



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PARTICIPACIÓN DE LAS MAPCINASAS EN
LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS (IL-12 y
TNF- α) EN MONOCITOS HUMANOS
ESTIMULADOS CON LPG DE *Leishmania
mexicana***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

ARACELI ROJAS BERNABÉ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



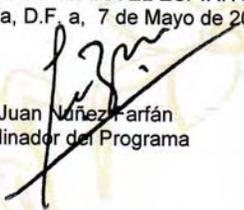
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de Enero de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **ARACELI ROJAS BERNABÉ** con número de cuenta **98554469** con la tesis titulada **"Participación de las MAPcinasas en la producción de citocinas (IL-12 y TNF-ALPHA) en monocitos humanos estimulados con LPG de Leishmania mexicana"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA**.

Presidente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
Secretario: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA
Suplente: DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
Suplente: DRA. MARTHA ROBLES FLORES

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 7 de Mayo de 2008.


Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

AGRADECIMIENTOS:

- Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM**
- A los apoyos recibidos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 45052-M).
- Apoyo a proyectos de investigación PAPIIT IN221606 por las becas otorgadas durante la realización de este trabajo.
- A los Miembros de mi comité Tutorial:

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARIA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA**

LUGAR DE REALIZACIÓN DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

**Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Medicina Experimental
de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México
(UNAM), Ubicada en el Hospital General de México.**

Excelente maestro es aquel que, enseñando poco, hace nacer en el alumno el gran deseo de aprender. Gracias Dra. María Magdalena Aguirre García, por su apoyo incondicional, su dedicación, tiempo y esfuerzo, por motivarme a salir adelante, por ser más que mi tutora, porque gracias a su ejemplo pude concluir este proyecto.

A la Dra. Martha Robles Flores por su tutoría y las facilidades otorgadas durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Enrique Ortega Soto por ser mi tutor, por sus consejos, motivación, atención y palabras de aliento en momentos difíciles, por su dedicación para concluir satisfactoriamente este proyecto

Al Jurado que reviso mi tesis y que con sus consejos ayudaron a mejorarla.
Dr. Enrique Ortega, Dra. Ma. Del Carmen Maldonado B, Dra. Martha Robles Flores, Dra. Laila Gutiérrez K, Dra. Ma. Magdalena Aguirre García.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por las facilidades otorgadas en su laboratorio para la realización de este proyecto.

A la M en C. Adriana Ruiz Remigio por su apoyo en la realización de los experimentos de citocinas

A la M en C. Cristina Cañeda Guzmán por su apoyo en el análisis de resultados de los experimentos realizados en citocinas

Al M en C. José Sotero Delgado Domínguez por su colaboración en la purificación del LPG de *Leishmania mexicana* y en el análisis de resultados de la fosforilación específica.

Al Ingeniero Omar García Hernández por su ayuda técnica y por su amistad.

A las Secretarias, Lucía Álvarez y Rosa Delgado por su disposición para ayudarme siempre.

A la Sra. Susana por su disposición para tener el material siempre listo.

Gracias.

El éxito debe medirse, no por la posición a que una persona ha llegado, sino por su esfuerzo por triunfar.

A MIS PADRES

Mamá: *Gracias por estar a mi lado, por tus palabras de aliento cuando las cosas no van bien, por cuidarme y ser mi cómplice en todo momento, por ser una gran mujer y darme tu ejemplo para seguir adelante. Te quiero*

Papá: *A pesar de que el camino no ha sido fácil, te agradezco esa dureza en tu carácter, eso me ha forjado y no me ha dejado caer, gracias por hacerme comprender que en cualquier circunstancia yo estaba en el lugar correcto, la hora correcta y en el momento exacto, por que me has transmitido tu cariño mas no tus pensamientos y has permitido que yo tenga los míos. Te quiero*

Cesar: *Gracias por ser un gran hermano y amigo, porque nunca me has dejado sola cuando mas te he necesitado, porque gracias a tus consejos y tu ejemplo he podido salir adelante y se que siempre contare contigo.*

Miguel Ángel: *Gracias por ser mi hermano, mi amigo y mi guía. Por estar siempre al pendiente de mí, y alentarme a seguir adelante y no mirar atrás, a concluir mis metas y romper todas las barreras y saber que cuento contigo.*

Consuelo: Gracias por ser como mi hermana, por escucharme y darme ánimos en momentos difíciles, por motivarme a luchar por lo que quiero y demostrarme que no estoy sola.

Pilar: Gracias por demostrarme con tu fortaleza que nada es imposible, que todo llega en su momento y que tú estarás para compartirlo.

A Miguelito y Sofía: por alegrar mis días más tristes, porque con una sonrisa me dicen lo mucho que me quieren y me enseñan día a día que la vida no es complicada solo es divertida.

Hortencia: Por ser mi gran amiga, mi hermana, mi cómplice, por escucharme gracias.

A mis amigos de Laboratorio por hacer más amena esta etapa: Berenice, Omar, Juan, Daniel, Iraís, Adriana, Nancy, Héctor, Manuel.

A todas las personas que me han brindado una oportunidad personal o profesional y me han facilitado de una manera u otra cada uno de los pasos a seguir en esta tesis. Gracias

Índice	Páginas
1. Introducción.....	1
1.2 Taxonomía.....	1
1.3 Formas clínicas de la enfermedad.....	3
1.3.1 leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y localizada (LCL).	3
1.4 Morfología y Ciclo de Vida.....	4
1.5 Moléculas del parásito.....	6
1.5.1 Lipofosfoglicano (LPG)	6
1.6 Macrófagos.....	8
1.7 Modulación de la respuesta Inmune por <i>Leishmania</i>	9
1.7.1 Modulación de la producción de citocinas en macrófagos por <i>Leishmania</i>	10
1.7.2 Modulación de la producción de citocinas en macrófagos por LPG de <i>Leishmania</i>	13
1.8 Vía de señalización de las MAPquinasas.....	14
1.8.1 Regulación de las MAPquinasas por microorganismos patogénicos	18
1.9 Regulación de las MAPquinasas por <i>Leishmania</i>	20
2. Justificación.....	21
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivo General.....	21
5. Objetivos Particulares.....	22
6. Materiales y Métodos.....	23
6.1 Purificación de LPG de <i>Leishmania mexicana</i>	23
6.2 Purificación de monolitos de sangre periférica.....	23
6.3 Análisis de la pureza de las células purificadas.....	24
6.4 Determinación de la viabilidad de monocitos.....	25
6.5 Ensayo de interacción de MAPp38 y ERK 1/2.....	25
6.5.1 Cinética de Fosforilación	25
6.5.2 Lisis de monocitos.....	26

6.5.3	Determinación de Proteína por el método de DC.....	26
6.5.4	Inmunodetección de MAPcinastas por Western-blot	26
6.6	Efectos de inhibidores de MAPcinastas.....	27
6.7	Análisis de la producción de citocinas.....	28
6.8	Pruebas estadísticas.....	29
7.	Resultados.....	30
7.1	Purificación de Células.....	40
7.2	Cinética de fosforilación	31
7.2.1	Fosforilación de MAPp38 en monocitos estimulados con LPS.....	31
7.2.2	Fosforilación de ERK 1/2 en monocitos estimulados con LPS.....	31
7.2.3	Fosforilación de MAPp38 en monocitos estimulados con LPG.....	34
7.2.4	Fosforilación de ERK 1/2 en monocitos estimulados con LPG.....	34
7.3	Efecto de inhibidores de MAPp38 y ERK.....	37
7.4	Producción de citocinas.....	41
8.	Discusión.....	49
9.	Resumen de Resultados.....	57
10.	Conclusiones.....	58
11.	Bibliografía.....	59

RESUMEN

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad parasitaria que tiene como agente etiológico a *Leishmania mexicana*. Se manifiesta en dos formas clínicas: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y diseminada (LCD). El lipofosfoglicano (LPG) es una molécula muy abundante en el parásito y es fundamental en la regulación de diversos mecanismos de la respuesta inmune del hospedero que favorecen al parásito. OBJETIVO. Analizar el efecto del LPG de *L. mexicana* en la activación de las cinasas (MAPp38 y ERK) y en la regulación de citocinas (IL-12, TNF- α) producidos por monocitos humanos. MATERIALES Y MÉTODOS. Se obtuvieron monocitos de sangre periférica humana (PBMC), se estimularon con LPG y se realizó una cinética de fosforilación analizada por Western-blot utilizando anticuerpos de MAPp38 y ERK y sus formas fosforiladas. La participación de las cinasas MAPp38 y ERK en la producción de IL-12 y TNF- α se analizó en PBMC preincubados con inhibidores específicos para las cinasas MAPp38 (SB203580) y ERK (PD98059) y estimulados con LPG. Las citocinas fueron cuantificadas por el método de ELISA. RESULTADOS. El LPG de *L. mexicana* estimuló la fosforilación de las cinasas MAPp38 y ERK en PBMC. El tiempo óptimo de fosforilación de MAPp38 fue de 15 minutos y para ERK de 10 minutos. El inhibidor de SB203580 redujo la fosforilación de MAPp38 un 19% y PD98059 disminuyó la fosforilación de ERK un 29%. La inhibición de la fosforilación de MAPp38 disminuyó la producción de IL-12 en 37% y TNF- α en un 24%, mientras que la inhibición de ERK disminuyó la producción de IL-12 en un 45% y para TNF- α un 44% en PBMC estimulados con LPG. DISCUSIÓN. El LPG de *L. mexicana* es capaz de activar las cinasas de MAPp38 y ERK y modular la producción de citocinas generada por estas cinasas. El LPG de *Leishmania mexicana* es capaz de activar las cinasas de MAPp38 y ERK en monocitos humanos, sin embargo resulta interesante conocer como se comportan estas cinasas en monocitos humanos de pacientes con leishmaniasis.

SUMMARY

The cutaneous leishmaniasis is a parasitic disease that it has like etiologic agent to *Leishmania mexicana*. It is pronounced in two clinical forms: the cutaneous leishmaniasis located (LCL) and scattered (LCD). The lipophosphoglicano (LPG) is a very abundant molecule in the parasite and is fundamental in the regulation of diverse mechanisms of the immune response of the host that favor the parasite.

OBJECTIVE. To analyze the effect of the LPG of *L. mexicana* in the activation of kinases (MAPp38 and ERK) and in the regulation of citocinas (IL-12, TNF- α) produced by human macro. **MATERIALS And METHODS.** Macrophage of human peripheral blood were obtained (PBMC), they were stimulated with LPG and it was made kinetic of fosforilación analyzed by Western-blot having used antibodies of MAPp38 and ERK and its fosforiladas forms. The participation of kinases MAPp38 and ERK in the production of IL-12 and TNF- α it was analyzed in PBMC preincubated with specific inhibitors for kinases MAPp38 (SB203580) and ERK (PD98059) and stimulated with LPG. The citocinas were quantified by the ELISA method. **RESULTS.** The LPG of Mexican *L.* stimulated the fosforilación of kinases MAPp38 and ERK in PBMC. The optimal time of fosforilación of MAPp38 was of 15 minutes and for ERK of 10 minutes. The SB203580 inhibitor the fosforilación of MAPp38 a 19% and PD98059 diminished the fosforilación of ERK a 29%. The inhibition of the fosforilación of MAPp38 diminished the production of IL-12 in 37% and TNF- α in a 24%, whereas the ERK inhibition diminished the production of IL-12 in a 45% and for TNF- α 44% in PBMC stimulated with LPG. **DISCUSSION.** The LPG of Mexican *L.* is able to activate kinases of MAPp38 and ERK and to modulate the production of citocinas generated by these kinases. The LPG of *Leishmania mexicana* is able to activate kinases of MAPp38 and ERK in human macrophage, nevertheless turns out interesting to know as they behave this kinasas in human macrophages of patients with leishmaniasis.

1. Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad que engloba diversas formas clínicas debido a la variedad inmunogenética de los hospederos y a la diversidad de las especies de parásitos de *Leishmania* que interactúan con las poblaciones humanas. El aumento en la incidencia de la enfermedad se debe a la presencia de diversos factores tales como: la ausencia de medidas terapéuticas efectivas para su control, la toxicidad de las drogas utilizadas para el tratamiento de la enfermedad, la frecuencia de la expresión de quimio-resistencia por parte de los parásitos, la ausencia de un control efectivo de los vectores y el costo de implementación de medidas de profilaxis y de diagnóstico de los hospederos ⁽¹⁾.

1.2 Taxonomía

El parásito de *Leishmania* pertenece al Reino: Protista, Subreino: Protozoo, (unicelulares), Phylum: Sarcomastigophora (único núcleo), Subphylum: Mastigophora (con flagelos), Clase: Zoomastigophora, Orden: kinetoplastida (estructura con DNA), Suborden Trypanosomatina, Familia: Trypanosomatidae (un solo flagelo), Género: *Leishmania*. Existe una identificación y clasificación taxonómica de las diversas especies de *Leishmania* que han sufrido importantes cambios a través del tiempo. Así en 1992 se estableció el Internacional *Leishmania* Network, ILN, bajo es auspicio de la Organización Panamericana de la Salud y el *Brazilian Research Council*, CNPq en el que se propuso la siguiente clasificación (Tabla 1) ^(2, 3).

