll en mamíferos. Estos receptores fueron relacionados con la señalización hacia el factor de transcripción κ B (NF- κ B) que regula la transcripción de varios genes involucrados en la respuesta inmune, por lo que son considerados importantes reguladores de la inmunidad (Figura I). Además de estar demostrada la función de los TLRs como receptores de reconocimiento de diversos patógenos y ligandos virales ^(30, 54).

Los TLRs son glicoproteínas integrales de membrana tipo 1 con peso molecular de 87-115 kDa. Algunos de ellos son localizados sobre la superficie celular como el TLR1, 2, 4, 6, mientras que otros como el TLR3, 7 y 9 se encuentran secuestrados en compartimentos intracelulares ^(31, 55).

A excepción del TLR10 ya han sido identificados ligandos específicos para los diferentes TLRs. De este modo el ligando para el TLR1 son lipoproteínas triaciladas, un ligando del TLR3 es el ARN de doble cadena el cual se considera que es generado en el ciclo de vida de virus de ARN, mientras que para el TLR4 son lipopolisacáridos (LPS) un componente de la pared de bacterias Gram-negativas. Por otro lado el TLR5

reconoce la flagelina, un componente del flagelo bacterial. Para el TLR6 son lipoproteínas diaciladas los ligando conocidos, para TLR7: imidazoquinolina, una droga antiviral y su derivado R-848. Recientemente se reportó que el TLR8 reconoce componentes de bacterias uropatógenicas y ARN de cadena sencilla. Mientras que para el TLR9 el CpG de ADN bacterial no metilado es su principal ligando (15, 18, 34, 52).

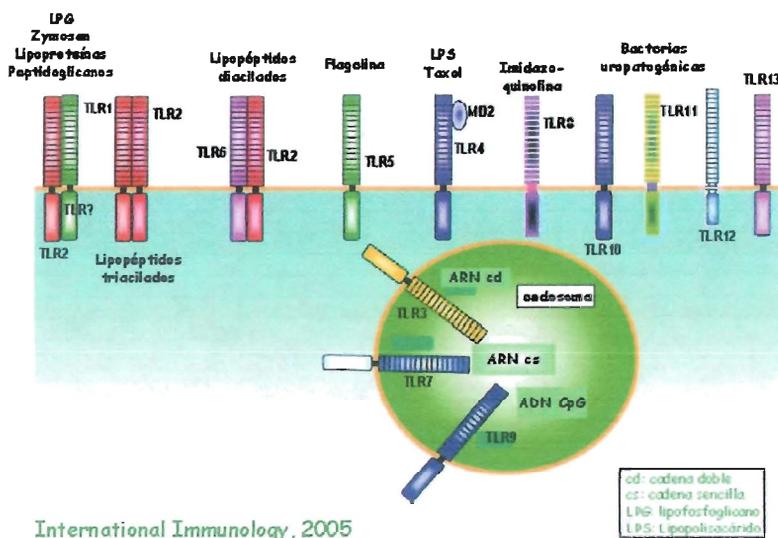


Fig. 1 Algunos ligandos reconocidos por TLRs.

El TLR2 reconoce diversos componentes microbianos, incluyendo peptidoglicanos de bacterias Gram-positivas como lo es *Staphylococcus aureus*, lipoproteínas, lipoarabinomananos de *Mycobacterium tuberculosis*, lipopéptidos bacterianos, anclajes de fosfatidilinositol de *Trypanosoma cruzi*, porinas de *Neisseria meningitides*, lipofosfatidilserina de *Schistosoma mansoni*, componentes de la pared celular de levaduras como el zimosan y el lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania major*. (18, 33, 35).

El reconocimiento de diversos PAMPs por el TLR2 parece deberse a la formación de heterodímeros entre TLR2 y otros TLRs como TLR1 y TLR6. Estos reconocen

diferencias estructurales entre lipopéptidos bacterianos y lipopéptidos de hongos. La unión de peptidoglicanos puede ser reconocido por un homodímero de TLR2 o un heterodímero de TLR2 y un TLR desconocido (Figura I) ⁽³⁴⁾.

La producción de citocinas proinflamatoria por macrófagos y células dendríticas en respuesta a zymosan requiere de TLR2 y TLR6. Durante la fagocitosis de zymosan tanto TLR2 como TLR6 son reclutados al fagosoma. La heredimerización inicia la señalización del TLR generando la activación de NF- κ B y la producción de citocinas como TNF- α ⁽⁵⁵⁾.

Los TLRs son capaces de reconocer diversos componentes patogénicos a través de estructuras denominadas ectodominios (ECD), los cuales comprenden de 19 a 25 copias en tandem de un motivo conocido como regiones ricas en leucina (LRR) (Figura J). Estas LRR se caracterizan por ser estructuras amino y carboxilo terminal que median el reconocimiento de PAMPs y dependiendo de los cambios en estas regiones se les atribuye el reconocimiento de ligandos específicos a cada uno de los receptores TLRs. Algunos ECD de los TLRs pueden tener su cara al exterior de la célula o en el lumen de un compartimiento intracelular donde estos pueden reconocer al patógeno ^(31, 32).

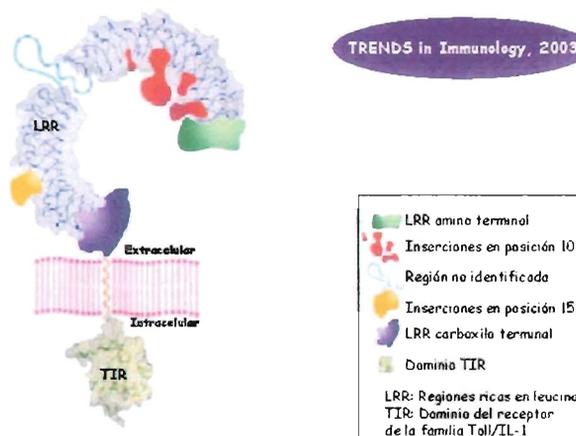


Fig. J Estructura del receptor tipo toll (TLR).

Se ha sugerido que los TLRs están formados por un esqueleto básico en forma de herradura solenoide que contiene hojas β -plegadas sobre su superficie, así como numerosas inserciones de unión a ligandos. Estas inserciones junto con las hojas β -plegadas podrían propiciar una superficie de unión que esta 10 veces más plegada en área que las superficies de unión en otros tipos de receptores ⁽³¹⁾.

Además de las regiones LRR, los TLRs se caracterizan por la presencia de una región intracelular o citoplasmática denominada dominio del receptor de la familia Toll/IL-1 (TIR), debido a la homología que presenta esta región con el receptor de IL-1 (Figura J) ^(31, 33).

La estimulación de los TLRs por medio de PAMPs activa una cascada de señalización, que culmina en la producción de citocinas pro-inflamatorias y la subsecuente respuesta inmune. La cascada de señalización río abajo de los TLRs es generada por su dominio TIR ^(34, 56).

Señalización vía TLRs

Los TLRs son una familia de receptores que provocan la activación de diversas moléculas involucradas en la señalización, la cual se desencadena por el reconocimiento de diversos ligandos al momento en que se ponen en contacto con el receptor y este se activa. Ahora se conoce que el inicio de la señalización en los TLRs es por medio de las regiones TIR que reclutan proteínas adaptadoras ^(36, 37, 56).

La activación del receptor TLR2 por el reconocimiento de productos bacterianos es crucial para la respuesta de señalización intracelular incluyendo la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) y la inducción de citocinas proinflamatorias ⁽³⁷⁾.

Se ha visto que la activación del receptor TLR2 activa una señalización que recluta a la proteína adaptadora **MyD88** (proteína de diferenciación mieloide), la cual interactúa con

la proteína cinasa serina/treonina **IRAK-1** (cinasa asociada al receptor de IL-1). El reclutamiento de IRAK da como resultado la fosforilación de esta proteína y su asociación con **TRAF-6** (factor asociado al receptor de TNF), denominando a estas tres proteínas como: adaptadoras. De esta forma se fosforila y activa un complejo denominado señalosoma que involucra a las proteínas: **IKK- α , β y γ** (cinasa de I κ B - α , β y γ) cuya función es fosforilar a las proteínas inhibitoras de NF- κ B: **I κ B** produciendo su degradación y provocando su separación del factor de transcripción κ B (NF- κ B) el cual tienen secuestrado en el citoplasma. Este factor está compuesto de homodímeros y heterodímeros de la familia Rel como p50, p52, c-Rel, Rel B y p65. Los heterodímeros citoplasmáticos inactivos de NF- κ B son liberados por medio de la fosforilación de I κ B, provocando así su translocación al núcleo donde interactúan con elementos mediadores de la activación de transcripción de genes (Figura K) ^(37, 38).

El TLR2 interactúa con MyD88 (proteína de diferenciación mielóide) a través de los dominios TIR de ambas proteínas esta es una interacción homotípica con un dominio TIR en el extremo carboxilo terminal de MyD88 ⁽³⁸⁾.

MyD88. Es una proteína con capacidad de señalización, con un peso molecular de aproximadamente 35 kDa, y solo ha sido reportada en mamíferos. Está formada por un dominio de muerte (DD) amino terminal y una subunidad denominada dominio Toll carboxilo terminal. El DD está constituido por aproximadamente 90 aminoácidos (aa) y fue inicialmente definido como una región con similitud entre el tallo citoplasmático de los receptores de TNF y FAS/Apo1/CD95. Ahora se sabe que el DD está en muchas otras proteínas y que media la interacción proteína-proteína con otras secuencias DD formando homo o heterodímeros. El dominio Toll carboxilo terminal de MyD88 está compuesto de aproximadamente 130 aa y fue descrito por su homología con las regiones citoplasmáticas del receptor Toll de *Drosophila melanogaster*. El dominio Toll carece de capacidad intrínseca de señalización y transduce señales por el reclutamiento de proteínas asociadas a este ^(39, 40).

La presencia de MyD88 es necesaria para la inducir la traslocación de NF- κ B y AP-1 (proteína activadora 1) al núcleo. Se ha demostrado que la expresión génica dependiente de la activación de NF- κ B y AP-1 a partir de la estimulación de diferentes TLRs es generada por las regiones TIR de estos y que contribuyen de manera importante en el desarrollo de la respuesta inmune innata ^(41, 56).

Estudios anteriores han demostrado que ratones deficientes de MyD88 son incapaces de producir citocinas inflamatorias en respuesta a una variedad de componentes microbianos incluyendo: LPS (ligando de TLR4), lipopéptidos (ligando de TLR2), flagelina (ligando de TLR5) y ADN CpG (ligando de TLR9) ⁽⁴²⁾. Además la respuesta celular del TLR2 activado con ligandos como peptidoglicanos y lipoproteínas es abolida en ratones deficientes de MyD88, lo que sugiere que la activación de TLR2 es dependiente de MyD88 ⁽⁴³⁾.

IRAK. La activación de MyD88 por TLRs recluta a la proteína IRAK a través de la interacción de los dominios de muerte de ambas moléculas. IRAK fue originalmente identificada como una cinasa serina/treonina asociada al receptor de IL-1, con función transductora de señales para la citocina pro-inflamatoria IL-1. Es reconocida como una molécula crucial involucrada en la transducción de señales vía TLRs. ⁽⁴⁴⁾.

La familia de moléculas de IRAK en mamíferos está compuesta por 4 miembros: IRAK-1 (80 kDa), IRAK-2, IRAK-M e IRAK-4. Estas proteínas consisten de un dominio de muerte (DD) amino terminal el cual es responsable de la interacción con el DD de MyD88 y un dominio cinasa central (KD). Estos dominios consisten de 12 subdominios que son los que muestran características típicas de otros dominios de cinasas serina/treonina. Se sabe que al ser activada IRAK-4 fosforila IRAK-1, este proceso es esencial en la señalización vía TLRs. La actividad de la cinasa IRAK-1 es indispensable para el funcionamiento de la señalización para IL-1. Esta demostrado que ratones deficientes de IRAK-1, muestran una deficiencia en la respuesta inducida por LPS. ⁽⁴⁴⁾.

La estimulación de la IL-1, produce la fosforilación y posterior degradación de IRAK-1. Es posible que los aminoácidos fosforilados en IRAK-1 sean reconocidos por ligasas de ubiquitina, las cuales marcarán a IRAK-1 para su posterior degradación a través del sistema del proteosoma.

Por otro lado, se sabe que IRAK-1 también media el reclutamiento de TRAF-6 a través del complejo IL-1R^(44, 45).

TRAF-6. Es una proteína con un peso molecular de 60 kDa, es parte de una familia de proteínas denominadas TRAF (factor asociado al receptor de TNF) las cuales están caracterizadas por un dominio conservado denominado TRAF carboxilo terminal, un dominio amino terminal dedo anillado o "RING FINGER" y de 5-7 estructuras de dedos de zinc⁽⁴⁴⁾.

TRAF-6 está involucrado en la vía de señalización mediada por TLRs. La estimulación de TLRs provoca el reclutamiento de TRAF-6 que junto con IRAK-1 y MyD88 son denominadas complejo de señalización. La disociación del complejo IRAK-1/TRAF-6 provoca que TRAF-6 active proteínas involucradas río abajo en esta vía de señalización⁽⁴³⁾.

La presencia de TRAF-6 incrementa la expresión de los genes que codifican para la IL-2, por lo tanto esta proteína tiene importancia en efectos transcripcionales de IL-2. Se sabe que IRAK y TRAF-6 inducen la expresión de factores de transcripción como NF- κ B y AP1, este último potencia el efecto de IL-1 mediado por la integración y activación de TRAF-6 e IRAK. TRAF-6 también media la transducción de señales para la síntesis de la IL-1⁽⁴⁶⁾.