Reino:	Protista	Haeckel, 1866
SubReino:	Protozoo	Golfuss 1817
Phylum:	Sarcomastogophora	Honigberg & Balamuth, 1963
SubPhylum:	Mastoghopora	Deising, 1866
Clase:	Zoomastigophorea	Calkins, 1909
Orden:	Kinetoplastida	Honigberg, 1963
Suborden	Tripanosomatina	Kent 1880
Familia:	Tripanosomatidae	Dolflein, 1910

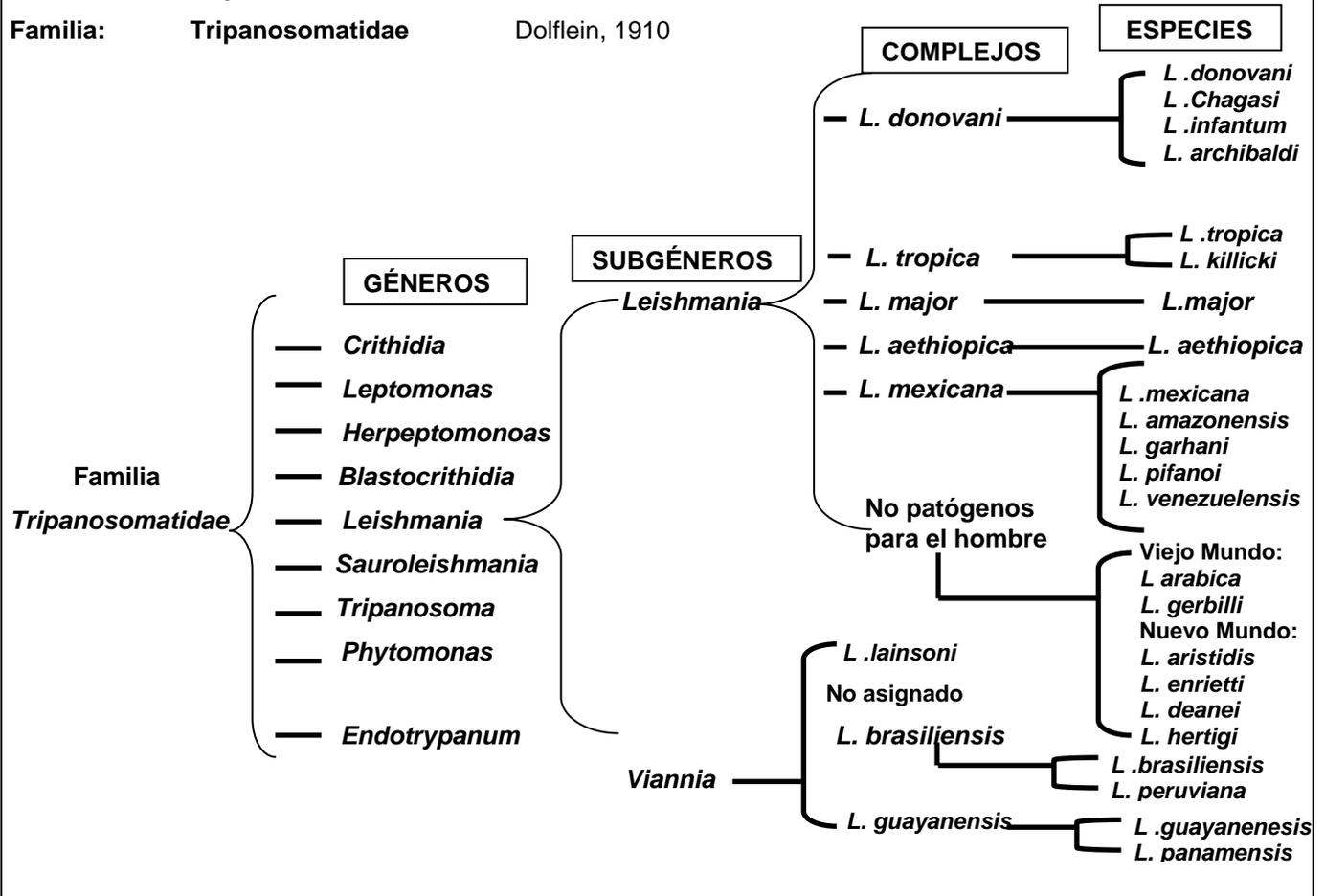


Tabla 1. Taxonomía de diversos complejos de *Leishmania* spp.

INDRE Velasco 1994

1.3 Formas clínicas de la enfermedad

La leishmaniasis puede presentarse en cuatro formas clínicas: leishmaniasis mucocutánea, leishmaniasis visceral, leishmaniasis cutánea localizada, y leishmaniasis cutánea diseminada o difusa, ^(3,4).

1.3.1 leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y localizada (LCL).

La leishmaniasis cutánea presenta dos formas clínicas: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis Cutánea Diseminada (LCD).

a) leishmaniasis cutánea localizada (LCL): Conocida en México como úlcera de los chicleros, es causada principalmente por *Leishmania mexicana*. La LCL comienza como una pequeña pápula roja en el sitio de la picadura del insecto, generalmente se da en zonas expuestas como la cara, brazos y el cuello. Posee un periodo de incubación de 2 a 6 semanas. La lesión se caracteriza por presentar bordes redondeados. De centro granuloso y húmedo. La LCL tiende a la curación espontánea de 6 meses a 2 años. La mayoría de estos pacientes responden a antimoniales pentavalentes, que es el tratamiento que se les aplica. (Figura 1) ⁽⁵⁾

b) leishmaniasis cutánea difusa (LCD): La leishmaniasis cutánea difusa (LCD), generalmente no responde a los diversos tratamientos y por su severidad puede tener un desenlace fatal. Los pacientes presentan anergia, este tipo de padecimiento se caracteriza por presentar nódulos en todo el tegumento, el parásito se disemina por vía linfática, invadiendo prácticamente toda la piel, excepto el cuero cabelludo, la región axilar, inguinal, genitales externos, plantas de los pies y con frecuencia en las mucosas orofaríngea y nasal. La diseminación es muy lenta pero es progresiva. (Figura 2) ⁽⁵⁾



Figura 1. Paciente con LCL



Figura 2. Paciente con LCD

www.ars.usda.gov

1.4 Morfología y Ciclo de Vida

Leishmania presenta durante su ciclo de vida dos formas fenotípicamente diferentes:

La forma de **promastigotes**; estos son alargados con un flagelo anterior, fusiforme, son extracelulares y móviles. Su talla varía entre los 10 a 30 μm de largo y de 1 a 5 μm de ancho. (Figura 3).

La forma de **amastigotes**, son inmóviles, ovoides y con una longitud entre 3 a 5 μm y una anchura que oscila entre 1.5 a 2.5 μm . En su citoplasma se observa un núcleo voluminoso y esferoidal y un cinetónúcleo próximo al núcleo de aspecto bacilar o bastoniforme (Figura 4).⁽⁴⁾

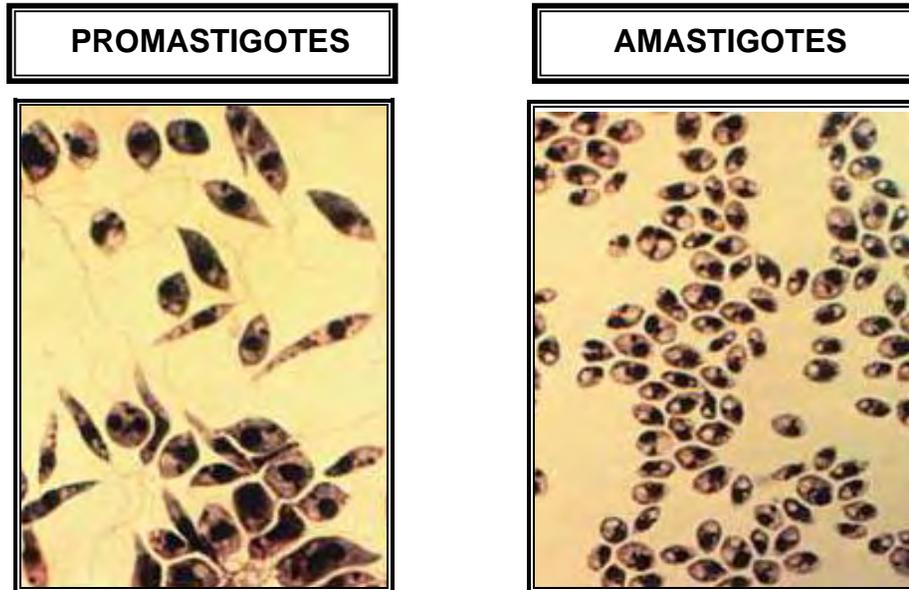


Figura 3 y 4. Diferencias morfológicas del parásito *Leishmania*. www.ohsu.edu

El parásito tiene un ciclo de vida digenético, es decir requiere de dos hospederos para completar su ciclo de vida. La forma de promastigote se encuentra en el tubo digestivo del vector, y la forma de amastigote en los fagolisosomas de los macrófagos de mamíferos incluyendo al hombre.^(3,4)

La transmisión del parásito se inicia con la picadura de un pequeño díptero que en América pertenece al género de *Lutzomyia* ⁽⁶⁾, y que ingiere los amastigotes al alimentarse de sangre del hospedero vertebrado. Los amastigotes permanecen en el intestino del vector y se transforman en promastigotes procíclicos. Subsecuentemente ocurre la metaciclogénesis, que consiste en la transformación de los promastigotes procíclicos a promastigotes metacíclicos que son la forma infectiva del parásito. Durante esta transformación ocurren importantes modificaciones de la estructura del lipofosfoglicano (LPG) que es una molécula que se encuentra en gran cantidad en la superficie del parásito y que esta asociada con la capacidad infectiva y sobrevivencia de *Leishmania*. ⁽⁷⁾ Los promastigotes son incorporados dentro de fagolisosomas donde se diferencian a la forma de amastigotes. Los amastigotes proliferan y eventualmente la membrana del macrófago infectado es destruida y son liberados para ser ingeridos por células vecinas o por otro mosquito y el ciclo dentro del mosquito comienza de nuevo (Figura 5) ⁽⁸⁾.

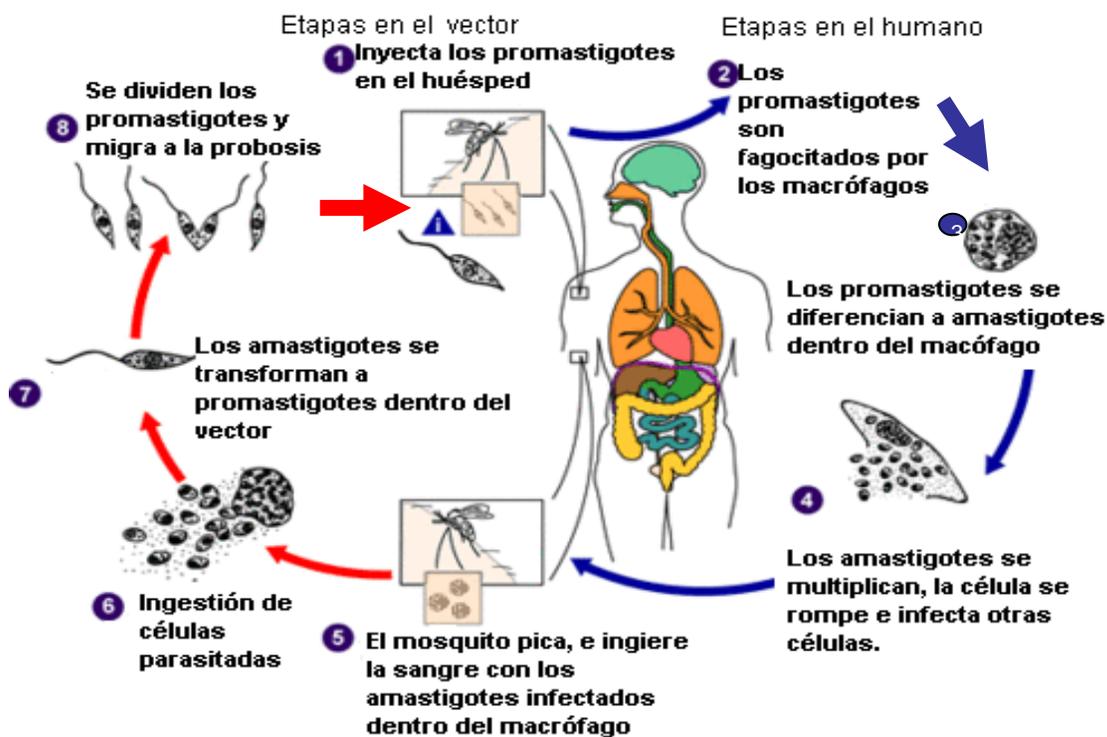


Figura 5. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

CDC Centers for Disease Control 2002

1.5 Moléculas del parásito

En su ciclo de vida, el parásito debe proliferar y sobrevivir a ambientes altamente hostiles. Para esto ha desarrollado mecanismos eficaces en su estructura que le permiten combatir las agresiones del medio que le rodea.

El parásito de *Leishmania* durante su fase de promastigote presenta en su superficie, incluyendo al flagelo una cubierta de densa de glicocálix compuesto por varias moléculas ancladas por glucosilfosfatidilinositol (GPI) tales como: proteofosfoglicanos (PPG), glicoinositolfosfoglicanos (GIPLS), fosfatasas ácidas de secreción, lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína 63 (gp63).⁽⁹⁾ 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⁽¹⁰⁾.

1.5.1 Lipofosfoglicano (LPG)

El lipofosfoglicano (LPG) es la molécula más abundante en la superficie de los promastigotes de *Leishmania*, su densidad y características están estrictamente moduladas a lo largo del ciclo de vida del parásito y está compuesta por 4 regiones principales:

- 1.- La región de anclaje de GPI, un lípido 1-O-alkil-2-liso-fosfatidilinositol.
- 2.- A la membrana se fija una región central de fosfosacáridos constituida por glucoheptasacáridos fosforilados.
- 3.- Una región de disacáridos fosforilados, que es un gran dominio de fosfoglicanos con 15-30 unidades repetitivas de Gal-Man-P, dependiendo de la especie de *Leishmania* hay sustituciones de estos azúcares.
- 4.- Un casquete terminal de oligosacáridos que puede estar constituido por galactosa o manosa pero que varía según la especie de *Leishmania spp*⁽¹¹⁾.