IKKs e I κ Bs. Las proteínas de NF- κ B son críticas para la activación de la expresión de genes que están involucrados en el control de la respuesta inmune e inflamatoria, y en la protección celular por apoptosis en respuesta a una gran variedad de estímulos que incrementan la actividad de cinasas como IKK- α e IKK- β . Los dímeros de NF- κ B son

secuestrados en el citoplasma a través de la interacción con proteínas inhibidoras de NF- κ B (I κ B) y la activación de estos dímeros esta basada en la inducción de la fosforilación y posterior degradación proteosomal de las proteínas I κ Bs que están formadas por 7 miembros: I κ B- α (37 kDa), I κ B- β (45 kDa), I κ B- ϵ (45-50 kDa) I κ B- γ , Bcl-3, y dominios inhibitorios de las proteínas precursoras p100 y p105. La fosforilación de las proteínas I κ B esta mediada por cinasas de I κ B (IKK), un complejo de señalización de múltiples subunidades (señalosoма) capaz de unirse a I κ B y regular su señalización río abajo. El clásico señalosoма de IKK está compuesto de dos subunidades catalíticas, IKK- α (81 kDa) e IKK- β (90 kDa), y una subunidad regulatoria, IKK- γ (45 kDa), también conocida como modulador esencial de NF- κ B (NEMO).

Cuando la activación por fosforilaciones del señalosoма es adecuada se promueve la translocación de NF- κ B al núcleo y esto es un proceso común en muchas vías de activación ^(47, 48).

IKK- α es capaz de funcionar independientemente de su unión al señalosoма induciendo el procesamiento del precursor p100 y dando lugar al homodímero p52 de la familia NF- κ B. También se ha visto que la actividad de cinasa de IKK- α es requerida para la maduración de linfocitos B, la formación de órganos linfoides secundarios, es un regulador global de TNF- α y es esencial para la diferenciación de la epidermis ⁽⁴⁹⁾.

IKK- β y NEMO son esenciales para la formación del señalosoма y la subsecuente activación del NF- κ B. IKK- β es esencial para la activación de mediadores de la respuesta inflamatoria. La fosforilación de esta molécula provoca el desprendimiento de homodímeros p50 a partir de su precursor p105 y al igual que IKK γ e IKK α es crítica para la activación de vías dependientes de NF- κ B, TNF- α y genes responsables de la síntesis de IL-1. IKK- γ contiene repeticiones ricas en leucina que son críticas para la interacción con IKK- β lo cual facilita la interacción de esta molécula con las proteínas I κ Bs que provoca el incremento en la actividad de las IKKs. Estas regiones también son esenciales para la oligomerización del señalosoма ⁽⁵⁰⁾.

NF- κ B se localiza de manera basal en el citoplasma en un estado inactivo y necesita un estímulo para translocarse al compartimiento nuclear. La variedad de señales que pueden activar a este factor de transcripción es reflejo de la cantidad de eventos con que ha sido relacionado. Los mejor caracterizados son aquellos que involucran citocinas inflamatorias como IL-1 β y TNF- α , los estímulos mitogénicos como esteres de forbol (PMA), los relacionados con agentes infecciosos como LPS bacteriano o LPG de *Leishmania* y expresión de antígenos virales. Este factor regula la transcripción de una gran variedad de genes, en particular aquellos involucrados en la respuesta inmune y control de la proliferación nuclear. ^(23, 57, 58).

NF- κ B es un homo o heterodímero constituido por diferentes subunidades que han sido agrupadas dentro de la familia Rel, cada una de estas proteínas tiene una región conservada de 300 aa en el N-terminal llamado dominio Rel que es la responsable de la dimerización, la unión al ADN y la interacción con las I κ Bs. En mamíferos se han descrito las subunidades: RelB, c-Rel, p65 (RelA), p50, p52. Cada dímero tiene distinto potencial transcripcional, siendo algunas combinaciones mas activas que otras y siendo utilizados en distintos momentos de la respuesta inmune ^(57, 58). El dímero más abundante y activo es el formado por las subunidades p50:p65, seguido de los formados por: p50:c-Rel, p50:p50 y p65:cRel ^(57, 58).

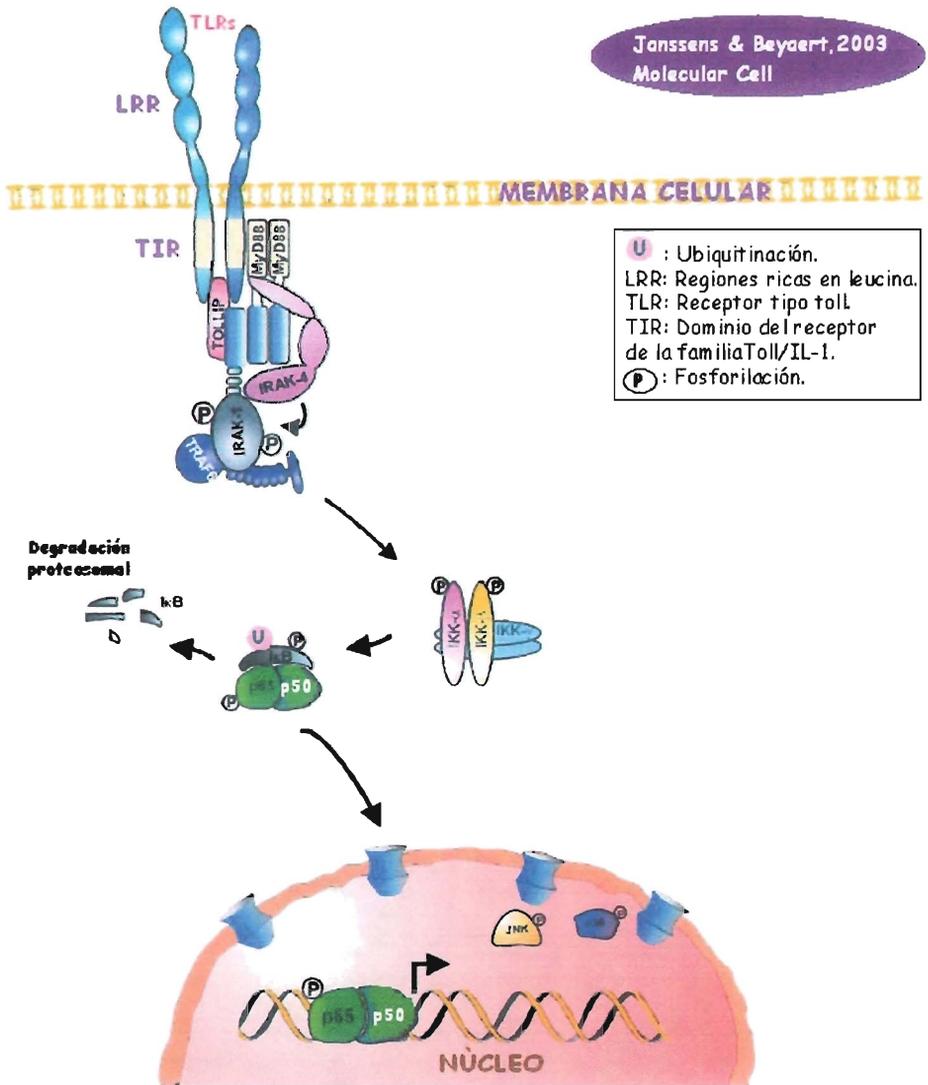


Fig. K Señalización vía TLR2 dependiente de MyD88.

II. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se sabe que las células NK desempeñan dos funciones principales en la respuesta inmune innata: la producción de citocinas y el mecanismo de citotoxicidad.

Becker y cols en el 2003 reportaron la co-localización y la unión del LPG de *Leishmania major* al receptor TLR2 presente en la membrana de células NK. Adicionalmente demostraron que LPG induce la translocación nuclear de NF- κ B en células NK. Observando un incremento 3 veces mayor en la translocación de este factor al núcleo de dichas células estimuladas con LPG ⁽²³⁾.

En el mismo año, De Veer y cols reportaron que la proteína adaptadora MyD88 es esencial para estimular la señalización intracelular en macrófagos durante la infección por *Leishmania major*. ⁽⁵¹⁾.

Tomando en cuenta los antecedentes de que el LPG es reconocido por TLR2 de células NK y que otros PAMPs se unen a TLRs siguiendo una vía de señalización "clásica", donde moléculas como MyD88 juegan un papel esencial, nuestro interés fue analizar si el LPG de *Leishmania major* induce a través del receptor TLR2 de células NK una cascada de señalización semejante a la ya reportada para otros PAMPs.

III. HIPÓTESIS

El lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania major* metacíclico será capaz de inducir en células NK a través del receptor TLR2, una cascada de señalización semejante a la inducida por otros PAMPs.

IV. OBJETIVOS

4. 1 Objetivo general

- ❖ Analizar las moléculas que participan en la transducción de señales del TLR2 activado por el LPG de *Leishmania major* metacíclico en células NK.

4. 2 Objetivos específicos

- ❖ Purificar células NK de sujetos sanos a partir de sangre periférica humana.
- ❖ Obtener extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm.
- ❖ Analizar por Western-blot (Wb) en ambos extractos de células NK la presencia de las moléculas que participan en la transducción de señales del TLR2.
- ❖ Obtener extractos nucleares de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm.
- ❖ Analizar por Wb en ambos extractos nucleares de células NK la translocación nuclear de las isoformas NF- κ B p65 y NF- κ B p50.
- ❖ Determinar por ensayos de inmunoprecipitación el acoplamiento de las moléculas que participan en la cascada de señalización del TLR2.

V. METODOLOGÍA

5.1 Crecimiento del parásito

Se trabajó con la cepa MHOM/SU/73/5-ASKH de *Leishmania major*, mantenida en agar sangre y el medio de *Drosophila* Schneider. Los promastigotes de *Leishmania major* fueron subcultivados cada 3-4 días, cultivando 1×10^7 parásitos/ml. Todos los parásitos utilizados en este estudio fueron recuperados durante su fase estacionaria (metacíclica). La metaciclogénesis fue determinada realizando una prueba de aglutinación con lectina de cacahuete (PNA) incubando 2×10^8 promastigotes con $100 \mu\text{g/ml}$ de PNA durante 20 minutos a 25°C . Después los parásitos fueron centrifugados a 800 rpm durante 3 minutos. Se recuperaron los parásitos no aglutinados (fase metacíclica) del sobrenadante y se centrifugaron a 3 500 rpm durante 15 min a 4°C . Se lavaron con PBS 1 vez y la pastilla se congeló a -70°C para la posterior purificación del LPG.

5.2 Purificación del LPG

Se partió de un stock de 1×10^7 parásitos, se lavaron con PBS pH 7.3 y después de centrifugar la pastilla se resuspendió en cloroformo/metanol/agua (4:8:3 v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El residuo insoluble fue delipidado en agua saturada con 1-butanol durante 18 horas a 4°C en agitación constante. Se centrifugó a 10 300 rpm durante 30 minutos a 4°C , tras lo cual el sobrenadante fue liofilizado y lavado con cloroformo/metanol (2:1 v/v). El residuo fue fraccionado por medio de una cromatografía de interacción hidrofóbica disuelta en acetato de amonio 0.1 M. Posteriormente el LPG fue eluído con un gradiente lineal de 1-propanol (5:70 v/v) por 1 hora. Se utilizó polimixina B para confirmar la ausencia de contaminantes como LPS. La pureza del LPG fue analizada en un gel de bis-acrilamida tiñéndolo con plata, para verificar la ausencia de contaminantes.

5. 3 Purificación de células NK

Las células NK se purificaron a partir de sangre periférica humana utilizando un KIT MACS para purificar células NK. De la sangre total se separaron células mononucleares utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque y se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos a 20° C. De las fases obtenidas se separó la interfase densa (mononucleares) por aspiración y se colocó en un tubo limpio. Las células se lavaron una vez con PBS 1x y se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos a 20° C, la pastilla que se obtuvo se resuspendió en medio RPMI-1640 estéril y se contó el número de células obtenidas. Se colocaron 1×10^7 células en cajas de petri adherentes y se dejaron reposar de 18 a 24 horas a 37° C, 5% CO₂. Al siguiente día se recuperaron las células no adherentes, se lavaron con PBS frío y se contaron. Las células se marcaron con anticuerpos (anti-CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD19, CD33, CD123 y glicoforina A), incubándolas durante 10 minutos a 16° C, se agregó el anti-hapteno incubándolo por 15 minutos a 16° C, se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos a 4° C. La pastilla se resuspendió en PBS y se paso por una columna magnética, colectando la fracción negativa (no marcada) en un tubo limpio que son las células NK. Las células purificadas se contaron y se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos a 4° C, la pastilla se resuspendió en medio RPMI para mantenerlas viables. Se tomó una alícuota de células NK y se marcaron con un anticuerpo CD3+ FITC CD16+ CD56+ PE para analizar por citometría de flujo (EPICS Elite ESP) la pureza de las células, obteniéndose una pureza del 90-98% (Datos nomostrados) (Figura L).

5. 4 Ensayo de interacción

Las células NK purificadas ($8-10 \times 10^6$ cels/condición) se dividieron en dos y se mantuvieron en medio RPMI-1640 a 37° C, 5% CO₂ durante 1 hora. Después una de las condiciones fue estimulada con LPG metacíclico (10 µg/ml) durante 1 hora mientras que la segunda condición se mantuvo durante el mismo tiempo de incubación sin estimulación alguna. Se recuperaron los sobrenadantes de ambas condiciones, se lavaron con PBS 2 veces y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos (Figura L).