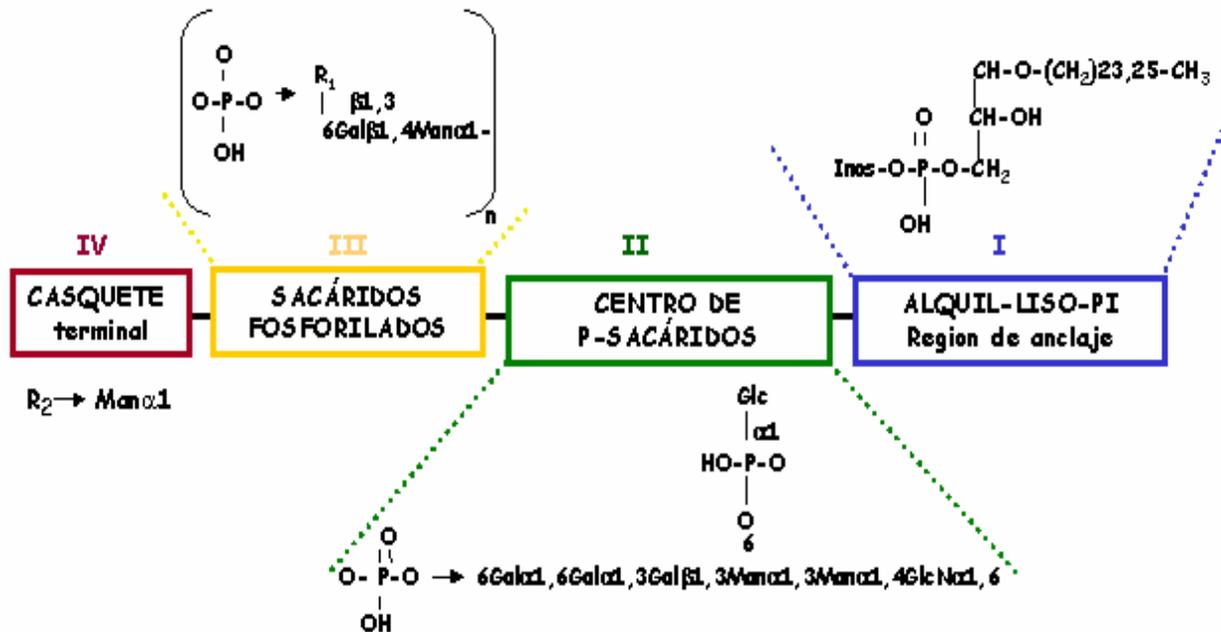


Figura 6. Estructura de la molécula del LPG de promastigotes de *Leishmania*
Descoteaux et al 1992

Durante la metaciclogenesis, la región de unidades repetidas del lipofosfoglicano (LPG) se duplica, lo que provoca un cambio conformacional que modifica la expresión de azúcares que presenta pocos residuos de galactosa que terminan con arabinosa ⁽¹²⁾. Estos cambios estructurales promueven el desligamiento de las lectinas del intestino medio y permiten el paso del parásito a las partes bucales del vector ⁽¹³⁾.

Esta molécula es fundamental porque gracias a ella el parásito ha desarrollado estrategias evolutivas para evadir la respuesta inmune de su hospedero tales como multiplicarse, reproducirse, y sobrevivir regulando los mecanismos de transducción de señales y la producción de citocinas en estas células ⁽¹⁰⁾.

En el control y resolución de la leishmaniasis se encuentran involucrados elementos tanto de la respuesta inmune innata, como de la respuesta adaptativa. Como parte de la respuesta inmune innata, se ha demostrado la importancia de

células como neutrófilos, polimorfonucleares, células NK y células dendríticas; así como mediadores solubles como son opsoninas quimiocinas y citocinas que pueden ser muy eficientes para controlar la infección. Un evento importante en la eliminación de *Leishmania* es la activación del macrófago, el cual requiere del interferón gamma (IFN- γ) que es una citocina que puede ser inducida y secretada tanto por células de la respuesta inmune innata como por células de la respuesta inmune adaptativa (CD4⁺ y células TCD8⁺).⁽¹⁴⁾

1.6 Macrófagos

Los macrófagos son células del sistema inmune que juegan un papel importante en procesos inflamatorios y de defensa del hospedero en la eliminación de microorganismos patógenos a través de vías de señalización como las MAPquinasas. La penetración del parásito al macrófago también puede estar mediada por una serie de ligandos solubles o presentes en la superficie del macrófago, tales como: la proteína de unión a manosa o MBP (manose binding protein) que es una proteína sérica de fase aguda que puede actuar como opsonina para promover la fagocitosis o activar al sistema del complemento. La fagocitosis es un arma importante en el sistema inmune innato; es llevada a cabo por fagocitos profesionales que engloban al microorganismo dentro de un compartimento celular donde son aniquilados. El principio fundamental de la inmunoregulación en la leishmaniasis es que el parásito que se replica en macrófagos quiescentes es matado por macrófagos activados. El macrófago es considerado un fagocito profesional por la gran cantidad de receptores fagocíticos que posee y por su enorme capacidad para reconocer partículas ajenas y engullirlas para su eliminación. Paradójicamente, el macrófago es la célula hospedera del parásito así como la célula efectora de su destrucción. La fagocitosis de *Leishmania* por el macrófago también está mediada por receptores que incluyen los que reconocen patrones moleculares (PRR) por ejemplo CR3, CR1, TLR2, etc. Esta fagocitosis resulta en activación de la NADPH oxidasa, la cual transfiere protones a oxígeno molecular formando superóxido altamente

reactivo, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y radicales hidroxilos al fagosoma que interactúa con la membrana del parásito. Los macrófagos activados producen diferentes citocinas como TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-18. La IL-12 es importante en una respuesta inmune tipo Th1. La producción de IFN- γ por células Th1 y células NK ayuda a la resistencia mientras la expansión de células Th2 productoras de IL-4 confieren susceptibilidad. (8, 15, 16, 17)

1.7. Modulación de la respuesta inmune por *Leishmania*

Leishmania ha desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero y así asegurar su sobrevivencia. Las moléculas que posee en su superficie y las que secreta le son de gran ayuda para evitar ser eliminado por el sistema inmune.

El papel del LPG en la evasión de la respuesta inmune parece ser complementado por la función de la gp63. Se ha visto que durante los estadíos iniciales de infección del macrófago por *Leishmania donovani*, que 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 (18).

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 (19, 20).

El LPG del parásito de *Leishmania* disminuye la actividad de PKC (proteína cinasa C) del macrófago para potenciar su supervivencia. Los GIPL encontrados en los amastigotes también pueden inhibir la producción de óxido nítrico (NO) reduciendo la actividad leishmanicida del macrófago. El LPG contribuye a la capacidad de los promastigotes metacíclicos para resistir a la lisis mediada por complemento en el mamífero hospedero al evitar la inserción del complejo de ataque (MAC) C5-9 dentro de la membrana del promastigote e inhibe el estallido oxidativo del macrófago. Tanto promastigotes como amastigotes han mostrado ser capaces de

regular la producción de IL-12 del macrófago, que es necesaria para el desarrollo y mantenimiento de una respuesta Th1. La unión del parásito en cualquiera de sus formas con los receptores del macrófago durante la fagocitosis suprime la producción de IL-12. *Leishmania* también utiliza inmunoglobulinas como opsoninas para facilitar su entrada al macrófago. El enlace con el receptor Fc γ también induce la producción de IL-10, citocina que ha sido asociada con la supresión de la actividad antimicrobial del macrófago. ^(7, 8, 9)

1.7.1 Modulación de la producción de citocinas en macrófagos por *Leishmania*

Las citocinas reconocidas que regulan funciones efectoras de la inmunidad innata, son IL-1, IL-10, IL-6, TNF- α , IL-12, IL-18 e IL-15. Algunas pueden ser secretadas por el macrófago, pero también pueden ser producidas por otras células.

En lesiones en paciente LCL se ha observado una respuesta de citocinas tipo Th1, con predominio de IFN- γ e IL-1 β , sobre IL-4 y bajos niveles o ausencia de IL-10; mientras que en lesiones de pacientes con la forma severa (LCD) predominan citocinas de una respuesta tipo Th2, con predominio de IL-4, ligera expresión de TNF- α y bajos niveles de IL-1 β ⁽¹⁴⁾. En modelos murinos se ha demostrado que el curso clínico de la leishmaniasis depende de una respuesta inmune tipo Th1 (curación o resistencia) o de una respuesta tipo Th2 (progresión o exacerbación). Ratones genéticamente resistentes (C57BL/6 y CH3) presentan una respuesta tipo Th1 relacionada con la producción de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12 y ratones genéticamente susceptibles (BALB/c) presentan una respuesta tipo Th2 con producción de IL-4, IL-10, IL-5, e IL-13 ⁽²¹⁾.

a) Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es secretado por los macrófagos y actúa como un estímulo autócrino para incrementar el estallido respiratorio y los intermediarios reactivos de oxígeno generados durante este estallido, aumentando

a su vez la producción de TNF- α por los macrófagos ^(22, 23).

El TNF- α es una citocina proinflamatoria que ha sido estudiada extensamente en modelos murinos y que se ha asociado con una respuesta protectora en ratones infectados con *Leishmania*.

Durante la infección por *Leishmania*, la activación del macrófago puede ocurrir a través de la secreción autocrina de TNF- α que actúa de manera sinérgica con IFN- γ para activar la producción de NO.

El tratamiento con TNF- α exógeno de ratones infectados con *L. major* reduce el tamaño de sus lesiones y disminuye el número de parásitos, esta reducción es significativa cuando el ratón infectado es tratado con TNF- α e IFN- γ . Por el contrario, la aplicación de anticuerpos anti-TNF- α exacerbaban la infección por *L. major* y los ratones desarrollan grandes lesiones con un elevado número de parásitos ^(24, 25, 26).

En la leishmaniasis humana el papel de TNF- α resulta controversial e incluso en altos niveles de esta citocina se han asociado con el daño tisular. Por ejemplo, se ha reportado que los niveles séricos de TNF- α son significativamente más altos en pacientes con la forma mucocutánea y diseminada de la enfermedad. Además, pacientes con formas severas de la enfermedad como LV y LCD presentan altos niveles de TNF- α en suero.

Se ha propuesto que la variabilidad en la producción de TNF- α por monocitos parece estar genéticamente determinada y se ha identificado un nucleótido que estimula la transcripción de TNF- α y que está relacionado con la susceptibilidad a formas severas de leishmaniasis, así como otras enfermedades infecciosas.

b) Interleucina 12 (IL-12)

La importancia de la IL-12 durante la respuesta inmune en leishmaniasis cutánea ha sido ampliamente descrita en modelos murinos resistentes y susceptibles infectados con *Leishmania major*, encontrándose que la resistencia y el control de la infección dependen de un tipo de respuesta tipo Th1 que es mediada por IL-12.

Se ha demostrado que ratones resistentes deficientes en IL-12 así como ratones tratados con anticuerpos anti-IL-12 ^(27, 28), desarrollan una enfermedad progresiva cuando son infectados con *Leishmania major*. Además, cuando se administra IL-12 recombinante a ratones susceptibles (BALB/c) estos presentan un menor número de parásitos en las lesiones y desarrollan resistencia a la enfermedad.

Al parecer la respuesta de las células T puede depender de la expresión de receptores funcionales para IL-12 (IL-12R), ya que las células infectadas con *Leishmania major* estimulan la expresión de IL-12R en ratones resistentes, pero la inhiben en ratones susceptibles ⁽²⁹⁾.

Además ratones deficientes en la subunidad beta para el receptor IL-12 desarrollan grandes lesiones cutáneas similares a las desarrolladas por ratones susceptibles. Pese a que se ha demostrado la importancia de la IL-12 en una respuesta protectora a la leishmaniasis, los promastigotes de *L. major* pueden inhibir selectivamente la producción de IL-12 por el macrófago, tanto *in vitro* como *in vivo* ^(30, 31).

Esta inhibición puede ocurrir tanto en ratones susceptibles como resistentes, por el contrario los amastigotes pueden activar macrófagos para producir IL-12 en respuesta a la infección por *Leishmania*.

Las células de ratones susceptibles a *Leishmania mexicana* responden eficientemente a la IL-12 exógena *in vitro* y producen IFN- γ . Sin embargo, ratones genéticamente deficientes en STAT no responden a IL-12 exógena *in vivo*, esto sugiere que existe una incapacidad para producir IL-12 más que una falta de respuesta a IL-12 exógena en ratones considerados susceptibles a la infección por *Leishmania mexicana*.

1.7.2 Modulación de la producción de citocinas en macrófagos por LPG de *Leishmania*

En la leishmaniasis, IL-15 puede activar macrófagos infectados con *Leishmania infantum* e inducir la destrucción del parásito directamente o indirectamente a través de la secreción de IL-12. Esta actividad leishmanicida ha sido equiparada con la inducida por IFN- γ .⁽³²⁾

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⁽³³⁾.

En pacientes LCL el patrón de citocinas secretadas por monocitos estimulados con LPG se caracteriza por un incremento en la producción de TNF- α , IL-18 e IL-15 y en contraste se presenta una inhibición en IL-12.