5.5 Lisis celular

Ambas condiciones se resuspendieron en amortiguador de lisis RIPA modificado (Tris-HCl, pH 7.4 10mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, NaF 10mM, NP-40 1%, coctel inhibidores de proteasas y fosfatasa) a razón de 30 μ l de buffer millón de células, durante 20 minutos en vortex-hielo. La lisis de las células se verificó al microscopio usando azul tripáno. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4° C, el sobrenadante se recuperó y se paso a un tubo limpio y se tomó una alícuota para cuantificación de proteína por el método DC (Biorad). El sobrenadante se guardó a -70° C para su posterior uso (Figura L).

5.6 Purificación nuclear.

Después del ensayo de interacción ambas condiciones (4-6 X 10⁶ cels/condición) se lavaron con PBS 2 veces y se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos a 4° C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en amortiguador de lisis (Tris-HCl, pH 7.6 10mM, NaCl 10 mM, EDTA 1mM, MgCl₂ 1.5 mM, NP-40 1%, coctel inhibidores de proteasas y fosfatasa) durante 15 minutos agitando cada 3 minutos suavemente, a razón de 40 μ l de amortiguador por millón de células. La lisis de las células se verificó al microscopio usando azul tripáno. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a 4° C, el sobrenadante se recuperó (fracción citosólica) y se almacenó a -70° C, el botón se resuspendió en amortiguador de extracción (Tris-HCl, pH 8 20mM, KCl 450 mM, EDTA 0.5 mM, glicerol al 25%, coctel inhibidores de proteasas y fosfatasa) por 45 minutos en agitación constante y a 4° C a razón de 15 μ l de amortiguador por millón de células. Ambas condiciones se centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos a 4° C, se formaron 2 capas de densidad diferente, una líquida (fracción nuclear) y una pegajosa (restos celulares), se recuperó la fracción líquida en un tubo limpio, se tomó una alícuota para determinar proteína por el método DC y el resto de la muestra se almacenó a -70° C para su posterior uso.

5.7 Cuantificación de proteína por el método DC (compatible con detergente)

Para la determinación de proteína de los sobrenadantes de células NK y células NK estimuladas con LPGm se utilizó el método compatible con detergentes (DC) (Biorad) y los datos fueron extrapolados en una curva estandar de albumina sérica bovina (BSA). Como blanco se utilizó el amortiguador de lisis o extracción que fue utilizado y se determinó proteína con 5 μ l de muestra. Cada una de las condiciones se realizó por duplicado. La placa se dejó reposar por 15 minutos y se leyó a 650 nm en el lector de ELISA. Los datos se analizaron en un lector de Elisa EL-312e en el programa KC4 v 2.7.

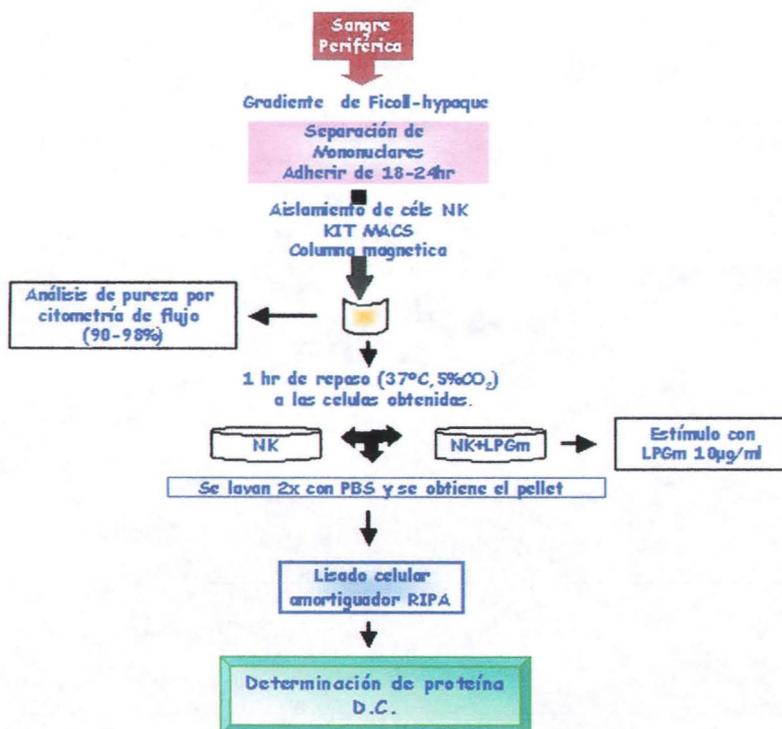


Fig. L Purificación, lisis y cuantificación de proteína de células NK.

5. 8 Ensayos de Western-blot (Wb) y revelado por quimioluminiscencia.

Para el análisis de proteínas por Wb se utilizaron geles de bis-acrilamida al 10, 12 y 15 % dependiendo el peso molecular de la molécula de interés. Las muestras se ajustaron a la misma concentración de proteína, se les agregó amortiguador laemmli 2x y se hirvieron por 3 minutos a 95° C, tras lo cual los extractos proteicos fueron separados en el gel de bis-acrilamida.

Para la transferencia de los geles de bis-acrilamida se utilizaron membranas de PVDF-immobilón (millipore), activadas previamente con metanol durante 3 minutos. La transferencia se realizó en un equipo transblot semi-seco durante 30 minutos a un amperaje constante (0.3 mA/cm²). La membrana se tiñó con rojo de ponceau para verificar que las proteínas se hayan transferido.

La membrana transferida se bloqueó con 3% de BSA en TBST durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó 4 veces con TBST. Se colocó el anticuerpo de interés (TLR2, MyD88, IRAK-1, TRAF-6, IKK- α , IKK- β , IKK- γ , I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ , NF- κ B p65, NF- κ B p50) a una dilución 1:400 con 1% de BSA en TBST al toda la noche a 4° C. Al día siguiente se retiró el anticuerpo y se lavó la membrana con TBST. Se agregó un segundo anticuerpo (anti-ratón, conejo o cabra) conjugado con peroxidasa a una dilución 1:5000 con 1% de BSA en TBST durante 2 horas a temperatura ambiente. Se retiró el anticuerpo y se lavó durante 2 horas con TBST. A la membrana se agregó una solución de sustrato + luminol por 3 minutos y se reveló por quimioluminiscencia utilizando placas Kodak. Posteriormente las placas fueron analizadas en un analizador de imágenes Multiimage AlphaInnotech. Las moléculas reconocidas por el anticuerpo fueron analizadas por densitometría (Figura M).

5.9 Ensayos de Inmunoprecipitación

Las células NK ($12-15 \times 10^6$ cels/condición) se lisaron y se cuantificó proteína por el método DC. Para el proceso de preaclerado de los extractos celulares se agregaron 40 μ l de proteína G a cada condición. Se incubaron por 2 horas a 4° C en agitación constante (vortex). Después de este tiempo se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a 4° C, la proteína G se descartó y el SN se depositó en un tubo limpio y se cuantificó proteína para ajustar las muestras a la misma concentración de proteína. El SN se interaccionó con el anticuerpo de interés (TLR2, MyD88, IRAK-1, TRAF-6, IKK- α , IKK- β , IKK- γ , I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ) utilizando una dilución 1:20, durante toda la noche en agitación constante (vortex) a 4° C. Al día siguiente, por separado se bloqueó proteína G con 2% de BSA durante 2 horas en agitación constante (vortex) a 4° C. La proteína bloqueada se agregó a la muestra (se verificó que todas las condiciones tuvieran la misma cantidad de proteína G). Se incubó nuevamente en agitación constante a 4° C durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4° C. El extracto se descartó y la pastilla se lavó de 7-10 veces con amortiguador de lavado (Tris HCl, pH 7.4 0.05 M, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, NP-40 1%) mezclando en vortex y centrifugando a 12 000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Verificando que la proteína G no se perdiera en cada lavado. A la pastilla obtenida se agregaron 30 μ l de amortiguador laemmuli 2x, se hirvió 5 minutos a 95° C, se dejó en hielo 5 minutos y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4° C, el SN (primer hervida) se pasó a tubos limpios. A la pastilla obtenida se le agregaron de nuevo 30 μ l de amortiguador laemmuli 2x, se hirvió 5 minutos a 95° C, se dejó en hielo 5 minutos y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4° C, el SN se pasó a tubos limpios (segunda hervida). El SN obtenido se analizó por ensayos de Wb y se reveló por quimioluminiscencia. El SN que se obtuvo de la primera hervida se utilizó para analizar el acoplamiento con la molécula de interés. El SN de la segunda hervida se analizó con el anticuerpo homólogo para verificar que la molécula haya sido inmunoprecipitada (datos no mostrados) (Figura M).

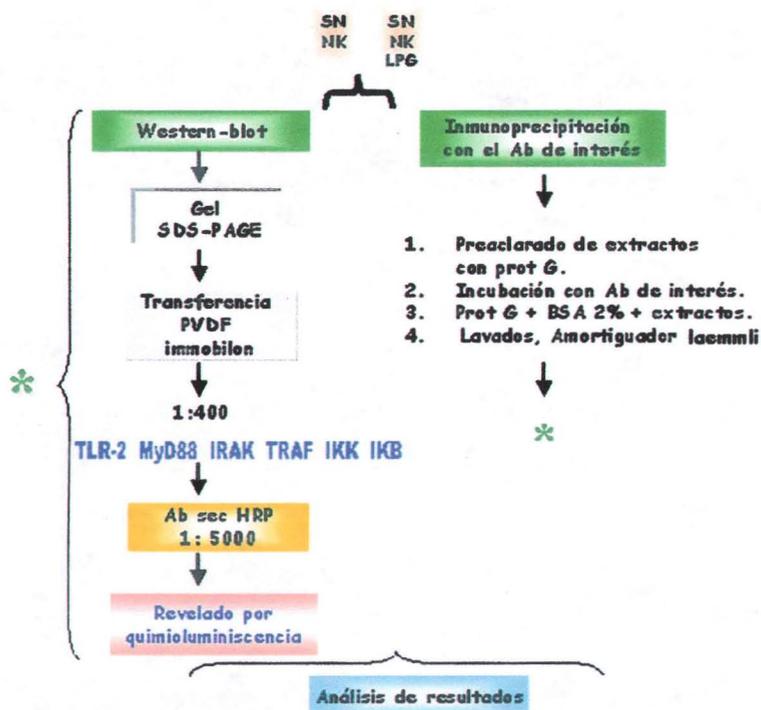


Fig. M Western-blot e Inmunoprecipitación de extractos celulares.

VI. RESULTADOS

6. 1 Análisis de la presencia de moléculas que participan en la transducción de señales a través del receptor TLR2.

En esta parte del trabajo se analizó la expresión de: el receptor TLR2, las proteínas adaptadoras: MyD88, IRAK-1 y TRAF-6 que conforman el complejo de señalización. Además se analizaron las proteínas: IKK- α , IKK- β e IKK- γ denominadas complejo IKK o señalosoma, así como diferentes isoformas de I κ B: I κ B- α , I κ B- β e I κ B- ϵ y dos isoformas del factor de transcripción NF- κ B: p50 y p65. (Figura K).

Análisis de la expresión del receptor TLR2. En extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm se analizó la presencia del receptor TLR2 por ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-TLR2. El anticuerpo anti-TLR2 reconoció en los extractos celulares una molécula de un peso molecular de aproximadamente 87 kDa (Figura 1 A). Se muestra en la figura 1 B el control de carga de actina. El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-TLR2 se muestra en la figura 1 C, observándose que la expresión del receptor TLR2 incrementa casi tres veces en células NK estimuladas con LPGm.

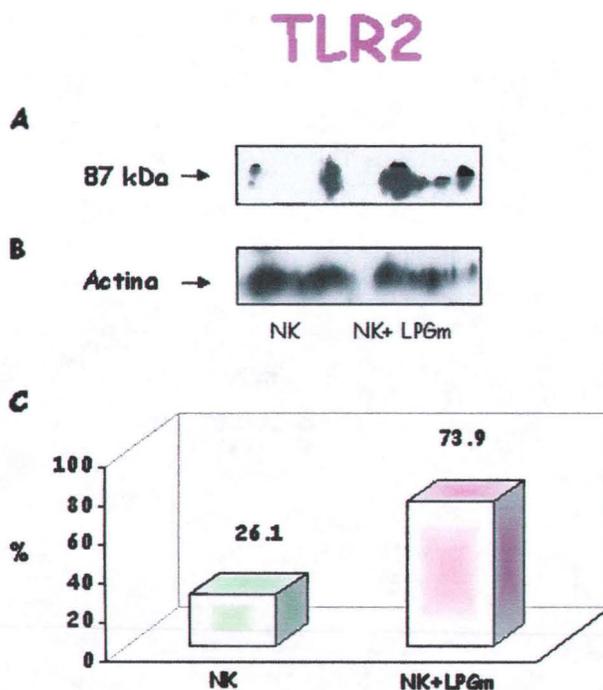


Fig. 1 Análisis del receptor TLR2 en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-TLR2 en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B) Control de carga (actina). (C) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-TLR2.

Análisis de la expresión de la proteína MyD88. En extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm se analizó por ensayos de Western-blot la presencia de la proteína adaptadora MyD88 utilizando un anticuerpo policlonal anti-MyD88. El anticuerpo anti-MyD88 reconoció en estos extractos celulares una molécula con un peso molecular de aproximadamente 37 kDa (Figura 2 A). El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-MyD88 se muestra en la figura 2 B, observándose la presencia de la proteína MyD88 en ambos extractos celulares y un ligero incremento en la expresión de MyD88 en las células estimuladas con LPGm.

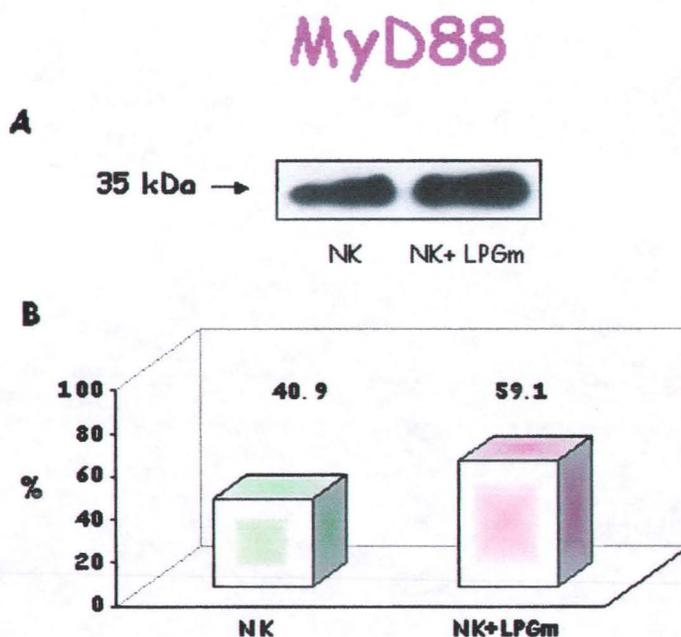


Fig. 2 Análisis de la proteína MyD88 en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-MyD88 en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-MyD88.

Análisis de la expresión de la proteína IRAK-1. Utilizando extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm se analizó por ensayos de Western-blot la presencia de la proteína IRAK-1 utilizando un anticuerpo policlonal anti-IRAK-1. El anticuerpo reconoció una molécula de aproximadamente 80 kDa (Figura 3 A). El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IRAK-1 se muestra en la figura 3 B, observándose la presencia similar de la proteína IRAK-1 en ambos extractos celulares: NK y NK estimuladas con LPGm.

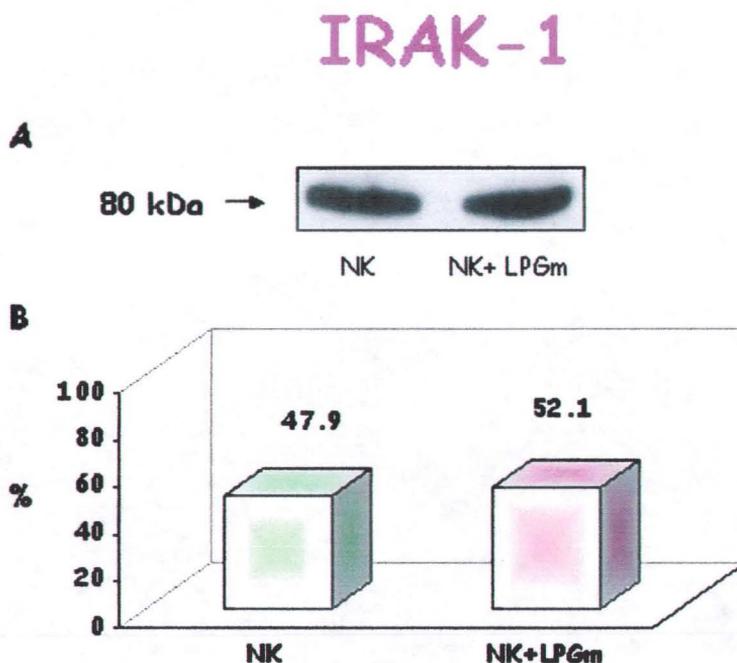


Fig. 3 Análisis de la proteína IRAK-1 en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-IRAK-1 en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IRAK-1.

Análisis de la expresión de la proteína TRAF-6. En extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm se analizó la presencia de la proteína adaptadora TRAF-6 por ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TRAF-6. El anticuerpo anti-TRAF-6 reconoció una molécula con un peso molecular de aproximadamente 60 kDa (Figura 4 A). El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-TRAF-6 se muestra en la figura 4 B, observándose un incremento en la expresión de la proteína TRAF-6 en los extractos de células NK estimuladas con LPGm.

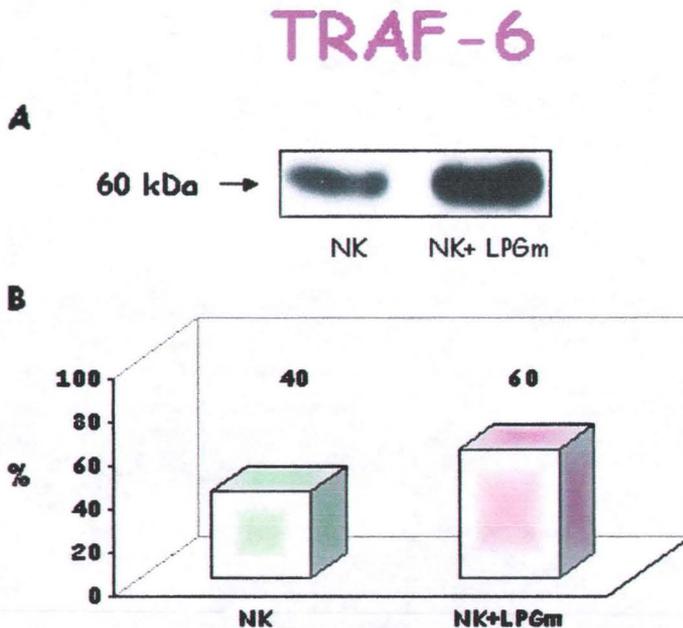


Fig. 4 Análisis de la proteína TRAF-6 en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-TRAF-6 en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-TRAF-6.

Análisis de la expresión de la proteína IKK- α . En extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm se analizó la presencia de la proteína IKK- α por ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-IKK- α . El anticuerpo utilizado reconoció una molécula de aproximadamente 81 kDa (Figura 5 A). El control de carga (actina) para este ensayo se muestra en la figura 5 B. El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IKK- α se muestran en la figura 5 C, observándose la presencia de la proteína IKK- α en los extractos de células NK y un incremento 2 veces mayor en células NK estimuladas con LPGm.

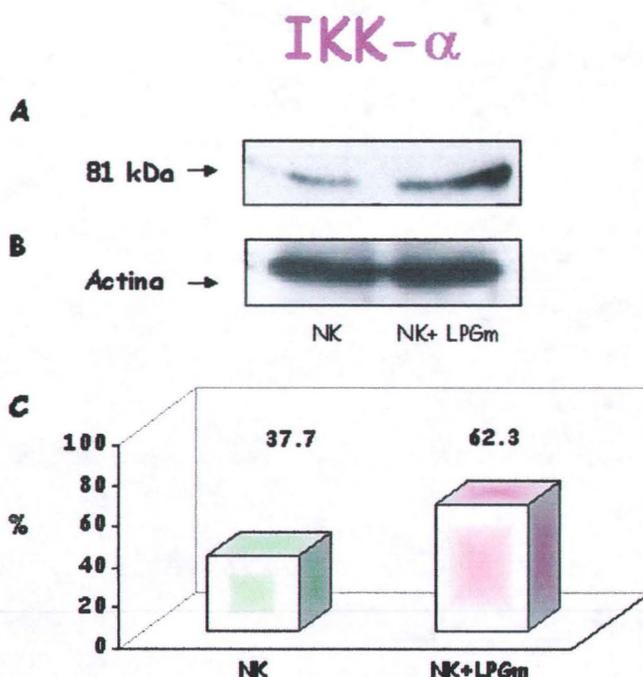


Fig. 5 Análisis de la proteína IKK- α en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-IKK- α en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B) Control de carga (actina). (C) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IKK- α .

Análisis de la expresión de la proteína IKK- β . En extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm se analizó por ensayos de Western-blot la presencia de la proteína IKK- β utilizando un anticuerpo policlonal anti-IKK- β . El anticuerpo reconoció en ambos extractos celulares una molécula con un peso molecular de aproximadamente 90 kDa (Figura 6 A). En la figura 6 B se muestra el control de carga de actina. El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IKK- β se muestra en la figura 6 C, observándose un ligero incremento en la expresión de la proteína IKK- β en células NK estimuladas con LPGm.

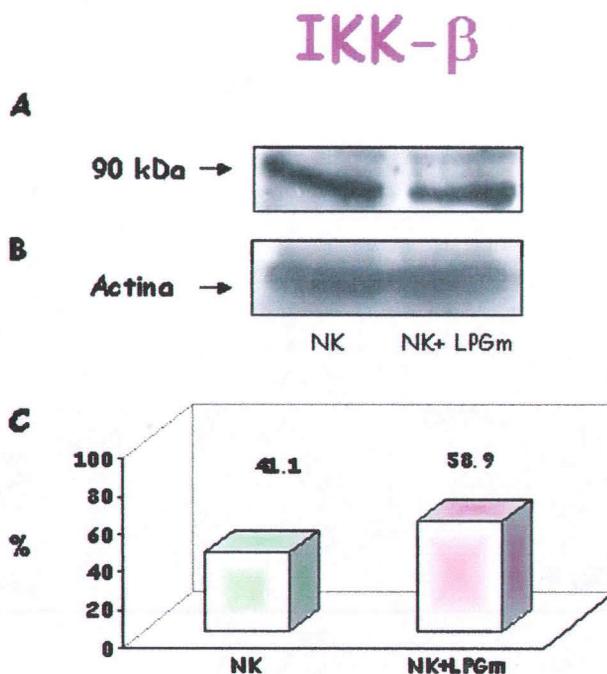


Fig. 6 Análisis de la proteína IKK- β en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-IKK- β en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B) Control de carga (actina). (C) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IKK- β .

Análisis de la expresión de la proteína IKK- γ . Se analizó por ensayos de Western-blot la presencia de la proteína IKK- γ (grupo NEMO) en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm utilizando un anticuerpo policlonal anti-IKK- γ . El anticuerpo anti-IKK- γ reconoció una molécula con un peso molecular de aproximadamente 45 kDa (Figura 7 A). El control de carga de este ensayo (actina) se muestra en la figura 7 B. El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IKK- γ se muestra en la figura 7 C, observándose la presencia de la proteína IKK- γ tanto en células NK como en NK estimuladas con LPGm.

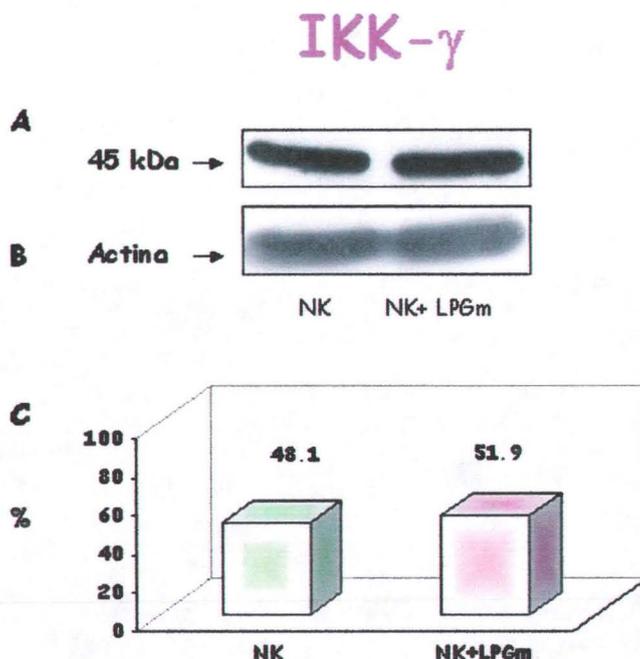


Fig. 7 Análisis de la proteína IKK- γ en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-IKK- γ en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B) Control de carga (actina). (C) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IKK- γ .

Análisis de la expresión de la proteína $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$. Por ensayos de Western-blot se analizó la presencia de la proteína $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm utilizando un anticuerpo policlonal anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$. El anticuerpo anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ reconoce una molécula de aproximadamente 37 kDa (Figura 8 A). El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ se muestra en la figura 8 B, observándose que la expresión de la proteína $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ incrementa cuando las células NK son estimuladas con LPGm.

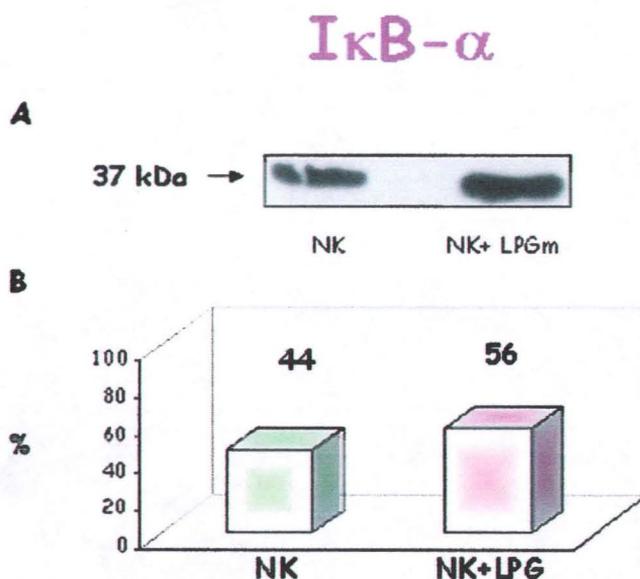


Fig. 8 Análisis de la proteína $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ en extractos de células NK.