Por otro lado, en pacientes LCD el patrón de citocinas secretadas por monocitos estimulados con LPG, se caracteriza por la falta de producción de IL-18 e IL-15 y por una correlación inversamente proporcional entre los niveles de TNF- α e IL-12 y la severidad clínica de la enfermedad⁽³⁴⁾.

Se ha demostrado que el LPG de *Leishmania* inhibe la síntesis de IL-12 en macrófagos murinos, esta inhibición depende de la repetición de unidades de manosa y galactosa de la molécula del parásito, estos datos demuestran que el LPG puede ser una molécula importante para el parásito⁽³⁵⁾.

Por otra parte se sabe que el LPG de *Leishmania* activa AP-1 en macrófagos de la línea celular J774A.1 a través de las cinasas ERK y MAPp38 y modula la producción de IL-12. En la interacción entre las moléculas de *Leishmania* y el macrófago participan una serie de procesos como el deterioro de la transducción de señales de esta forma los promastigotes de *Leishmania donovani* pueden evadir la activación de las MAPcinasas durante la infección en macrófagos⁽³⁶⁾.

La infección de *Leishmania* puede estar vinculada con defectos en la señalización que facilitan a los parásitos de *Leishmania* la propagación dentro de las células (37).

1.8 Vía de señalización de las MAPcinastas

La cascada de proteínas-cinastas activadas por mitógenos (MAP cinastas) es un sistema de señalización intracelular ampliamente conservado en eucariontes que consiste en tres módulos paralelos de cinastas, compuestos a su vez de distintas cinastas que actúan en cascada y son las encargadas de transmitir al núcleo de las células la información necesaria para iniciar el proceso de división celular.

La relación de esta cascada con la reacción inflamatoria se debe a que tanto las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1, como fenómenos pro-inflamatorios como el choque térmico, la hiperosmolaridad o la radiación ultravioleta son potentes activadores de alguno de los módulos de esta cascada.

En mamíferos, el término general MAPK (*mitogen-activated protein Kinase*) comprende a una superfamilia de proteínas cinastas con especificidad dual serina/treonina-cinasa dirigida por residuos de prolina, que pueden ser activadas por una gran variedad de estímulos. Su activación depende de la señal iniciada por receptores de factores de crecimiento fosforilados en tirosina (como PDGF, EGF, FGF) o receptores de hormonas (como la hormona del crecimiento), de receptores asociados a proteínas G (siete dominios transmembranales) (como ANGII, endotelina) o de receptores de citocinas inflamatorias como los de la familia del TNF- α . Además, pueden ser activadas por condiciones de estrés en el entorno, como por ejemplo por shock osmótico, irradiación, lesiones en el DNA o por productos bacterianos como el LPS (39). La activación de las MAPcinastas en respuesta a estos estímulos controla la expresión de genes, el metabolismo celular y funciones del citoesqueleto, contribuyendo a la regulación de procesos celulares tan complejos como la migración, la mitogénesis, la diferenciación o la supervivencia celular. Estas MAPcinastas han sido divididas en tres grandes grupos en función de los estímulos que inducen su activación. Así por ejemplo, los

factores de crecimiento o estímulos mitogénicos promueven principalmente la activación de las cinasas ERK (*extracellular signal-regulated kinase*); mientras que, estímulos de estrés celular, tales como la luz ultravioleta, factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias inducen la activación de otras dos subfamilias, las JNK/SAPK (*c-jun NH2-terminal kinase* o *stress-activated MAP kinase*) y un tercer grupo caracterizado por p38 ⁽³⁸⁾.

Las MAPcinasas son estructuras proteicas pequeñas que se encuentran en el citoplasma de distintas células. Están formadas por 7 alfa hélices, 7 láminas tipo beta y un solo lazo de activación, tal y como se demuestra en la Figura 7 ⁽³⁹⁾. Existen tipos distintos de MAPcinasas pero la estructura básica no difiere mucho de un tipo a otro.

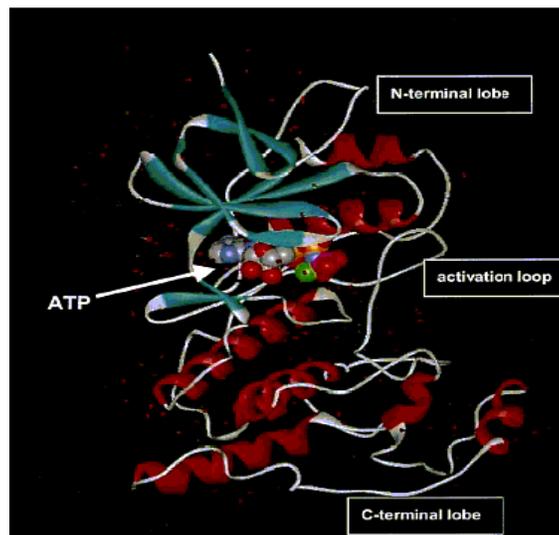


Figura 7. Estructura tridimensional de las MAPcinasas Vitale 2000

La activación de cada familia de MAPK se produce en forma de cascada. Dicha cascada está formada por tres módulos con actividad cinasa, donde los miembros del módulo superior fosforilan y activan a los miembros del módulo inferior. La especificidad de la respuesta de la MAPK viene dada por la activación específica de determinados miembros de cada uno de estos módulos. Estos módulos se esquematizan como MAPKKK---MAPKK—MAPK. De esta manera, el tercer módulo, correspondiente a las familias ERK, JNK y p38 (MAPK) serán fosforiladas

y activadas por un segundo módulo de MAPK cinasas (MAPKKs). Estas MAPKKs son cinasas con especificidad dual y catalizan una doble fosforilación en tirosina y en treonina sobre las MAPK necesarias para que éstas sean completamente activas ⁽⁴⁰⁾. Por otro lado, las MAPKKs serán fosforiladas y activadas por serina/treonina cinasas que funcionan como MAPKK cinasas (MAPKKKs), en el primer módulo (Figura 8).

CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE MAPK

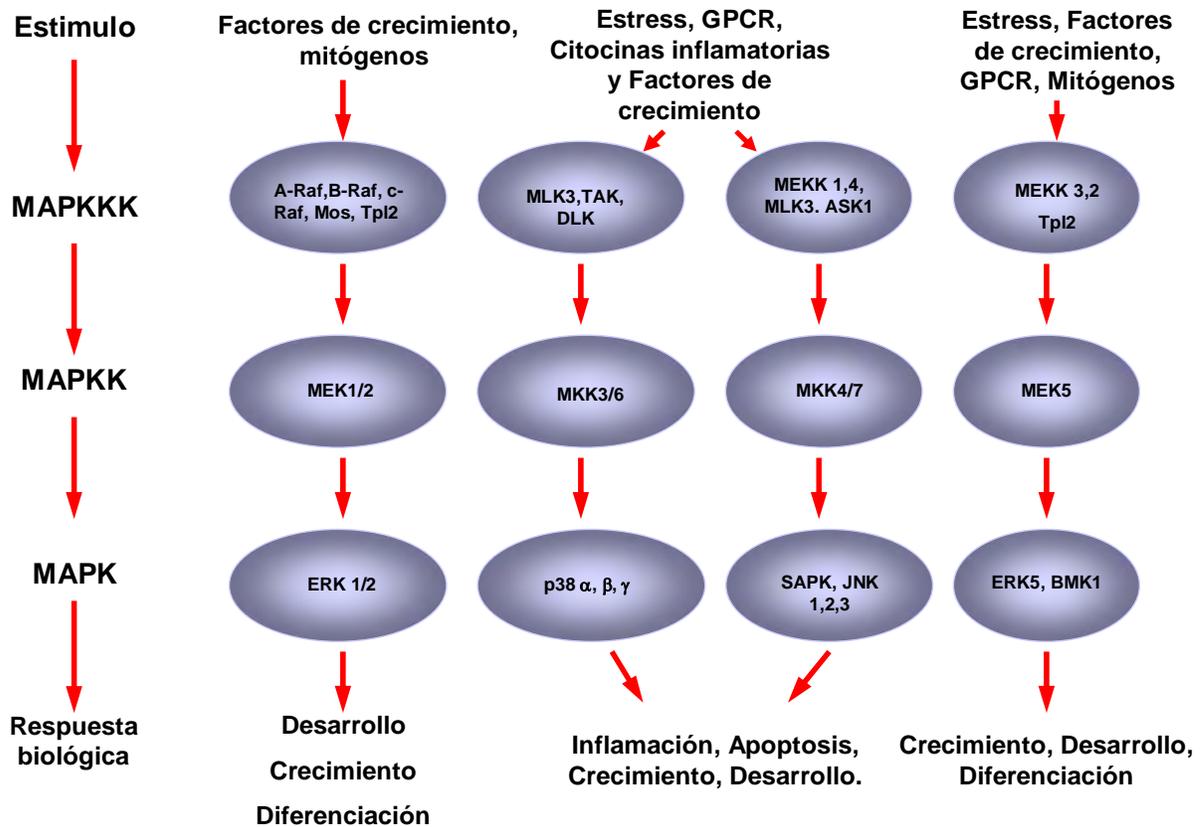


Figura 8. Cascada de señalización de las MAPcinasas.

Cell signaling web

La regulación de estas cinasas podría parecer complicada por el gran número de combinaciones que existen, pero no es así. Primero, las MAPKKs representan un número menor de miembros que el módulo de las MAPK. Segundo, las MAPKKs presentan una alta especificidad por sus substratos MAPK, conduciendo a un mínimo de combinaciones en los módulos MAPKK-MAPK. Tercero, los MAPKKKs presentan diferentes motivos de regulación que los que presentan las MAPKK o MAPK. Por tanto, las MAPKKKs pueden ser reguladas por una variedad de proteínas específicas activadas en respuesta a los diferentes estímulos extracelulares. Por último, la regulación de la cascada MAPKKK-MAPKK-MAPK dependerá de su interacción con unas proteínas adaptadoras denominadas “*scaffolding*” o de anclaje. El papel de estas proteínas consiste en aumentar la concentración local de las proteínas cinasas y de sus substratos específicos ⁽⁴¹⁾.

La cascada de activación de ERK es la que, hasta el momento, ha sido más extensamente estudiada, ya que se activa bajo el estímulo de numerosos agentes mitogénicos. ERK-1 y ERK-2, también conocidas como MAPcinasas p44 y p42, son expresadas de forma ubicua y su abundancia relativa dependerá del tipo de tejido. Por ejemplo, en muchas células del sistema inmunológico, ERK-2 se encuentra predominantemente expresada, mientras que en células de origen neuroendocrino, la expresión de ambas cinasas es similar ⁽⁴²⁾. El segundo módulo de activación (MAPKK) está compuesto por los miembros de la familia MEK; MEK-1 y MEK-2. No existen evidencias de que ERK-1/2 puedan ser fosforiladas por otros efectores, aunque no es posible descartar esta posibilidad ⁽⁴³⁾.

Una vez activadas, ERK-1 y ERK-2 son capaces de fosforilar y regular, ya sea positiva o negativamente, numerosas proteínas citoplasmáticas, incluyendo proteínas cinasas adicionales y otras proteínas involucradas en la transmisión de señales como la fosfolipasa A2, así como componentes del citoesqueleto. Actualmente se conoce que la activación de la vía de la MAPcinasa lleva a la producción de óxido nítrico y citocinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 y TNF- α ⁽⁴⁴⁾.

1.8.1 Regulación de las MAPquinasas por microorganismos patógenicos

Los microorganismos intracelulares y extracelulares regulan las MAPquinasas las cuales juegan un papel importante en las infecciones causadas por agentes patógenos (bacterias y protozoarios).

a) Bacterias:

Las bacterias pueden evadir con eficacia algunos mecanismos de defensa que monta el hospedero por ejemplo la activación de algunas vías de señalización como las MAPquinasas.

b) *Escherichia coli*: En monocitos infectados con esta bacteria se demostró que la flagelina es necesaria para el reconocimiento del receptor TLR5 que favorece la activación de MAPp38 y JNK para inducir la secreción de IL-8 ⁽⁴⁵⁾.

c) *Yersinia pestis*: Esta bacteria presenta uno de los antígenos mejor caracterizados, el YopH. Esta tirosina-fosfatasa desfosforila a la cinasa de adhesión focal (FAK) interfiriendo así en la unión celular para la fagocitosis, también se sabe que YopJ inhibe la activación de MAPcinasa MEK que ríe abajo fosforila a ERK y MAPp38 ⁽⁴⁶⁾.

Por otro lado en varias especies de *Yersinia* se ha demostrado que durante la infección en macrófagos, TLR4 juega un papel importante en la activación de MAPquinasas y NF- κ B y que YopJ es necesaria en *Yersinia* para desactivar la vía de señalización de las MAPquinasas y puede inducir apoptosis en los macrófagos ⁽⁴⁷⁾.

Parásitos:

d) ***Trichomonas vaginalis***: activa selectivamente las vías de transducción extracelular reguladas por las MAPquinasas: ERK 1/2, MAPp38 y c-Jun(JNK) en macrófagos RAW264.7. En este estudio se evaluó el papel de *T. asociación* de vías apoptóticas moduladas por ERK1/2, JNK y p38 ⁽⁴⁸⁾. Otro estudio realizado en *Trichomonas vaginalis* en células HeLa demostró que *T. vaginalis* puede regular a su vez la expresión de genes de TLR2, TLR4 y TLR9 mediante la activación de MAPp38, así mismo modula la producción de citocinas como IL-8 y TNF- α ⁽⁴⁹⁾.