Análisis de la expresión de la proteína I κ B- β . En extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm se analizó por ensayos de Western-blot la presencia de la proteína I κ B- β utilizando un anticuerpo policlonal anti-I κ B- β . El anticuerpo reconoció una molécula de un peso molecular de aproximadamente 45 kDa (Figura 9 A). El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-I κ B- β se muestra en la figura 9 B, observándose un incremento en la expresión de la proteína I κ B- β en células NK estimuladas con LPGm.

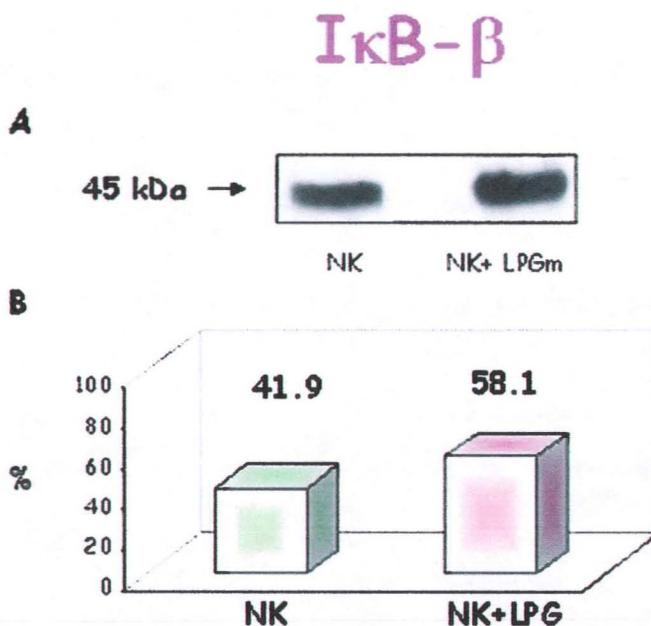


Fig. 9 Análisis de la proteína I κ B- β en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-I κ B- β en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-I κ B- β .

Análisis de la expresión de la proteína $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$. Se analizó por ensayos de Western-blot la presencia de la proteína $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm utilizando un anticuerpo policlonal anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$. El anticuerpo anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ reconoció una molécula de un peso molecular de entre 45-50 kDa (Figura 10 A). En la figura 10 B se muestra el análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$, observándose que la expresión de la proteína $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ disminuye en células NK estimuladas con LPGm.

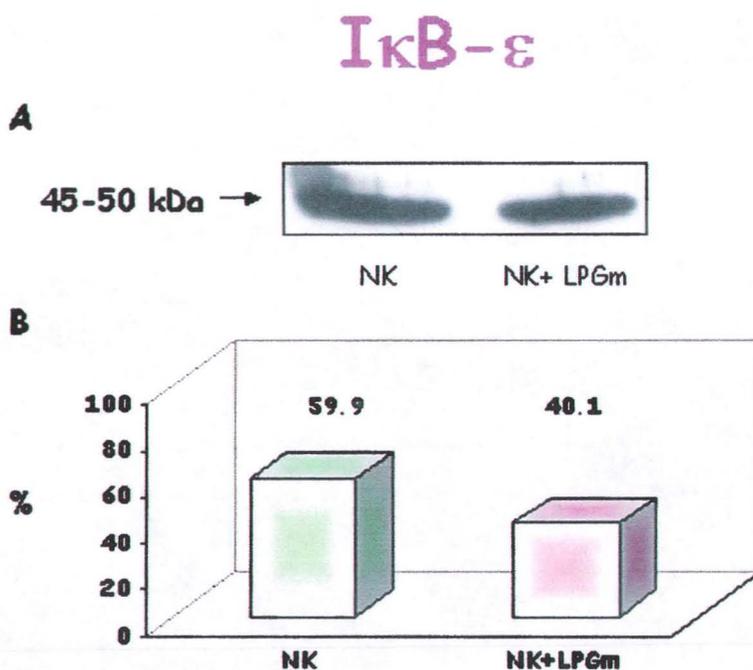


Fig. 10 Análisis de la proteína $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$ en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\epsilon$.

Análisis de la translocación nuclear de la proteína NF- κ B p50. Se analizó por ensayos de Western-blot la translocación al núcleo de la proteína NF- κ B p50 en extractos nucleares de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm utilizando un anticuerpo policlonal anti-NF- κ B p50. El anticuerpo anti-NF- κ B p50 reconoció una molécula de un peso molecular de 50 kDa (Figura 11 A). En la figura 11 B se muestra el análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo NF- κ B p50, observándose que la translocación al núcleo de la proteína NF- κ B p50 aumenta en células NK estimuladas con LPGm.

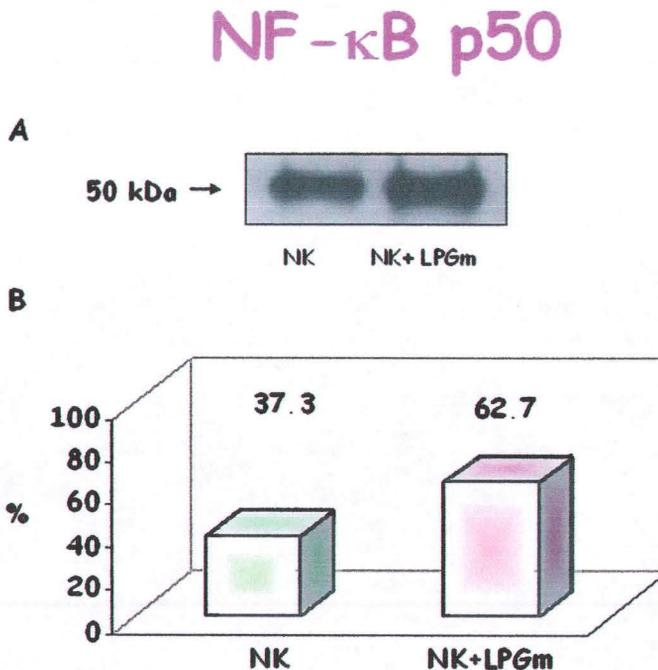


Fig. 11 Análisis de la proteína NF- κ B p50 en núcleos de células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-NF- κ B p50 en extractos nucleares de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti- NF- κ B p50.

Análisis de la translocación nuclear de la proteína NF- κ B p65. El análisis de la translocación al núcleo de la isoforma p65 del factor NF- κ B se realizó mediante ensayos de Western-blot en extractos nucleares de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm utilizando un anticuerpo policlonal anti-NF- κ B p65. El anticuerpo anti-NF- κ B p65 reconoció una molécula de un peso molecular de 65 kDa (Figura 12 A). En la figura 12 B se muestra el análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo NF- κ B p65, observándose que la translocación al núcleo de la proteína NF- κ B p65 aumenta ligeramente en las células NK estimuladas con LPGm.

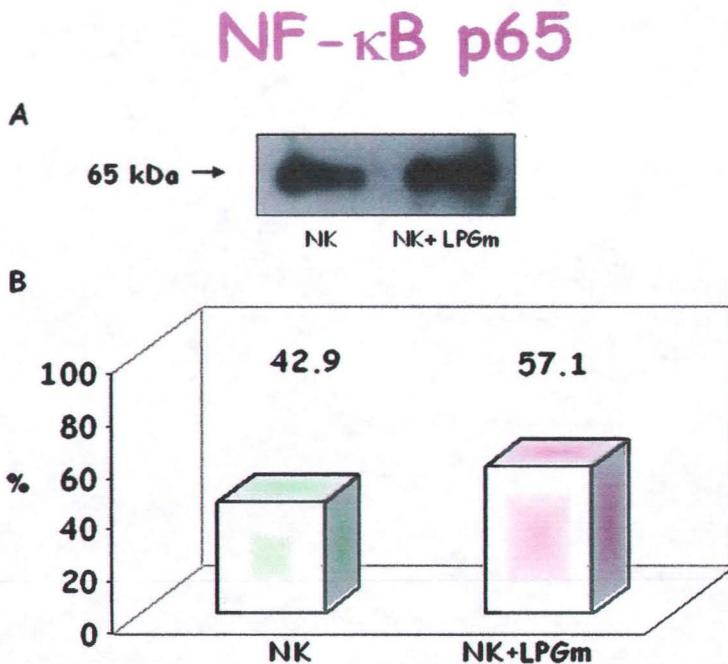


Fig. 12 Análisis de la proteína NF- κ B p50 en núcleos de células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-NF- κ B p65 en extractos nucleares de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti- NF- κ B p65.

6. 2 Análisis del acoplamiento de las moléculas que participan en la señalización a través del receptor TLR2.

Análisis del acoplamiento del receptor TLR2 y la proteína MyD88. Para analizar el acoplamiento del receptor TLR2 a la proteína MyD88, se inmunoprecitaron extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm utilizando un anticuerpo policlonal anti-MyD88 y los complejos inmunes se analizaron por ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-TLR2. El anticuerpo anti-TLR2 reconoce dos moléculas con diferente peso molecular, un complejo de 87 kDa que incrementa 3.2 veces mas en las células estimuladas con LPGm y otro complejo de 175 kDa donde se observa un incremento 5 veces mayor en las células que están estimuladas (Figura 13 A). El análisis densitométrico de las moléculas reconocidas por el anticuerpo anti-TLR2 se muestra en las figuras 13 B y 13 C. Estos datos revelan que la activación de células NK por LPGm lleva al acoplamiento de MyD88 al receptor TLR2.

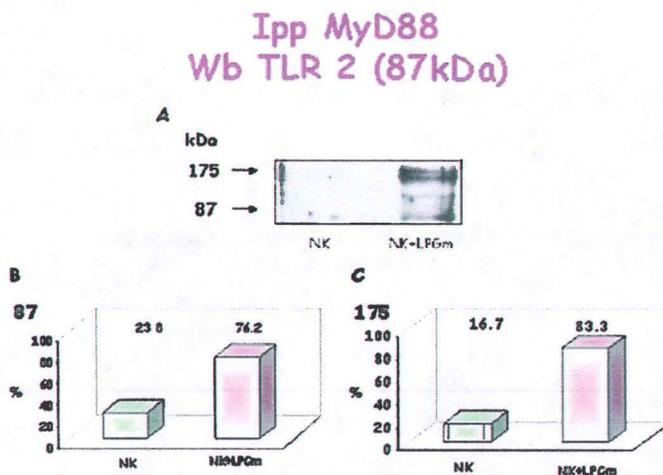


Fig. 13 Acoplamiento de la proteína MyD88 con el receptor TLR 2 en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-TLR2 en inmunoprecipitados realizados con el anticuerpo anti-MyD88 en extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm. (B y C) Análisis densitométrico de las moléculas reconocidas por el anticuerpo anti-TLR2. Ipp: Inmunoprecipitación. Wb: Western-blot.

Análisis del acoplamiento de las proteínas adaptadoras MyD88 e IRAK-1. Utilizando extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm se analizó el acoplamiento de la proteína MyD88 a la proteína IRAK-1. Se inmunoprecipitaron ambos extractos de células utilizando un anticuerpo policlonal anti-MyD88 y los complejos inmunes se analizaron por ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IRAK-1. El anticuerpo anti IRAK-1 reconoció un componente de aproximadamente 175 kDa (Figura 14 A). El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IRAK-1 se muestra en la figura 14 B, observándose un reconocimiento 11.5 veces más intenso en las células NK estimuladas con LPGm. Estos datos revelan que la activación de las células NK a través del receptor TLR2 induce un acoplamiento de IRAK-1 a la proteína MyD88.

Ipp MyD88 Wb IRAK-1 (80kDa)

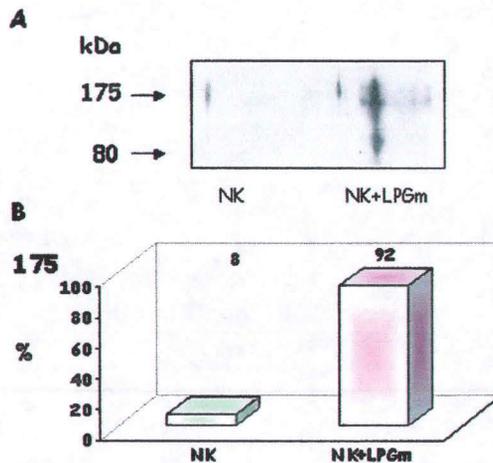


Fig. 14 Acoplamiento de la proteína MyD88 a la proteína IRAK-1 en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-IRAK-1 en inmunoprecipitados realizados con el anticuerpo anti-MyD88 en extractos de células NK y NK estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IRAK-1. Ipp: Inmunoprecipitación. Wb: Western-blot.

Análisis del acoplamiento de las proteínas adaptadoras MyD88 y TRAF-6. Para analizar el acoplamiento de la proteína MyD88 a la proteína TRAF-6, se inmunoprecipitaron extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm utilizando un anticuerpo policlonal anti-MyD88 y los complejos inmunes se analizaron por ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TRAF-6. El anticuerpo anti-TRAF-6 reconoció a una molécula en un peso molecular de aproximadamente 60 kDa (Figura 15 A). El análisis densitométrico de la molécula que reconoció el anticuerpo anti-TRAF-6 se muestra en la figura 15 B, observándose un incremento de 2.6 veces en el reconocimiento del anticuerpo en las células NK estimuladas con LPGm. Estos datos revelan que durante la activación del receptor TLR2 en células NK estimuladas con LPGm se asocian las moléculas MyD88, IRAK-1 y TRAF-6.

Ipp MyD88 Wb TRAF-6 (60kDa)

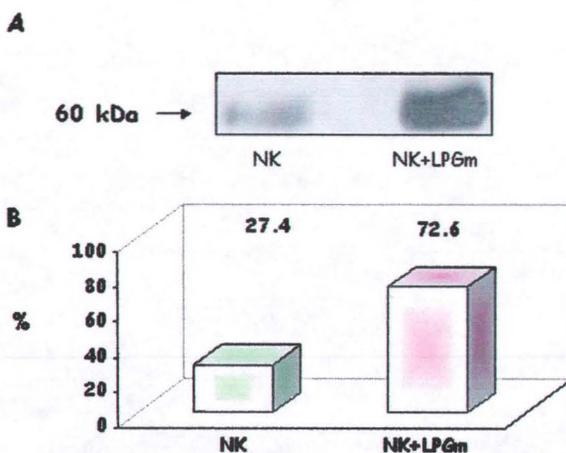


Fig. 15 Acoplamiento de la proteína MyD88 a la proteína TRAF-6 en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-TRAF-6 en inmunoprecipitados realizados con el anticuerpo anti-MyD88 en extractos de células NK y NK estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-TRAF-6. Ipp: Inmunoprecipitación. Wb: Western-blot.

Análisis del acoplamiento de la proteína adaptadora IRAK-1 a la proteína TRAF-6. EL análisis del acoplamiento de la proteína IRAK-1 a la proteína TRAF-6, se hizo por medio de un ensayo de inmunoprecipitación a partir de extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm, utilizando un anticuerpo policlonal anti-IRAK-1 para la inmunoprecipitación. Los complejos inmunes se analizaron por ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TRAF-6. El anticuerpo anti-TRAF-6 reconoce una molécula de aproximadamente 60 kDa (Figura 16 A). El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-TRAF-6 se muestra en la figura 16 B, observándose un reconocimiento 5 veces mayor por el anticuerpo anti-TRAF-6 en las células NK estimuladas con LPGm. Estos datos confirman las observaciones anteriores sobre la unión de TRAF-6 a IRAK-1 durante la activación de TLR2 con LPGm.

Ipp IRAK-1 Wb TRAF-6 (60kDa)

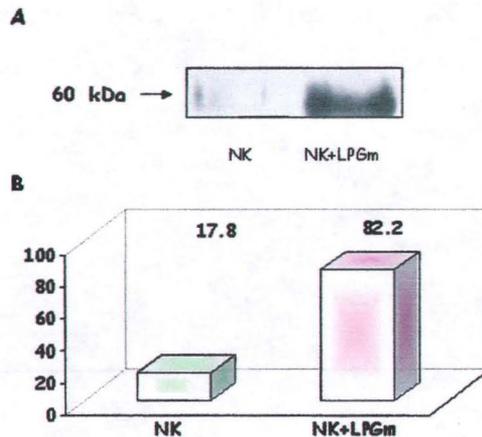


Fig. 16 Acoplamiento de la proteína IRAK-1 a la proteína TRAF-6 en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-TRAF-6 en inmunoprecipitados realizados con el anticuerpo anti-MyD88 en extractos de células NK y NK estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-TRAF-6. Ipp: Inmunoprecipitación. Wb: Western-blot.

Análisis del acoplamiento de la proteína TRAF-6 a la proteína IKK- γ (grupo NEMO).

Para analizar el acoplamiento de la proteína TRAF-6 a la proteína IKK- γ , se inmunoprecipitaron extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TRAF-6 y los complejos inmunes se analizaron por ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-IKK- γ . El anticuerpo anti-IKK- γ reconoció una molécula de aproximadamente 45 kDa (Figura 17 A) donde se puede observar que en las células estimuladas con LPGm el reconocimiento de IKK- γ disminuye ligeramente. El análisis densitométrico para la molécula reconocida por el anticuerpo se muestra en la figura 17 B.

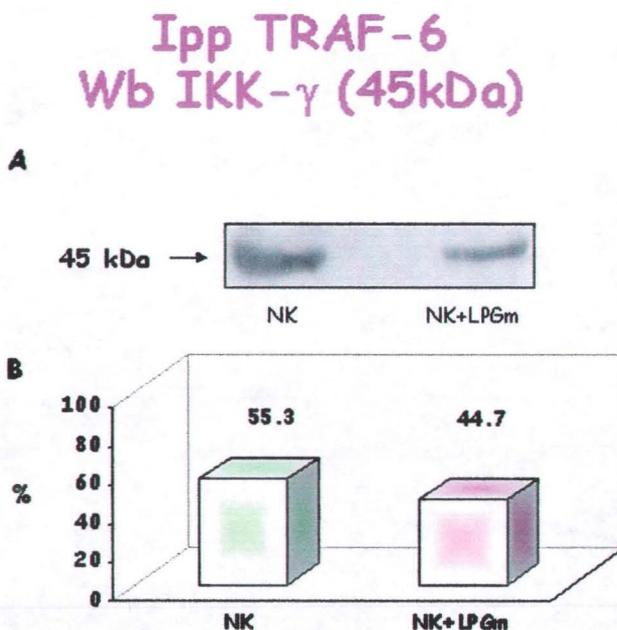


Fig. 17 Acoplamiento de la proteína TRAF-6 a la proteína IKK- γ en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-IKK- γ en inmunoprecipitados realizados con el anticuerpo anti-TRAF-6 en extractos de células NK y NK estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IKK- γ . Ipp: Inmunoprecipitación. Wb: Western-blot.

Co-inmunoprecipitación del receptor TLR 2 y la proteína IKK- α . Adicionalmente se logró co-inmunoprecipitar directamente el complejo TLR 2-IKK- α . Para ello, se inmunoprecipitaron extractos de células NK no estimuladas y NK estimuladas con LPGm utilizando un anticuerpo policlonal anti-TLR2 y los complejos inmunes se analizaron por ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-IKK- α . El anticuerpo anti-IKK- α reconoció únicamente una molécula de 70 kDa (Figura 18 A). El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IKK- α se muestra en la figura 18 B, observándose un aumento en el reconocimiento 4.8 veces mayor en células NK estimuladas con LPGm. Estos datos revelan que la activación de TLR2 por LPGm recluta a IKK- α , una cinasa que probablemente sea la responsable de fosforilar a moléculas de I κ B para la liberación de NF- κ B.

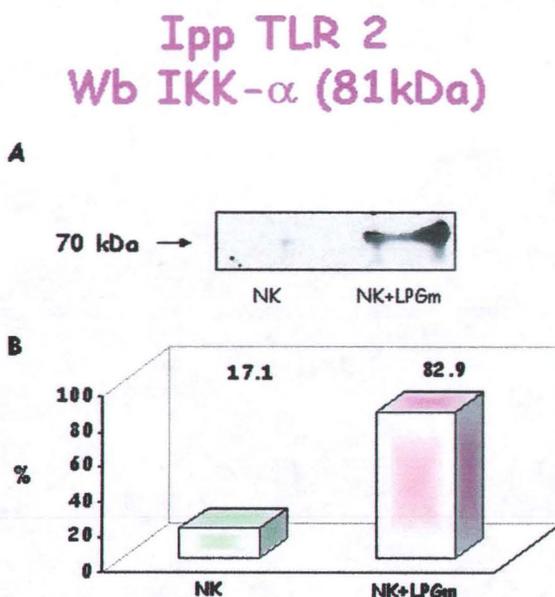


Fig. 18 Co-inmunoprecipitación del receptor TLR 2 y la proteína IKK- α en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti-IKK- α en inmunoprecipitados realizados con el anticuerpo anti-TLR 2 en extractos de células NK y NK estimuladas con LPGm (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-IKK- α . Ipp: Inmunoprecipitación. Wb: Western-blot.

Co-inmunoprecipitación del receptor TLR 2 y la proteína $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$. Adicionalmente se logro co-inmunoprecipitar directamente TLR2- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$. Se inmunoprecipitaron extractos de células NK no estimuladas y estimuladas con LPGm utilizando un anticuerpo policlonal anti-TLR2 y los complejos inmunes se analizaron por ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo policlonal anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$. El anticuerpo anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ reconoció una molécula de aproximadamente 30 kDa (Figura 19 A) solo en los extractos de células NK estimuladas con LPGm. El análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ se muestra en la figura 19 B. Los datos demuestran que la activación de TLR2 con LPG de *Leishmania major* induce un acoplamiento de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ al complejo del receptor TLR2.

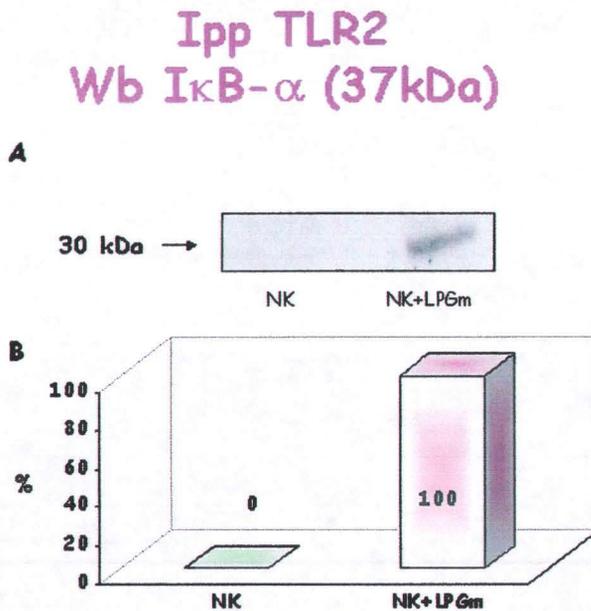


Fig. 19 Co-inmunoprecipitación del receptor TLR 2 y la proteína $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ en células NK. (A) Reconocimiento por el anticuerpo anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ en inmunoprecipitados realizados con el anticuerpo anti-TLR 2 en extractos de células NK y NK estimuladas con LPGm. (B) Análisis densitométrico de la molécula reconocida por el anticuerpo anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$. Ipp: Inmunoprecipitación. Wb: Western-blot.

VII. DISCUSIÓN

El reconocimiento de microorganismos patógenos está mediado por receptores conocidos como PRRs, los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Este reconocimiento trae consigo la activación de diferentes estirpes celulares a través de la transducción de señales que llevan a la síntesis de proteínas como: citocinas y quimiocinas que actúan sobre otras células activándolas o inactivándolas y despertando así una respuesta inmune con el fin de eliminar microorganismos patógenos que infectan a las células ⁽³⁰⁾.

Es bien conocido que TLR2 es un PRR que se estimula al reconocer PAMPs como: peptidoglicanos, lipoproteínas, lipoarabinomananos, lipopéptidos y lipofosfoglicanos (LPG) ^(23, 33, 35), desencadenando la inducción de una cascada de señalización donde participan moléculas como: MyD88, IRAK, TRAF-6, NIK e IKK hasta llegar a la activación de factores de transcripción como lo es: NF- κ B ⁽³⁶⁾.

Se ha reportado que LPG de *Leishmania major* induce una activación en células NK a través del receptor TLR2, induciendo la translocación de NF κ B al núcleo de estas células, además de inducir la secreción de citocinas como: TNF- α e IFN- γ ⁽²³⁾. Estudios posteriores revelaron que la molécula MyD88 participa en la vía de señalización del TLR2 durante la infección por *Leishmania* ⁽⁵¹⁾. Sin embargo aun no se conoce la vía completa de señalización que participa durante la activación de TLR2 con LPG.

Los resultados obtenidos en los ensayos de Western-blot que se realizaron para verificar la expresión de las moléculas de interés, muestran la presencia de cada una de las moléculas en estas células, además de un incremento en su expresión cuando se estimuló con LPGm, a excepción de la proteína I κ B- ϵ donde se observa un decremento de esta proteína en las células estimuladas con la molécula del parásito. Así mismo el análisis de las isoformas p50 y p65 de NF κ B muestra un aumento en la translocación al núcleo en células NK estimuladas con LPG.

En este trabajo analizamos la vía de señalización que participa en la activación de TLR2 por LPG de promastigotes metacíclicos de *Leishmania major*. Mediante inmunoprecipitaciones analizamos las distintas moléculas de la vía de señalización que se unen durante la activación del receptor TLR2. Al inmunoprecipitar con anti-MyD88 y revelar con anti-TLR2 se observaron dos moléculas de distinto peso molecular, una en 87 kDa correspondiente al reconocimiento del receptor TLR2 y un componente en 175 kDa, el cual también había sido reportado por Becker y cols. en su trabajo de activación de TLR2 por LPG. Estos autores proponen que el complejo de 175 kDa pudiera representar la unión del receptor TLR2 a 3 moléculas de LPGm⁽²³⁾ y que el tipo de unión que se genera entre LPG y TLR2 resiste las condiciones reductoras que se manejan en los ensayos de Western blot. Este componente de 175 kDa también fue observado en nuestro análisis del acoplamiento de las proteínas MyD88 a IRAK-1.

Llama la atención que la unión entre dos moléculas adaptadoras de la vía de señalización de TLR2 sea parecida a la unión encontrada entre TLR2 y su ligando. El análisis densitométrico reveló que este complejo incrementa 11.5 veces en células estimuladas con LPGm. Por lo cual sugerimos que pueda existir la formación de un complejo entre proteínas adaptadoras como MyD88-IRAK-1 y TRAF-6 en el momento en que se estimula el TLR2 de células NK. Debido a que las condiciones desnaturizantes utilizadas en los ensayos de Western blot aparentemente no son lo suficientemente efectivas para disociar las moléculas que se asocian a TLR2 durante su unión con LPG, así como entre las moléculas de señalización que participan, proponemos el uso de altas concentraciones de sales que permitirían disociar los complejos que se formen entre las distintas moléculas y así poder analizar la presencia individual de las proteínas asociadas a la activación de TLR2. Una alternativa que se consideró al analizar los resultados obtenidos fue el hecho de que los anticuerpos utilizados son policlonales y reconocen diversos epítopes, lo que hace pensar que el reconocimiento de diversas moléculas en un mismo ensayo se deba a que, si bien se forman complejos entre moléculas estas compartan epítopes.