La activación de las MAPquinasas implica una variedad de funciones fisiológicas que incluyen la diferenciación, apoptosis, proliferación y cambios en la permeabilidad de la membrana. Se sabe que la lectina Gal/GalNAc de ***Entamoeba histolytica*** ha desarrollado algunas estrategias para modular vías de señalización como las MAPquinasas; tiene como blanco células epiteliales, y aumenta la concentración de calcio y modula la activación de MAPp38 y ERK 1/2 ⁽⁵⁰⁾.

f) ***Trypanosoma cruzi***: Este parásito contiene cruzipaina que induce la activación de la arginasa en macrófagos y ésta favorece la liberación del trypomastigote de *T.cruzi*. En este estudio se demostró que en macrófagos de la línea celular J774A1, se activan las MAPquinasas MAPp38 y ERK 1/2, y disminuye la producción de óxido nítrico e IL-12 al estimular las células con cruzipaina ⁽⁵¹⁾.

g) ***Plasmodium falciparum***: Se sabe que macrófagos infectados con GPI (glycosylphosphatidylinositol) de *P falciparum* mediante el reconocimiento de TLR2 y TLR4 activa señales intracelulares dependientes de MyD88 que modulan la activación de MAPp38, ERK1/2 y JNK ⁽⁵²⁾

1.9 Regulación de las MAPcinastas por *Leishmania*

Leishmania donovani es capaz de reducir la producción de IL-1 y TNF- α en macrófagos ⁽⁵³⁾. También se ha demostrado que en la infección de macrófagos con grandes cantidades de parásitos de *L. donovani* pueden inhibir la activación de la PKC, alterando al factor de transcripción c-fos y la expresión de genes. ^{54, 55)}.

En *Leishmania donovani* se sabe que cuando el parásito infecta al macrófago induce una disminución en la producción de IL-12 y óxido nítrico (NO). Como consecuencia se ven afectados los niveles de IFN γ producido por células NK ^(54, 55). Se ha observado también que el parásito es capaz de inducir la desfosforilación de MAPp38, ERK 1/2 y JNK lo cual inhibe la secreción de NO y TNF- α . Estos datos demuestran que MAPKp38 y JNK son requeridas para la liberación de TNF- α y NO. Lo anterior demuestra y sugiere la importancia que juega la vía de MAPcinasa en la infección por *Leishmania donovani*.

Estudios realizados en macrófagos murinos infectados con *Leishmania major* mostraron que CD40 induce un decremento en la fosforilación de MAPp38 y modula la producción de IL-12 ⁽⁵⁶⁾.

Por otro lado se sabe que los promastigotes de *Leishmania donovani* evaden mecanismos de la respuesta inmune para resistir la destrucción y modular funciones de defensa como la activación de MAPp38, c-JUN y ERK 1/2 durante la infección en macrófagos derivados de médula ósea ⁽⁵⁷⁾.

También se ha demostrado que en la infección de monocitos murinos por *Leishmania donovani*, se atenúa la vía de señalización de JAK-STAT, activada por IFN- γ inhibiendo la fosforilación en tirosina de JAK1, JAK2, y STAT1.

Asimismo, se ha demostrado que *Leishmania* es capaz de inducir la desfosforilación de residuos tirosina e inhibe MAPcinastas inducidas por IFN- γ .

2. Justificación

Actualmente no se sabe en dónde radica la diferencia de que se presente una leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y una leishmaniasis cutánea difusa (LCD). No se sabe si son las moléculas del parásito o es la respuesta inmune que monta el hospedero. La activación de las citocinas proinflamatorias en la infección es de gran importancia en el desarrollo de la enfermedad. Sabemos que en la inducción de estas citocinas participan vías de señalización como las MAPquinasas, por lo que resulta interesante comprender la interacción del parásito con las células hospederas implicadas lo cual, constituye un reto fundamental para el diseño de estrategias para el control efectivo de la enfermedad. Por tal motivo, estamos interesados en investigar si *Leishmania mexicana* modula la producción de citocinas como IL-12 y TNF- α mediante la vía de MAPquinaasa principalmente de MAPp38 y ERK en monocitos de sujetos sanos.

3. Hipótesis

- ❖ Las MAPquinasas participan en la producción de citocinas tales como IL-12 y TNF- α por monocitos humanos estimulados con LPG de *Leishmania*.

4. Objetivo General

- ❖ Analizar la participación de las MAPquinasas (MAPp38 y ERK 1/2) en la producción de IL-12 y TNF- α en monocitos humanos estimulados con LPG de *Leishmania mexicana*.

5. Objetivos Particulares

Los monocitos de sujetos sanos serán estimulados con LPS bacteriano y LPG de *Leishmania mexicana* y se realizara lo siguiente:

- ❖ Realizar una cinética de fosforilación de MAPp38 y ERK 1/2.
- ❖ Analizar la fosforilación de MAPp38, y ERK 1/2.
- ❖ Analizar la fosforilación de MAPp38 y ERK 1/2 en presencia de inhibidores de MAPp38 y ERK 1/2.
- ❖ Analizar la concentración de IL-12 y TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos de monocitos incubados en ausencia y presencia de inhibidores de MAPp38 y ERK 1/2

6. Materiales y Métodos

6.1 Purificación de LPG de *Leishmania mexicana*

Para la obtención del LPG se partió de un stock de 10×10^7 parásitos, se lavaron con PBS pH 7.3 (NaCl, KCL, Na_2PO_4 , KH_2PO_4), la pastilla se resuspendió en cloroformo/metanol/agua (4:8:3 v/v) durante 30 min a temperatura ambiente. El residuo soluble fue delipidado en agua saturada con 1-butanol durante 18 horas a 4° C en agitación constante. Se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min a 4° C, el sobrenadante fue liofilizado y se lavó con cloroformo metanol (2:1v/v). El residuo se fraccionó por cromatografía de interacción hidrofóbica disuelta en acetato de amonio 0.1M. El LPG fue eluído con un gradiente lineal de 1-propanol (5:70v/v) por hora. Se utilizó polimixina B para garantizar la ausencia de contaminantes con LPS. La pureza del LPG fue analizada en un gel de bis-acrilamida al 10% tiñéndolo con plata para verificar la ausencia de contaminantes.

6.2 Purificación de monocitos de sangre periférica (sujetos sanos).

Se obtuvo sangre periférica humana de sujetos sanos. 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 4° C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en solución lítica (NH_4Cl , KHCO_3 , Na_2EDTA), para romper los eritrocitos. Posteriormente se agregó PBS frío para lavar. Se centrifugó a 1200 rpm a 4° C durante 10 minutos. Para eliminar plaquetas se diluyeron las células en 10 ml de PBS y se agregó el plasma. Se centrifugó a 800 rpm por 10 minutos a 20 ° C. Se quitó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS 1x para lavar. Se tomó una alícuota de la suspensión para contar las células y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min a 4° C.

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

Se colocó la columna (LS) en el separador MACS, se lavó con 3X3 ml de PBS, y se colocó la suspensión. Una vez realizado esto, se colectaron las células y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos a 4° C. Simultáneamente se tomó una alícuota y se contó. La pastilla que se obtuvo se resuspendió en medio RPMI-1640 (GIBCO) estéril y se colocó un millón de células/ ml en cajas de baja adherencia (Costar No. catalogo 3523) y se dejó reposando toda la noche en una incubadora a 37° C con 5% CO₂.

6.3 Análisis de la pureza de las células purificadas

Los monocitos se resuspendieron en 200 μ l de PBS y se tiñeron en una proporción 1:4 con los anticuerpos monoclonales anti-CD14 (MACS) humano conjugado con el fluorocromo Ficoeritrina (PE). Después de agregar los anticuerpos las muestras se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y se centrifugaron a 850 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 400 μ l de regulador (fluorescent-activated cell sorting).

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

6.4 Determinación de la viabilidad de monocitos

Se determinó la viabilidad de las células mediante la utilización de azul tripano. Los monocitos obtenidos se resuspendieron en 40 ml de PBS y se tomaron 50 µl de la suspensión de células y 50 µl de azul de tripano para el conteo. Se añade una gota de la suspensión diluida de células a la cámara de Neubauer. Se cuenta el número de células que hay en cada uno de los cuatro cuadrantes de 4x4 casillas. Como el volumen de las zonas que se cuenta es $1 \times 1 \times 0.1 \text{ mm}^3 = 0.1 \text{ ml}$ cada una, el número de células que tenemos en la suspensión será: media de los números de las cuatro zonas $\times 10^4 \times 2 = \text{núm. células/ml}$

El azul Tripano es una molécula coloreada de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células que tienen la membrana alterada. Por tanto una célula viva en perfecto estado se observará incolora mientras que una célula muerta o muy alterada se observará azul. De este modo se puede determinar la viabilidad celular.

6.5 Ensayo de interacción de MAPp38 y ERK 1/2

6.5.1 Cinética de Fosforilación.

Una vez purificadas las células se realizó una cinética de fosforilación de las cinasas MAPp38 y ERK 1/2, utilizando como estímulo LPS de 100 ng/ml por cada condición a diferentes tiempos: 2, 10, 15, 30 y 60 minutos así como una condición basal de monocitos solo con medio este será utilizado como control positivo. De la misma manera los monocitos se dejaron interaccionar con el LPG de *Leishmania mexicana* durante 2, 10, 15, 30 y 60 minutos respectivamente.

Después del tiempo de interacción, las células se colocaron en tubos de 15 ml y se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos a 4° C. Una vez transcurrido este tiempo los sobrenadantes se decantaron y los pellets se resuspendieron en 1 ml de PBS y se pasaron a tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min a 4° C.

6.5.2 Lisis de monocitos

Las células obtenidas se resuspendieron en regulador de lisis RIPA modificado que es una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa que contiene Tris-HCl, pH 7.4 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaF 10 mM, NP-40 1%. Para lisar las células se colocaron 30 μ l de regulador por millón de células, durante 15 o 20 minutos en vortex-hielo. Se observó la lisis de los monocitos al microscopio usando azul de tripano y una vez que se observó la lisis se centrifugó a 12000 rpm a 4° C durante 10 minutos. El pellet se desechó y del sobrenadante se hicieron alícuotas que se guardaron a -70° para posteriormente determinar proteína.

6.5.3 Determinación de proteína por el método de DC (compatible con detergente)

Para la determinación de proteína de sobrenadantes se utilizó el método de DC (Biorad) compatible con detergentes y los datos fueron extrapolados en una curva estándar de albumina sérica bovina (BSA). Como blanco se utilizó el amortiguador de lisis RIPA modificado y se determinó la concentración de proteína con 5 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 (BIO-TEK Instruments) y los datos se analizaron en el programa KC4 v 2 para obtener las concentraciones de proteína en pg/ml.

6.5.4 Inmunodetección de MAPp38 y ERK por Western-blot

El análisis de las cinasas MAPp38 y ERK 1/2 se realizó por ensayos de Western-blot en geles de poliacrilamida al 10%. Las muestras obtenidas de los extractos de los monocitos se ajustaron a la misma concentración de proteína y posteriormente se les agregó amortiguador 2 x (Glicerol, buffer 6.8, azul de bromofenol, pironina y β -mercaptoetanol), se hirvieron por 3 minutos a 95° C, y posteriormente las

muestras se cargaron en el gel para separar las proteínas y se corrieron a voltaje constante (120 V).

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

La membrana transferida se bloqueó con 3% de BSA en TBST 1 X durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó 4 veces con TBST 1 X. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: MAPp38 (C-20), p-MAPp38 (D-8), ERK1/2 (K-23) y p-ERK 1/2 (E-4), todos de la marca Santa Cruz Biotechnology, SA, dilución 1:5000 con 1% de BSA en TBST 1 X y se dejaron toda la noche a 4° C en agitación constante. Al día siguiente se retiró el anticuerpo y se lavó la membrana con TBST 1 X. Se agregó un segundo anticuerpo (anti-ratón, conejo) conjugado con peroxidasa de rabano a una dilución 1:5000 con 1% de BSA en TBST 1 X durante 2 horas a temperatura ambiente. Se desechó el anticuerpo y se lavó durante 2 horas con TBST 1 X. Finalmente a la membrana se le colocó en una solución de sustrato + luminol por 3 minutos y se reveló por quimioluminiscencia utilizando placas de revelado de la marca Kodak. Posteriormente las placas fueron, analizadas en un analizador de imágenes (Multimage AlphaNotech). Las bandas fueron analizadas por densitometría.

6.6 Efecto de inhibidores de MAPcinastas

Para demostrar el papel de MAPp38 y ERK 1/2 en la regulación de la respuesta inducida por LPG de *Leishmania mexicana* se analizó el efecto de inhibidores de estas vías.

Una vez obtenido el tiempo óptimo de la cinética de fosforilación de los monocitos estimulados con LPS y LPG de *Leishmania mexicana*, se realizaron ensayos para

observar la fosforilación de estos monocitos en presencia de inhibidores específicos de MAPp38 y ERK 1/2.

Se utilizó SB203580 de la marca Santa Cruz SA, USA un inhibidor selectivo de MAPp38 p38 y PD98059 de Santa Cruz un inhibidor SA, USA selectivo de MEK cinasa. Los inhibidores se disolvieron en dimetil formamida a una concentración de 1 M.

Los monocitos se pre-incubaron durante 2 horas con los inhibidores (se analizó la viabilidad de las células después del tiempo de interacción). Posteriormente los monocitos se incubaron en diferentes condiciones. Las células se lavaron y lisaron en un regulador de lisis (RIPA). A los extractos celulares se les determinó proteína por el método de DC. Las muestras obtenidas se analizaron por ensayos de Western-blot con los anticuerpos fosforilados de MAPp38 y ERK 1/2.

6.7 Análisis de la producción de citocinas

Los monocitos se preincubaron con los inhibidores SB203580 y PD98059 durante 2 horas. Posteriormente a los monocitos se les estimuló con LPS y LPG de *Leishmania mexicana* en el tiempo establecido previamente. De la misma manera se trataron monocitos sin preincubación con los inhibidores.

Los sobrenadantes de los cultivos de monocitos se colectaron después de 24 horas de incubación. Los niveles TNF- α e IL-12 fueron determinados por ensayos de ELISA tipo sándwich.

Para este tipo de ensayo se utilizaron placas de la marca Costar de 96 pozos de fondo plano tratadas para ELISA. El anticuerpo de captura se colocó en una placa de 96 pozos de fondo plano. Previamente se diluyó cada citocina en un regulador de unión (regulador de fosfato dibásico de sodio 0.1 M a pH 9.0 (Na₂HPO₄)). La concentración se calculó de acuerdo a la citocina a determinar. Para TNF- α fue de 4 μ l/ml, y para IL-12 (p40 Humano) 2 μ l/ml, se colocaron 50 μ l de cada stock de citocinas por pozo, la caja se tapó y se dejó a 4^o C por un mínimo de 10 horas. Posteriormente se lavó la placa en un lavador de ELISA EL_x50 con una solución compuesta por PBS 1 X y 0.01% de Tween 80. Se bloqueó la placa con solución

bloqueadora (NaOH 0.1 N, caseína y PBS 1 X pH 7.4), se agregaron 200 μ l por pozo y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavó la placa y se colocaron 100 μ l de cada una de las concentraciones de la curva estándar y de las muestras y se dejó 2 horas a 4° C. Se lavó la placa y se colocaron 100 μ l por pozo del anticuerpo de detección y se incubó durante 1 hora. Se lavó la placa y se agregó Estreptavidina fosfatasa alcalina (GIBCO BRL No. catalogo 19542-018), se incubó durante 30 minutos. Después se lavó la placa y se colocó la solución reveladora compuesta por regulador de sustrato y pNPP (p-Nitro phenylphosphato), se agregaron 100 μ l por pozo y se dejó interaccionar a temperatura ambiente y en la obscuridad de 15 a 60 minutos. La placa se leyó aproximadamente cada 5 minutos en un lector de ELISA para microplacas (EL 312e BIO TEK INSTRUMENTS a 405 nm), con la ayuda de un programa KC4 que proporciona las concentraciones de las citocinas de las muestras. Finalmente las concentraciones de cada citocina se expresaron en pg/ml se graficaron en barras.

6.8 Pruebas estadísticas

Los resultados de la secreción de las citocinas fueron procesados para obtener promedios (media \pm DE) por citocina (pg/ml) y por cada condición basal, con LPS y con LPG de *Leishmania mexicana* y comparando los grupos entre sí. La evaluación estadística se realizó con la prueba U de Mann-Whitney, considerando que existen diferencias estadísticamente significativas cuando el valor $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1 Purificación de células

El porcentaje de pureza de las células fue analizado por citometría de flujo. Es importante señalar que los monocitos a pesar de que son purificados a partir de un gradiente de Ficoll y una columna de CD14, pueden estar contaminados con otro tipo celular por eso es necesario realizar este tipo de análisis. En la figura 14 se puede observar el porcentaje de pureza de los monocitos que equivale a un 84.3%. Este experimento representa uno de 4 experimentos que se realizaron a las células purificadas.

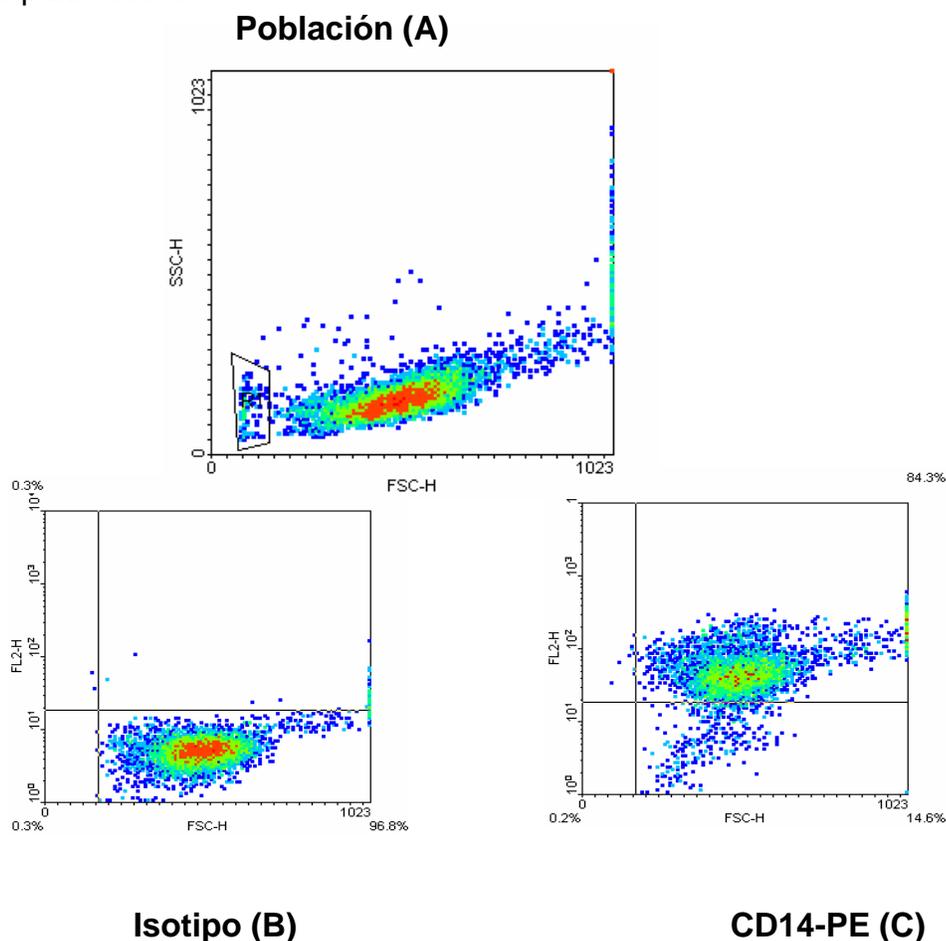


Figura 9. Análisis de la purificación de monocitos de sangre periférica por citometría de flujo.

(A) Población completa de células. (B) Marcaje de células con Isotipo.

(C) Marcaje de células con anti-CD14 Ficoeritrina.

7.2 Cinética de fosforilación

Se evaluó la activación de las cinasas (MAPp38 y ERK 1/2) en monocitos a través de la detección de sus formas fosforiladas en residuos (tirosina y treonina) por la técnica de Western-blot con el uso de anticuerpos fosfocinasas específicos.

7.2.1 Fosforilación de MAPp38 en monocitos estimulados con LPS

Para ambas cinasas (MAPp38 y ERK 1/2) se realizaron cinéticas de tiempos de activación de la fosforilación. Los monocitos se estimularon con LPS que fue utilizado como control positivo. Se analizaron diferentes tiempos, 2, 10, 15, 30 y 60 minutos. Como se muestra en la figura 10 en el panel A, el tiempo óptimo de fosforilación de MAPp38 fue de 10 minutos. En el panel B se muestra el control de carga de la proteína cinasa p38 y en el panel C se observa la fosforilación específica que resulta de la división de la proteína entre la forma fosforilada, determinadas por densitometría.

7.2.2 Fosforilación de ERK 1/2 en monocitos estimulados con LPS

Para analizar la activación óptima de la cinasa ERK 1/2 se estimularon los monocitos con LPS a diferentes tiempos 2, 10, 15, 30 y 60 minutos. Se observó que se presentó la fosforilación a partir de los 2 minutos de interacción, alcanzando su pico máximo de fosforilación a los 10 minutos, como se muestra en la Figura 11 en el panel A. En el panel B se muestra el control de carga de la proteína cinasa ERK 1/2 y en el panel C se observa la fosforilación específica que resulta de la división de la proteína ente la forma fosforilada, determinadas por densitometría.

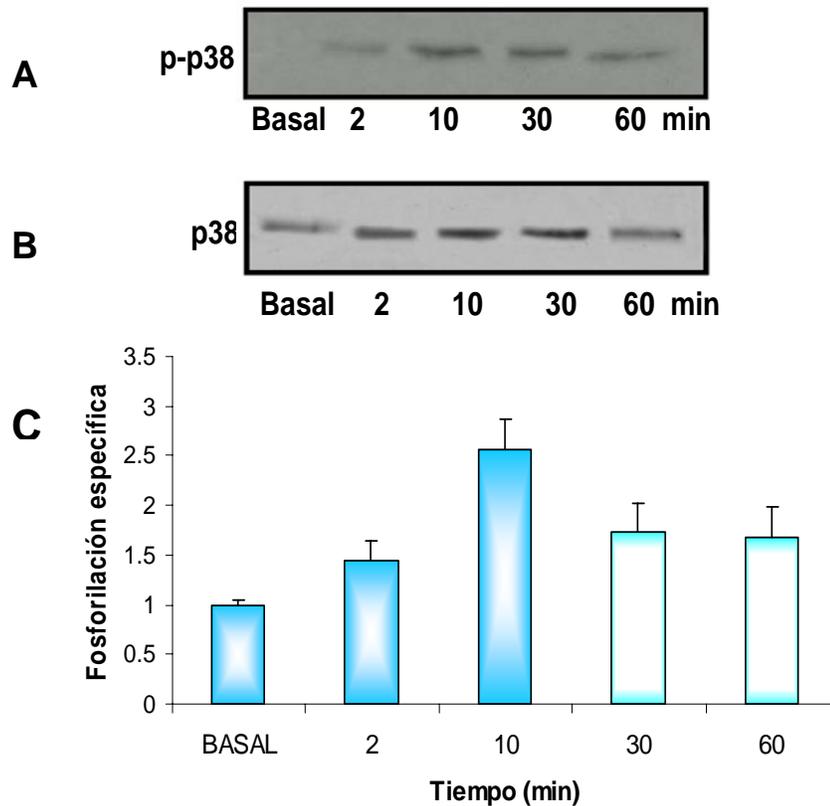


Figura 10. Cinética de fosforilación de la cinasa MAPp38 en monocitos estimulados con LPS.

(A) Presencia de la forma fosforilada de MAPp38. (B) Identificación de la cinasa MAPp38. (C) Fosforilación específica de MAPp38. Los resultados muestran el promedio de 3 experimentos realizados por separado. Basal (monocitos sin estímulo) 2, 10, 30, 60 tiempos de interacción con LPS.

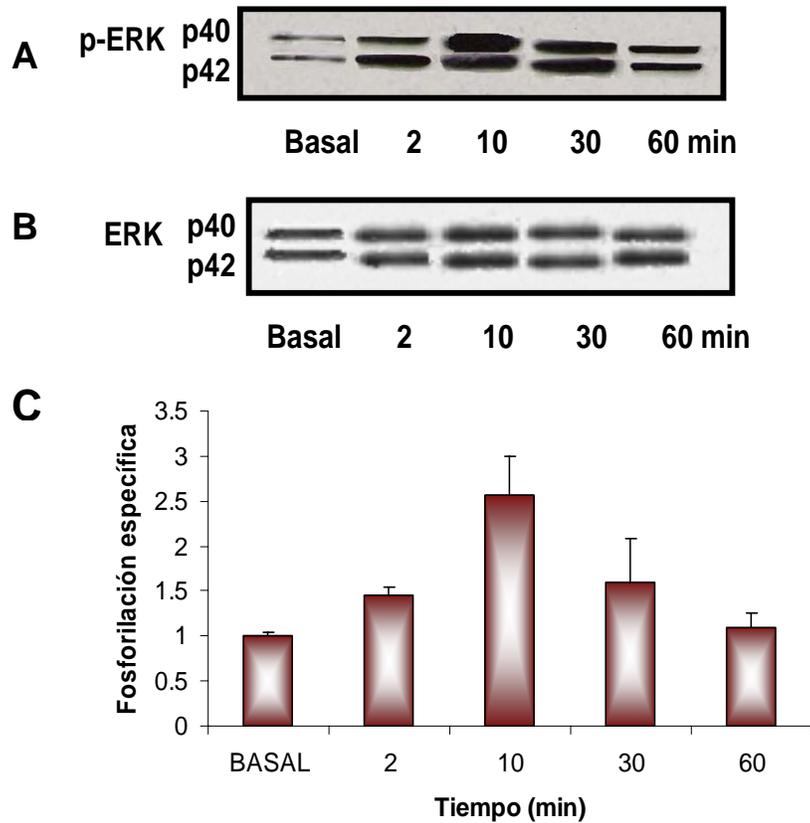


Figura 11. Cinética de fosforilación de la cinasa ERK 1/2 en monocitos estimulados con LPS.

(A) Presencia de la forma fosforilada de ERK 1/2. (B) Identificación de la cinasa ERK 1/2. (C) Fosforilación específica de ERK 1/2. Los resultados muestran el promedio de 3 experimentos realizados por separado. Basal (monocitos sin estímulo) 2, 10, 30, 60 tiempos de interacción con LPS.

7.2.3 Fosforilación de MAPp38 en monocitos estimulados con LPG

Los ensayos de Western-blot mostraron que LPG de *L. mexicana* induce la fosforilación de MAPp38 y ERK 1/2 a partir de los 2 minutos de interacción. El pico máximo de fosforilación ocurrió a los 15 minutos para la cinasa MAPp38. En la figura 12 en el panel A se muestra la forma fosforilada de MAPp38. En el panel B el control de carga de la cinasa p38 y en el panel C la fosforilación específica de MAPp38.

7.2.4 Fosforilación de ERK 1/2 en monocitos estimulados con LPG

Para la cinasa ERK los monocitos estimulados con LPG de *L. mexicana* alcanzaron un pico máximo de fosforilación a los 10 minutos y esta fosforilación disminuye a medida que transcurre el tiempo como se ve en la Figura 13.