Otra posibilidad para explicar el fenómeno observado en los ensayos anteriores es que el peso de la molécula observada se deba a la asociación de dos TLRs, ya que está reportado que el TLR2 puede formar dímeros con TLR1, TLR6 o algún TLR no identificado ⁽³⁴⁾. Y como ya se comentó si las condiciones desnaturalizantes en el ensayo de Western-blot no son suficientes para disociar esta dimerización esta sería la posible causa de observar este resultado.

El análisis del acoplamiento de la proteína adaptadora IRAK-1 a TRAF-6 y TRAF-6 a MyD88, reveló un componente con el peso molecular esperado (60kDa). El estímulo de las células NK con LPG incrementó 5 veces la presencia de TRAF-6 asociado a IRAK-1 e incrementó 2.5 veces la unión de TRAF-6 a MyD88. Estos resultados coinciden con datos reportados en la literatura sobre la presencia de estas moléculas en la vía de señalización del TLR2 en células estimuladas con peptidoglicanos de bacterias Gram-positivas ⁽⁵¹⁾.

El ensayo que nos confirmó que el señalosoma también participa en esta activación, fue el análisis del acoplamiento de la proteína TRAF-6 con el grupo NEMO (IKK- γ). Sin embargo, a diferencia de los datos anteriores, el estímulo de células NK con LPGm redujo ligeramente la unión entre TRAF-6 y NEMO. Esto puede ser debido a que TRAF-6 no sea la molécula que activa directamente a esta proteína ^(36, 44), o bien a que el tiempo de estimulación de las células fue demasiado prolongada (una hora) para lograr observar aquellas moléculas que se acoplaron durante la estimulación y estas empiezan a ser degradadas después de la fosforilación de sus proteínas blanco como podrían ser las I κ Bs ^(47, 49). Las dos isoformas restantes que conforman el complejo IKK (IKK- α e IKK- β) no fueron analizadas, debido a que existen reportes en donde se confirma que cada una de estas moléculas es esencial para la formación y buen funcionamiento de este complejo ^(49, 50). En un ensayo posterior demostramos la participación IKK- α en esta vía mediante su co-precipitación con TLR2.

Como ya se mencionó, se logró analizar directamente la unión TLR2-IKK- α , la cual aumenta 4.8 veces con el estímulo de las células NK con LPGm. En este caso el peso

molecular de la molécula fue de 70 kDa. Sin embargo, el peso reportado es de 81 kDa. Se sabe que después de fosforilar las proteínas sufren degradación por proteosoma y tal vez el peso en que encontramos a IKK- α pueda ser debido a que la proteína iniciaba a ser degradada. El incremento importante en la expresión de esta proteína en las células estimuladas, posiblemente se relacione con la fosforilación de proteínas IKK- α en el momento en que se desencadenó la transducción de señales. Este dato nos llamó la atención debido a que el receptor está en membrana y la proteína IKK- α es una molécula que se encuentra muy abajo en esta vía de activación. Debido a que desconocemos el tipo de unión que se forma entre las distintas moléculas que participan en la activación de TLR2 con LPGm en estas células, pensamos que en el momento en que se inmunoprecipitaron los complejos en los extractos de células NK se logra atrapar a algunas moléculas involucradas en esta activación como lo es IKK- α .

El mismo fenómeno se presentó cuando se co-inmunoprecipitó el receptor TLR2 y la proteína I κ B- α , encontrando solamente su expresión en células NK estimuladas con LPGm, y en un peso molecular de 30 kDa (el peso reportado es de 37 kDa). Inicialmente no esperábamos encontrar a la proteína I κ B- α en los extractos de células NK estimuladas con LPGm debido a que esta proteína tiene que ser fosforilada y ubiquitinada para que NF- κ B se transloque al núcleo de la célula y se una a su región consenso de ADN ^(36, 49, 50). Sugerimos que tal vez la expresión de esta molécula no corresponda a la que se fosforiló en el momento de la activación de las células y que se trate de moléculas provenientes de una síntesis de novo, debido a que las células estuvieron estimuladas durante una hora, tiempo suficiente para que se generaran nuevas moléculas de I κ B- α y se degradaran las primeras que tenían secuestrado a NF- κ B en estado basal.

Hay evidencias que indican que durante la producción de citocinas por algunos tipos celulares en respuesta a infecciones fúngicas, receptores como TLR2 y 6 son reclutados en fagosomas⁽⁵⁵⁾, lo que nos permite sugerir que el resultado observado en las co-inmunoprecipitaciones con TLR2-IKK- α y TLR2-I κ B- α pueda deberse a que TLR2 al activarse con algún estímulo externo también desencadena una vía de

señalización desde el fagolisosoma sin tener que activas proteínas adaptadoras, y activando proteínas presentes río abajo en la vía de señalización como lo son: IKK- α e I κ B- α .

Este es el primer trabajo en donde se analiza la vía de señalización del receptor TLR2 activado por LPGm de *Leishmania major* metacíclico en células NK, por medio de ensayos de inmunoprecipitación.

Nuestros datos confirman que LPGm de *Leishmania* induce una vía de transducción de señales dependiente de TLR2 similar a la inducida por LPS y peptidoglicanos que involucra a moléculas como: MyD88, IRAK-1, TRAF-6, IKK- γ , I κ B- α y NF κ B.

Encontramos que al receptor TLR2 se le acopla MyD88 y a su vez esta molécula se une a IRAK-1 y TRAF-6, las tres, conocidas como moléculas reclutadoras de proteínas ⁽⁴⁴⁾. Se encontró que IKK- γ e I κ B- α están presentes en esta vía al inmunoprecipitarlas con el receptor TLR2.

Con los datos obtenidos en este trabajo proponemos una vía de señalización por TLR2 en células NK estimuladas con LPGm de *Leishmania major* (Figura 20). Esta vía de señalización incluye inicialmente el reconocimiento de LPG por TLR2 como se demostró previamente (Becker, 2003), seguido de la formación de un complejo entre las proteínas adaptadoras MyD88-TRAF-6, MyD88-IRAK-1 e IRAK-1-TRAF-6. Posteriormente la activación y participación del señalosoma (IKK α , IKK β e IKK γ), así como isoformas de la proteína inhibidora de κ B, dando como resultado la translocación nuclear de las isoformas p50 y p65 del factor de transcripción nuclear NF- κ B.

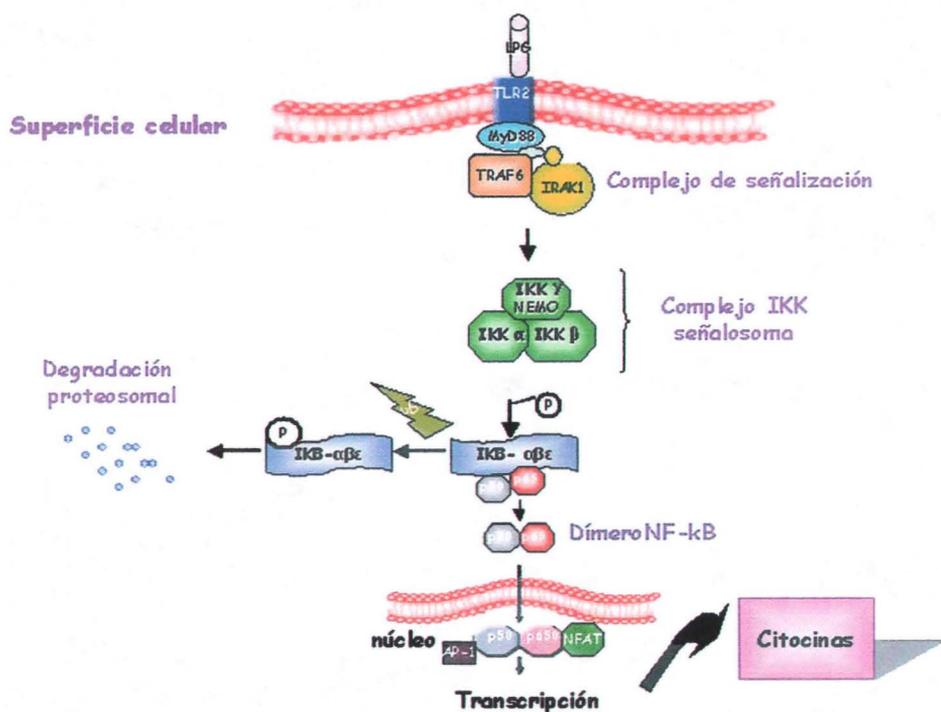


Fig. 20 Vía de señalización propuesta para la activación de células NK a través del TLR2 activadas con LPGM de *Leishmania major*.

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que la señalización inducida por el lipofosfoglicano de *Leishmania major* metacíclico en células NK vía TLR2 es semejante a la inducida por los PAMPs de otros microorganismos en tipos celulares diferentes.

IX. PERSPECTIVAS

Resulta interesante investigar si existen diferencias en esta vía de señalización en células NK de pacientes con diferentes formas clínicas de leishmaniasis estimuladas con el lipofosfoglicano de *Leishmania*, como posible causa de la diseminación de la enfermedad.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Späth, G., Epstein, L., Leader, B., Singer, S., Avila, H., Turco, S. & Beverley, S. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97, 9258-63.
2. Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J. & Ortiz-Ortiz, L. (2002). How protozoan parasites evade the immune response. Trends Parasitol. 18, 272-78.
3. Grevelink, S. & Lerner, E. (1996). Leishmaniasis. J. Am. Acad. Dermatol. 34, 257-72.
4. INDRE. Velasco, O. La leishmaniasis con especial referencia a México. Colección de cuadernos del INDRE. 1994. SSA. México. p.p. 1-28.
5. Sacks, D. & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu. Rev. Microbiol. 55, 453-83.
6. Mbow, M., Bleyenbergh, J., Hall, L. & Titus, R. (1998). *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. J. Immunol. 161, 5571-77.
7. Soares, R., Macedo, M., Ropert, C., Gontijo, N., Almeida, I., Gazzinelli, R., Pimenta, P. & Turco, S. (2002). *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. Mol. & Biochem. Parasitol. 121, 213-24.
8. Sacks, D. & Noben, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nature Rev. 2, 845-57.
9. Dowlati, Y. (1996). Cutaneous leishmaniasis: Clinical aspects. Clin. Dermatol. 14, 471-78.
10. Lohouis, P., Lipovsky, M. & Hoepelman, A. (1997). *Leishmania braziliensis* presenting as a granulomatous lesion of the nasal septum mucosa. J. Laryngol. Otol. 111, 973-75.
11. Späth, G., Garraway, L., Turco, S. & Beverley, S. (2003). The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100, 9536-41.
12. Pascal, S., Rosat, J., Louis, J. & Bordier, C. (1992). *Leishmania major* : differential regulation of the surface metalloprotease in amastigotes and promastigotes stages. Exp. Parasitol. 75, 196-206.

13. Ponte, A., Heise, D. & Moll, H. (2001). *Leishmania major* lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. *Immunology*. 104, 462-67.
14. Frankenburg, S., Leibovivi, V., Mansbach, N., Turco, S. & Rosen, G. (1990). Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan. *J. Immunol.* 145, 4284-89.
15. Teixeira, M., Almeida, I. & Gazzinelli, R. (2002). Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect. Rev.* 4, 883-6.
16. Abbas, A., Litchman, A. & Pober, J. *Inmunología celular y molecular*. Mc Graw-Hill Interamericana. 2002. 3ra ed. México.
17. Janeway, Ch., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik. *Immunobiology*. Garland Publishing. 2001. New York. p.p. 732.
18. Akira, S. & Hemmi, H. (2002). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett. Rev.* 85, 85-95.
19. Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M., Biassoni, R. & Moretta, L. (2002). What is a natural killer cell? *Nature Immunol.* 3, 6-8.
20. Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M., & Moretta, A. (2002). Natural killer cells: A mystery no more. *Scand. J. Immunol.* 55, 229-232.
21. Orange, J., Fassett, M., Koopman, L., Boyson, J. & Strominger, J. (2002). Viral evasion of natural killer cells. *Nature Immunol. Rev.* 3, 1006-12.
22. Ezekowitz, R. & Hoffmann, J. *Innate Immunity*. Human Press. 2003. New Jersey. p.p. 321-39.
23. Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo, N., Gutiérrez, L., Ruiz, A., Cervantes, R., Pérez, A., Cabrera, N., González, A., Maldonado, C. & Isibasi, A. (2003). *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Bioch. Parasitol.* 130,1-10.
24. Nylén, S., Maasho, K., Söderström, K. & Akuffo, H. (2003). Live *Leishmania* promastigotes can activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol.* 131, 457-67.
25. Massho, K., Sánchez, F., Schurr, E., Hailu, A. & Akuffo, H. (1998). Indications of the protective role of Natural Killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an Area of Endemicity. *Infec. Immunity.* 66, 2698-2704.