Estos resultados muestran que LPG de *Leishmania mexicana* es capaz de inducir la fosforilación de MAPp38 a los 15 minutos y de ERK a los 10 minutos.

La fosforilación de ERK se presentó más temprano en comparación con la fosforilación de MAPp38.

El LPG de *L. mexicana* induce la activación de las cinasas MAPp38 y ERK en monocitos humanos.

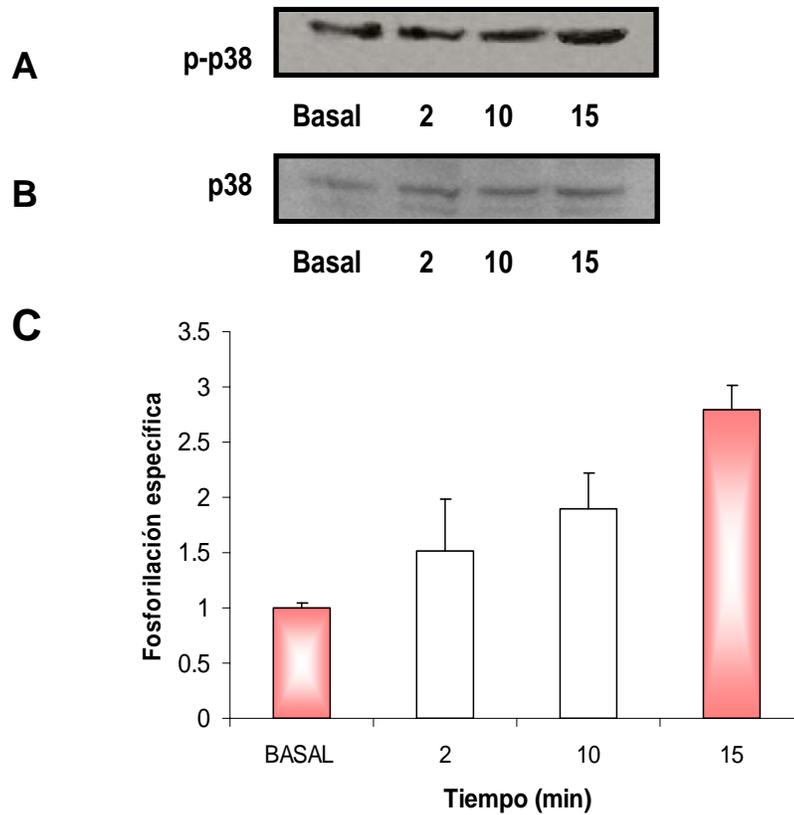


Figura 12. Cinética de fosforilación de la cinasa MAPp38 en monocitos estimulados con LPG de *Leishmania mexicana*.

(A) Presencia de la forma fosforilada de MAPp38. (B) Identificación de la cinasa MAPp38. (C) Fosforilación específica de MAPp38. Los resultados muestran el promedio de 3 experimentos realizados por separado. Basal (monocitos sin estímulo) 2, 10, 30, 60 tiempos de interacción con LPG de *Leishmania mexicana*.

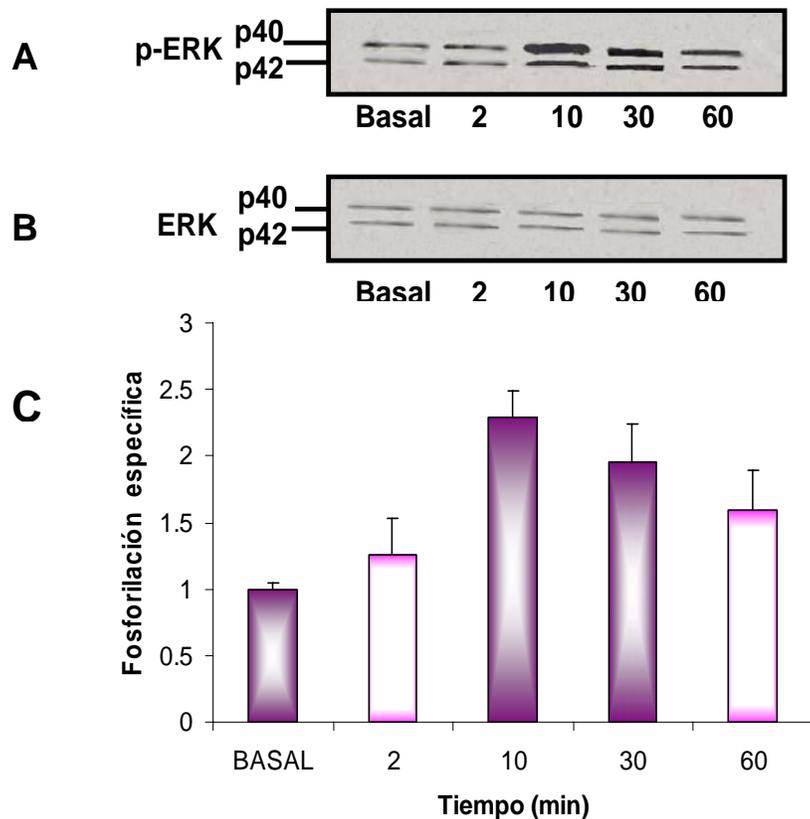


Figura 13. Cinética de fosforilación de la cinasa ERK 1/2 en monocitos estimulados con LPG de *Leishmania mexicana*.

(A) Presencia de la forma fosforilada de ERK 1/2. (B) Identificación de la cinasa ERK 1/2. (C) Fosforilación específica de ERK 1/2. Los resultados muestran el promedio de 3 experimentos realizados por separado. Basal (monocitos sin estímulo) 2, 10, 30, 60 tiempos de interacción con LPG de *Leishmania mexicana*.

7.3 Efecto de inhibidores de MAPp38 y ERK

Las MAPquinasas son moduladoras importantes de la secreción de citocinas como TNF- α e IL-12. El estímulo con LPG de *L. mexicana* indujo la fosforilación de las MAPquinasas MAPp38 y ERK 1/2. En resultados obtenidos por Carrada y col 2006, mostraron que LPG de *L. mexicana* induce la secreción de IL-12, IL-18, IL-15 y TNF- α en monocitos humanos.

El objetivo de este trabajo fue analizar la participación de las cinasas MAPp38 y ERK 1/2 en la secreción de citocinas como IL-12 y TNF- α en monocitos humanos estimulados con LPG de *L. mexicana*. Inicialmente se analizó el efecto de inhibidores específicos de cada cinasa MAPp38 (SB203580) a una concentración de 10 μ M y ERK (PD98059) a 40 μ M.

Las condiciones que se emplearon para este ensayo fueron: (1) Monocitos sin estímulo (Basal), (2) Monocitos estimulados con LPS, (3) Monocitos pre-incubados con el inhibidor SB203580 y estimulados con LPS, (4) Monocitos estimulados con LPG de *L. mexicana*, (5) Monocitos pre-incubados con el inhibidor SB203580 y estimulados con LPG de *L. mexicana*, (6) Monocitos con el inhibidor SB203580.

En la figura 14, se muestra el efecto del inhibidor de la cinasa MAPp38 de monocitos estimulados con LPS y LPG de *Leishmania mexicana*. Como se muestra en el panel A, se presenta una inhibición de un 22% de la forma fosforilada de MAPp38, en presencia del inhibidor cuando las células fueron estimuladas con LPS, y un 19 % cuando las células fueron estimuladas con LPG de *L. mexicana*, tomando como 100 % de fosforilación de la cinasa en la condición de monocitos estimulados con LPS y LPG respectivamente en ausencia de inhibidores.

Las condiciones que se emplearon para este ensayo fueron: (1) Monocitos sin estímulo (Basal), (2) Monocitos estimulados con LPS, (3) Monocitos pre-incubados con el inhibidor PD98059 y estimulados con LPS, (4) Monocitos estimulados con LPG de *L. mexicana*, (5) Monocitos pre-incubados con el inhibidor PD98059 y estimulados con LPG de *L. mexicana*, (6) Monocitos con el inhibidor PD98059. En la Figura 15, se muestra la inhibición de la fosforilación de la cinasa ERK 1/2 de monocitos estimulados con LPS y LPG de *Leishmania mexicana* respectivamente. Los monocitos estimulados con LPS sufrieran una inhibición de un 25% en la expresión de la fosforilación de ERK 1/2 y un 29% de inhibición de la fosforilación cuando fueron estimuladas con LPG de *Leishmania mexicana*, tomando como 100 % de fosforilación de la cinasa, la condición de monocitos estimulados con LPS y LPG respectivamente en ausencia de inhibidores. Observamos que el efecto del inhibidor de ERK (PD98059) en monocitos humanos se comporta de manera similar al efecto del inhibidor de MAPp38.

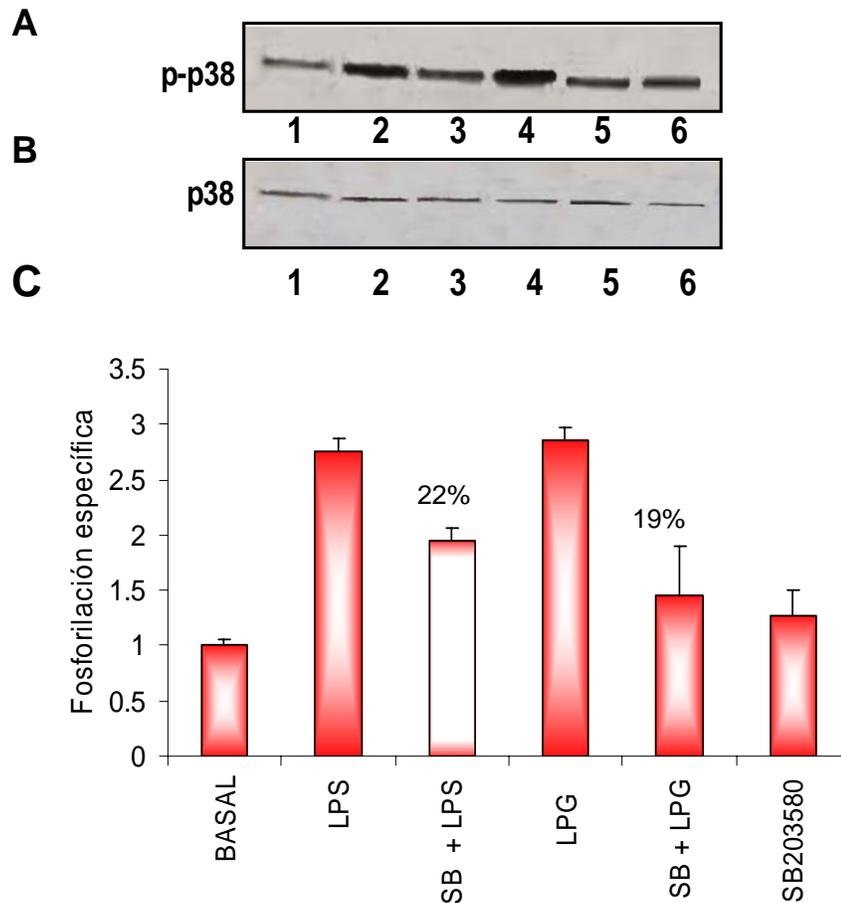


Figura 14. Efecto del inhibidor de MAPp38 (SB203580) en monocitos humanos estimulados con LPS y LPG de *Leishmania mexicana*.

(A) Presencia de la forma fosforilada de MAPp38. (B) Identificación de la cinasa MAPp38. (C) Fosforilación específica de MAPp38. Los resultados muestran el promedio de 3 experimentos realizados por separado. Condiciones: Basal (monocitos sin estímulo) LPS, SB203580 + LPS, LPG, SB203580 + LPG de *Leishmania mexicana*, Inhibidor de MAPp38 SB203580.

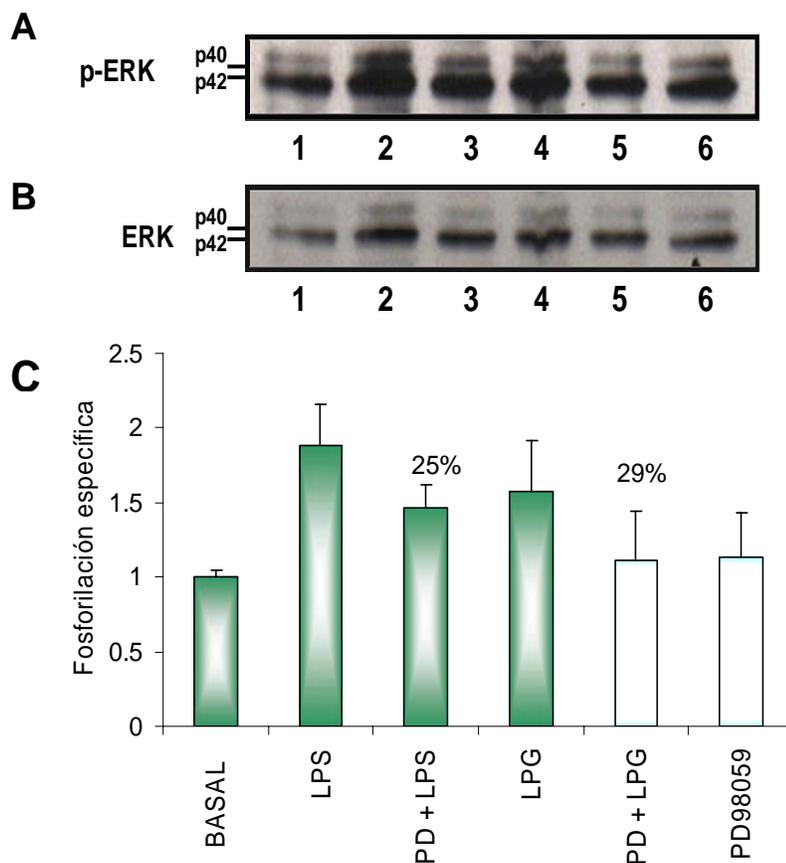


Figura 15. Efecto del inhibidor de ERK (PD98059) en monocitos humanos estimulados con LPS y LPG de *Leishmania mexicana*.