26. Biassoni, R., Cantoni, C., Falco, M., Pende D., Millo, R., Moretta, L., Bottino, C. & Moretta, A. (2000). Human natural killer cell activating receptors. *Mol. Immunol.* 37, 1015-24.
27. Lanier, L. (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Curr. Op. Immunol.* 15, 308-14.
28. Harju, K., Glumoff, V. & Hallman, M. (2000). Ontogeny of Toll-like receptors TLR 2 and TLR 4 in mice. *Pediatric Res.* 49, 81-83.
29. Anderson, K. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Op. Immunol.* 12, 13-19.
30. Lemaitre, B. (2004). The road to Toll. *Nature Immunol. Rev.* 4, 521-27.
31. Bell, J., Mullen, G., Leifer, C., Mazzone, A., Davies, D. & Segal, D. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 24, 528-33.
32. Beutler, B., Hoebe, K., Du, X. & Ulevitch, R. (2003). How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J. Leuk. Biol.* 74, 479-85.
33. Akira, S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Curr. Op. Immunol.* 15, 5-11.
34. Yamamoto, M., Takeda, K. & Akira, S. (2003). TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.* 40, 861-68.
35. Takeuchi, O. & Akira, S. (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.* 1, 625-35.
36. Wang, Q., Dziarski, R., Kirschning, C., Muzio, M. & Gupta, D. (2001). Micrococci and Peptidoglycan activate TLR2-MyD88-IRAK-TRAF-NIK-IKK-NF- κ B. Signal transduction pathway that induces transcription of Interleukin-8. *Inf. Immunity.* 69, 2270-76.
37. Arbibe, L., Mira, J., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman N., Godowski, P., Ulevitch, R. & Knaus, U. (2000). Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac-1- dependent pathway. *Nature Immunol.* 1, 533-40.
38. Aliprantis, A., Yang, R., Weiss, D., Godowski, P. & Zychlinsky. (2000). The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *Eur. Mol. Biol. Org.* 19, 3325-36.

39. Goldstein, D., Tesar, B., Akira, S. & Lakkis, F. (2003). Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J. Clin. Inv.* 111, 1571-78.
40. Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J., Di Marco, F., French, L. & Tschopp, J. (1998). MyD88, an adaptor protein involved in Interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 12203-209.
41. Janssens, S., Burns, K., Vercammen, E., Tschopp, J. & Beyaert, R. (2003). MyD88, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF- κ B and AP-1-dependent gene expression. *FEBS Letters.* 548, 103-107.
42. Sato, S., Takeuchi, O., Fujita, T., Tomizawa, H., Takeda, K. & Akira, S. (2002). A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *J. Soc. Immunol.* 14, 783-91.
43. Takeda, K. & Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Sem. Immunol.* 16, 3-9.
44. Janssens, S. & Beyaert, R. (2003). Functional diversity and regulation of different Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol. Cell Rev.* 11, 293-302.
45. Luftig, M., Prinarakis, E., Yasui, T., Tschritzis, T., Cahir-McFarland, E., Inoue, J., Nakano, H., Mak, T., Yeh, W., Li, X., Akira, S., Suzuki, N., Suzuki, S., Mosialos, G. & Kieff, E. (2003). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of NF- κ B through IRAK1 and TRAF6. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100, 15595-600.
46. Greene, C. & O'Neill, L. (1999). Interleukin-1 receptor-associated kinase and TRAF-6 mediate the transcriptional regulation of interleukin-2 by interleukin-1 via NF κ B but unlike interleukin-1 unable to stabilize interleukin-2 mRNA. *Bioch. Bioph.* 1451, 109-121.
47. Yamamoto, Y., Kim, D., Kwak, Y., Prajapati, S. & Verma, U. (2001). IKK γ /NEMO facilitates the recruitment of the I κ B proteins into the I κ B kinase complex. *J. Biol. Chem.* 276, 36327-336.
48. Orange, J. & Geha, R. (2003). Finding NEMO: genetic disorders of NF- κ B activation. *J. Clin. Inv.* 112, 983-85.
49. Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F., Kröhn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. & Karin, M. (2001). Activation by IKK- α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science.* 293, 1495-99.

50. Li, X., Massa, P., Hanidu, A., Peet, G., Aro, P., Savitt, A., Mische, s., Li, J. & Marcu, K. (2002). IKK- α , IKK- β and NEMO/ IKK- γ are each required for the NF- κ B-mediated inflammatory response program. *J. Biol. Chem.* 277, 45129-140.
51. De Veer, M., Curtis, J., Baldwin, T., DiDonato, J., Sexton, A., McConville, J., Handman, E. & Schofield, L. (2003). MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* 33, 2822-31.
52. Takeda, K & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14.
53. Korbil, D., Finney, O. & Riley, E. (2004). Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int. J. Parasitol.* 34, 1517-28.
54. Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. & Beutler, B. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101, 3516-21.
55. Underhill, D. & Gantner, B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microb. Inf.* 6, 1368-73.
56. Martin, M. & Wesche, H. (2002). Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Bioch. Bioph. Acta.* 1592, 265-80.
57. Silverman, N. & Maniatis, T. (2001). NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Develop.* 15, 2321-42.
58. López-Bojorquez, L. (2004). La regulación del factor de transcripción NF- κ B. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Revista de Investigación clínica.* 56, 83-92.

APÉNDICE

| Soluciones | |
|--|-------------|
| Acrilamida: Bis- Acrilamida | |
| Acrilamida | 29.2 g |
| Bis-Acrilamida | 0.8 g |
| Azul de Coomassie (disolver toda la noche) | |
| Etanol 95% | 500 ml |
| Ácido acético glacial | 100 ml |
| Agua desionizada | 400 ml |
| Azul brillante R- 250 | 2.0 g |
| Amortiguador de Corrida 10 X pH 8.3 | |
| Tris(25 mM) | 30.3 g |
| Glicina(190mM) | 144 g |
| SDS (0.1%) | 10 g |
| Gel concentrador | |
| Tris 0.5 M pH 6.8 | 750 μ l |
| dH ₂ O | 1.75 ml |
| Bis-acrilamida | 500 μ l |
| Persulfato de amonio | 40 μ l |
| Temed | 2 μ l |

| | | | |
|----------------------------------|------------|------------|------------|
| Gel separador | 10% | 12% | 15% |
| Tris 1.5 M pH 8.8 | 2.5 ml | 2.5 ml | 2.5 ml |
| dH ₂ O | 4.2 μl | 3.6 ml | 2.6 ml |
| Bis-acrilamida | 3.3 ml | 3.9 ml | 4.9 ml |
| Persulfato de amonio al 10%. | 100 μl | 100 μl | 100 μl |
| Temed | 5 μl | 5 μl | 5 μl |
| PBS 1X | | | |
| NaCl | 8.0g | | |
| KCl | 0.2g | | |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.15g | | |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2g | | |
| Agua bidestilada | | | |
| Solución desteñidora | | | |
| Agua desionizada | 1250 ml | | |
| Ácido acético | 250 ml | | |
| Metanol | 1000 ml | | |
| Solución de transferencia | | | |
| Tris-Glicina 10X | 100 ml | | |
| Metanol | 200 ml | | |
| dH ₂ O | 700ml | | |

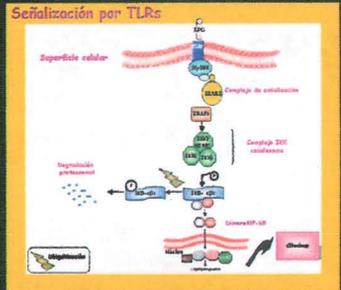
| Reactivos, aparatos y material. | |
|--|--|
| Marca | Producto |
| SIGMA | Orthovanadato de sodio Aprotinina Leupeptina Benzamidina 2-mercaptoetanol BSA |

| | |
|------------|---|
| | Azul Brillante R- 250 EDTA |
| BIORAD | Acrilamida Bis-acrilamida Bradford Marcadores de peso molecular Temed |
| BIOLABS | Marcadores de alto peso molecular |
| KODAK | Revelador Fijador Films |
| PIERCE | Sustrato para quimioluminiscencia |
| OHAUS | Balanza analítica |
| NUAIRE | Campana de flujo laminar |
| BIORAD | Cámara de electroforésis Fuente de poder |
| BECKMAN | Centrifuga |
| EPPENDORF | Ultracentrífuga 5417 R |
| BIO-TEK | Lector de Elisa |
| EPPENDORF | Micropipetas |
| BECKMAN | Potenciometro |
| LABINCO | Agitador magnético |
| THERMOLYNE | Vortex |
| SCIENCE | Congelador de -70°C |

| | | |
|-----------------------------|---|---------|
| SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY | α -TLR2 | sc10739 |
| | α -MyD88 | sc11356 |
| | α -IRAK-1 | sc7883 |
| | α -TRAF-6 | sc8409 |
| | α -IKK- α | sc7182 |
| | α -IKK- β | sc7330 |
| | α -IKK- γ | sc8330 |
| | α -I κ B- α | sc203 |
| | α -I κ B- β | sc945 |
| | α -I κ B- ϵ | sc7156 |
| | α -actina | sc1616 |
| | α -NF- κ Bp65 | sc372 |
| | α -NF- κ Bp50 | sc7178 |
| ZYMED | HRP cabra α -ratón 81-6520 conjugado con peroxidasa | |
| BIOMEDA | HRP α -cabra E25 | |
| | HRP α -conejo E22 conjugados con peroxidasa | |
| OZAUS | Microscopio óptico | |
| MILTENGY BIOTEC | Kit de aislamiento para células NK Columnas de separación LS | |
| MILLIPORE | Papel de immobillon-PVDF | |

ANÁLISIS DE LAS MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DEL RECEPTOR TLR2 ACTIVADO POR LIPOFOSFOGLICANO (LPG) DE LEISHMANIA MAJOR EN CÉLULAS NK

FERNÁNDEZ-FIGUEROA E., SALAZA N. CAÑEDA C., BERZUNZA M., BECKER I., AGUIRRE GARCÍA M. DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL FACULTAD DE MEDICINA UNAM, MÉXICO, D.F.

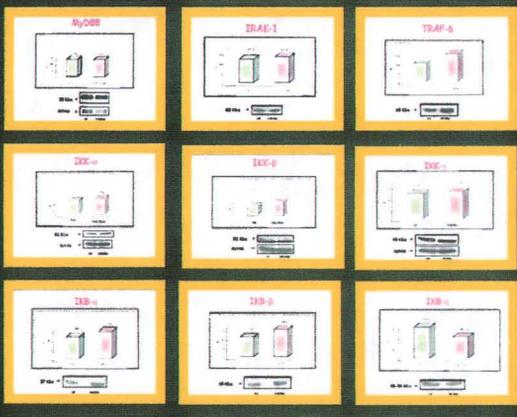


INTRODUCCIÓN

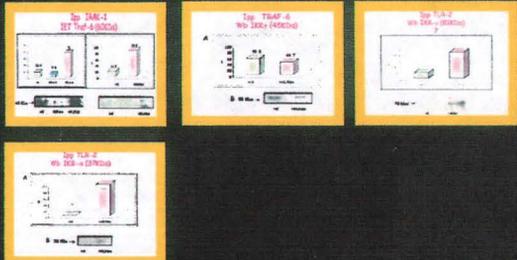
El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra la invasión de microorganismos. Los receptores TLRs forman parte de esta defensa innata reconociendo patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como peptidoglicanos, y lipopeptidos de microorganismos patógenos. La activación de estos receptores representa un componente clave en la transducción de señales que finaliza en la translocación al núcleo de factores de transcripción como NF- κ B. Por otro lado se han reportado dos vías de señalización a través de TLR2 que pueden ser dependiente e independiente de MyD88. El parásito intracelular *Leishmania major* está cubierto en su superficie por un glicocalix denso de diversas moléculas entre las que se encuentra el lipofosfoglicano (LPG), que ha sido relacionado con la sobrevivencia de *Leishmania* dentro del vector, LPG también participa en la regulación de la adhesión, invasión celular y en la resistencia a la lisis por complemento. Recientemente nuestro grupo reportó que LPG de *L. major* metacíclico (fase infectiva) activa células NK a través del receptor TLR2 induciendo la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo es conocer si LPGm induce a través de TLR2 una cascada de señalización semejante a la ya reportada para otros PAMPs. Nosotros analizamos presencia de moléculas como TLR2, MyD88, IRAK1, TRAF6, IKK α , IKK β , IKK γ , I κ B α e I κ B β en un extracto total de células NK y NK estimuladas con LPGm por Western-blot. Una vez confirmada la presencia de estas moléculas se analizó el acoplamiento de cada una de las moléculas por ensayos de inmunoprecipitación. Encontramos la unión de: TLR2-MyD88, MyD88-IRAK1, IRAK1-TRAF6, TRAF6-IKK α . Adicionalmente logramos coprecipita directamente TLR2-IKK α y TLR2-IKB β . Apoyado por los proyectos DGAPA In231602, DGAPA In210602 CONACYT 37538M.

RESULTADOS

Análisis de las moléculas por Western-blot



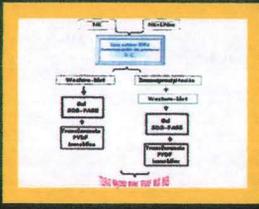
Análisis del acoplamiento de moléculas por inmunoprecipitación



OBJETIVO GENERAL

Analizar las moléculas que están participando en la transducción de señales dada por TLR2 en células NK estimuladas con LPGm.

METODOLOGÍA



CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que la señalización inducida por LPG de *L. major* metacíclico en células NK vía TLR2 es dependiente de MyD88, es semejante a la reportada para PAMPs de otros microorganismos patógenos y que esta señalización induce el incremento en la expresión de las moléculas de señalización tendiendo a ser mayor en células NK estimuladas con LPGm de *L. major*. Resulta interesante investigar el efecto que ejerce LPG de *Leishmania* sobre las vías de señalización en células NK de pacientes con diferentes formas clínicas de Leishmaniasis.