(A) Presencia de la forma fosforilada de ERK 1/2. (B) Identificación de la cinasa ERK 1/2. (C) Fosforilación específica de ERK 1/2. Los resultados muestran el promedio de 3 experimentos realizados por separado. Condiciones: Basal (monocitos sin estímulo) LPS, PD98059 + LPS, LPG, PD98059 + LPG de *Leishmania mexicana*, Inhibidor de ERK 1/2 PD98059.

7.4 Producción de citocinas

Una vez analizado el efecto de los inhibidores de MAPp38 y ERK 1/2 sobre la activación de las cinasas se evaluó la participación de MAPp38 y ERK 1/2 en la secreción de citocinas por monocitos. Para estos ensayos se analizaron las citocinas TNF- α e IL-12.

Es importante mencionar que se analizó la viabilidad de los monocitos después de la preincubación con los inhibidores y esta fue mayor al 90 %. En el análisis de la participación de la cinasa p38 en la producción de TNF- α se analizaron las siguientes condiciones: (1) Monocitos sin estímulo, (2) Monocitos estimulados con LPS, (3) Monocitos pre-incubados con el inhibidor de MAPp38 (SB203580) y estimulados con LPS, (4) Monocitos estimulados con LPG de *L mexicana*, (5) Monocitos pre-incubados con el inhibidor SB203580 y estimulados con LPG de *L mexicana* y (6) Monocitos con el inhibidor SB203580.

En la Figura 16 se observa la producción de TNF- α por monocitos estimulados con LPS y LPG de *Leishmania mexicana*. Cuando los monocitos se pre-incubaron con el inhibidor SB203580 y se estimularon con LPS, se presentó una disminución en la producción de TNF- α del 27% en comparación con el control de monocitos en ausencia del inhibidor estimulados con LPS. Por otro lado, cuando los monocitos se pre-incubaron con el inhibidor SB203580 y se estimularon con LPG se observó una disminución del 24 % en comparación con el basal de monocitos y estimulados con LPG en ausencia del inhibidor. En estos resultados no se encontraron diferencias significativas.

En el análisis de la participación de la cinasa ERK 1/2 en la producción de TNF- α se analizaron las siguientes condiciones: (1) Monocitos no estimulados, (2) Monocitos estimulados con LPS, (3) Monocitos pre-incubados con el inhibidor de ERK 1/2 (PD98059) y estimulados con LPS, (4) Monocitos estimulados con LPG de *L. mexicana*, (5) Monocitos pre-incubados con el inhibidor PD98059 y estimulados con LPG de *L. mexicana* y (6) Monocitos con el inhibidor PD98059.

En la Figura 17, se muestra la inhibición de la cinasa ERK 1/2 en la producción de TNF- α . Cuando los monocitos fueron pre-incubados con el inhibidor de ERK y estimulados con LPS se observó una disminución del 62% en la producción de TNF- α , en comparación con el control de monocitos en ausencia del inhibidor y estimulados con LPS. Por otro lado cuando los monocitos se pre-incubaron con el inhibidor y se estimularon con LPG de *Leishmania*, se observó una disminución del 37 % en comparación con el control de monocitos estimulados con LPG en ausencia del inhibidor. Para ambos casos se observó una diferencia significativa $p < .029$ entre el control y los monocitos pre-incubados y estimulados con LPS y LPG respectivamente, analizado por el método estadístico de U Mann-Whitney.

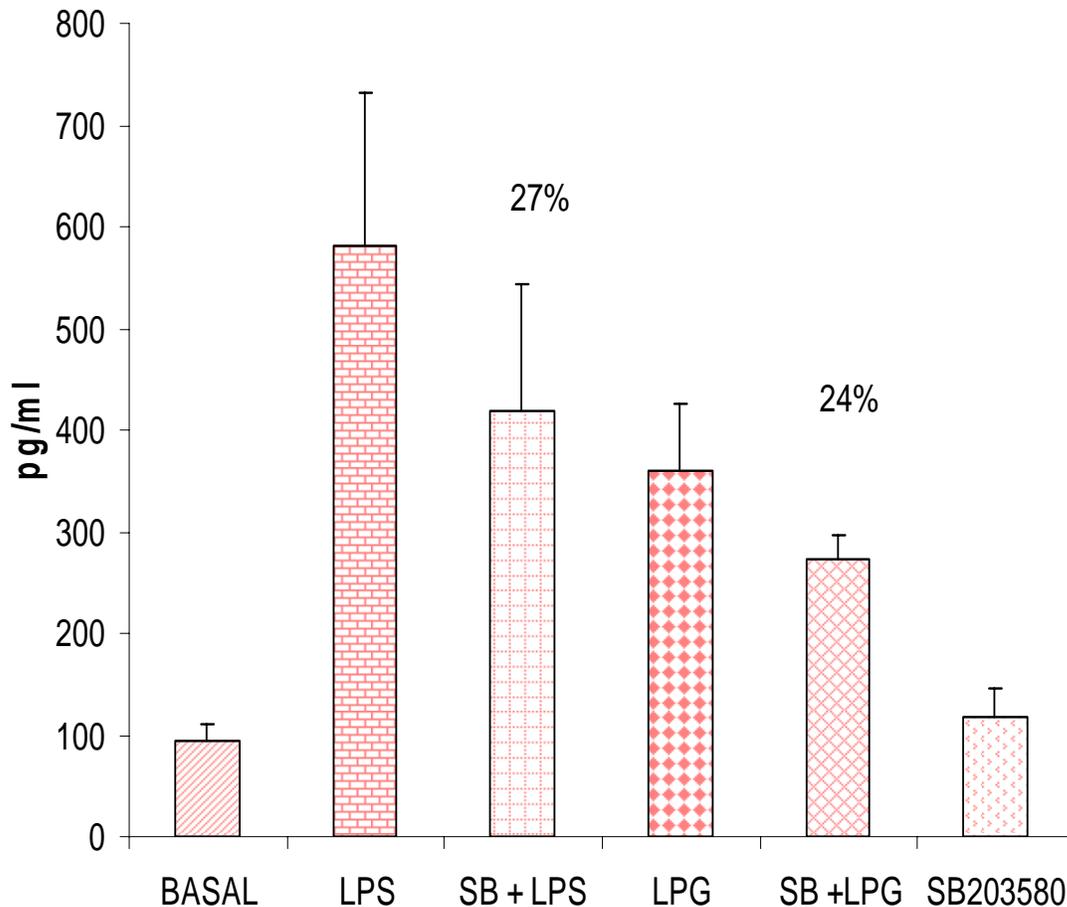


Figura 16. Producción de TNF- α en monocitos humanos incubados con el inhibidor de MAPp38 (SB203580). (A) Concentración de de TNF- α en pg/ml. (1) Monocitos sin estímulo, (2) Monocitos estimulados con LPS, (3) Monocitos pre-incubados con el inhibidor de MAPp38 (SB203580) y estimulados con LPS, (4) Monocitos estimulados con LPG de *L. mexicana*, (5) Monocitos pre-incubados con el inhibidor SB203580 y estimulados con LPG de *L. mexicana* y (6) Monocitos con el inhibidor SB203580. Los resultados muestran el promedio de 3 experimentos realizados por separado. No se observan diferencias significativas.

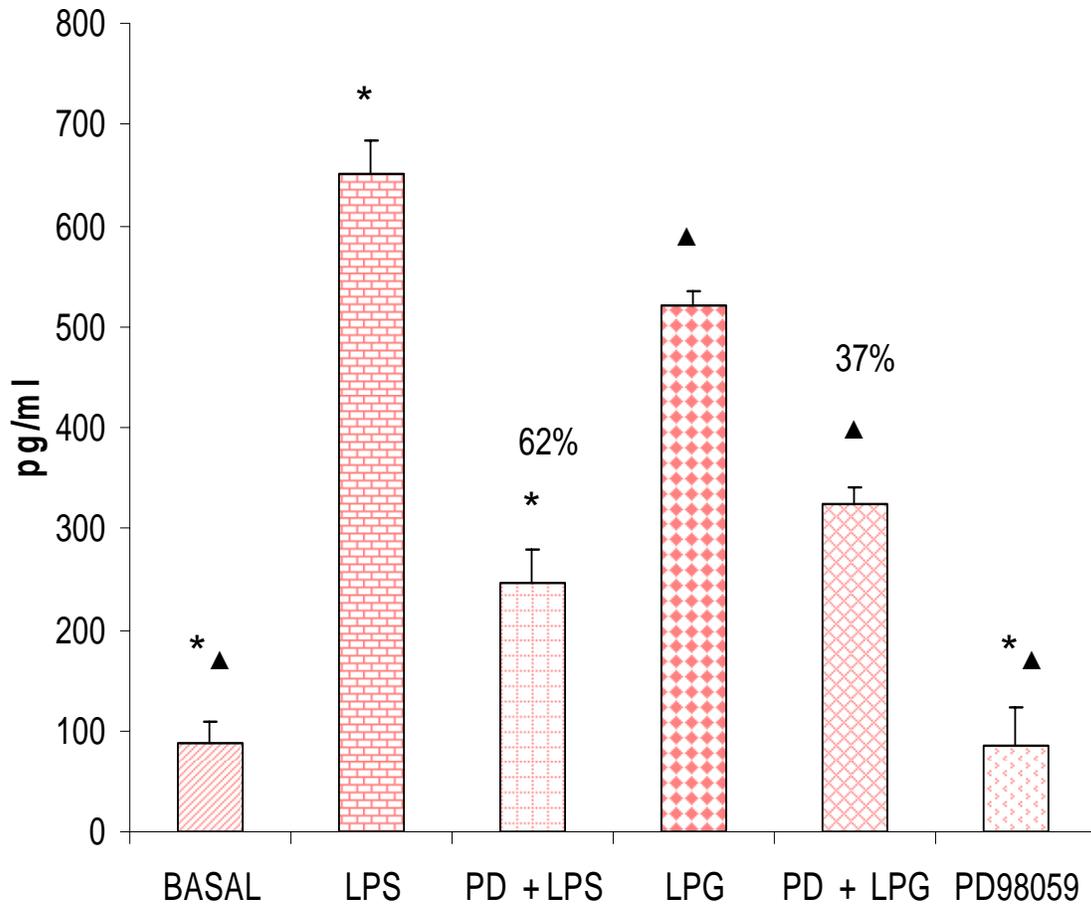


Figura 17. Producción de TNF- α en monocitos humanos incubados con el inhibidor de ERK (PD98059). (A) Concentración de la producción de TNF- α en pg/ml. (1) Monocitos sin estímulo, (2) Monocitos estimulados con LPS, (3) Monocitos pre-incubados con el inhibidor de ERK (PD98059) y estimulados con LPS, (4) Monocitos estimulados con LPG de *L mexicana*, (5) Monocitos pre-incubados con el inhibidor PD98059 y estimulados con LPG de *L mexicana* y (6) Monocitos con el inhibidor PD98059. Los resultados muestran el promedio de 3 experimentos realizados por separado *Diferencia significativa $p < .05$.

En el análisis de la participación de la cinasa MAPp38 la producción de IL-12, se utilizaron las siguientes condiciones: (1) Monocitos sin estímulo, (2) Monocitos estimulados con LPS, (3) Monocitos pre-incubados con el inhibidor de MAPp38 (SB203580) y estimulados con LPS, (4) Monocitos estimulados con LPG de *L mexicana*, (5) Monocitos pre-incubados con el inhibidor SB203580 y estimulados con LPG de *L mexicana* y (6) Monocitos con el inhibidor SB203580. En la Figura 18 se muestra la participación de la inhibición de MAPp38 en la secreción de IL-12 por monocitos humanos estimulados con LPS y LPG de *Leishmania*. La producción de IL-12 disminuyó 50 % en monocitos pre-incubados con el inhibidor y estimulados con LPS, en comparación con el control de monocitos estimulados en ausencia del inhibidor y estimulados con LPS. Por otro lado cuando los monocitos se pre-incubaron con el inhibidor SB203580 y se estimularon con LPG se observó una disminución del 44 % en la producción de IL-12, en comparación con el control de monocitos estimulados con LPG en ausencia del inhibidor. Para ambos casos se observó una diferencia significativa $p < .029$ entre el control y los monocitos pre-incubados y estimulados con LPS y LPG respectivamente, analizado por el método estadístico de U Mann-Whitney.

En el análisis de la participación de la cinasa ERK 1/2 en la secreción de IL-12, se analizaron las siguientes condiciones:(1) Monocitos sin estímulo, (2) Monocitos estimulados con LPS, (3) Monocitos pre-incubados con el inhibidor de ERK (PD98059) y estimulados con LPS, (4) Monocitos estimulados con LPG de *L mexicana*, (5) Monocitos pre-incubados con el inhibidor PD98059 y estimulados con LPG de *L mexicana* y (6) Monocitos con el inhibidor PD98059. En la Figura 19 se muestra la participación de la inhibición de ERK 1/2 en la secreción de IL-12 por monocitos estimulados con LPS y LPG de *Leishmania mexicana*. La producción de IL-12 disminuyó 60 % en monocitos pre-incubados con el inhibidor y estimulados con LPS, en comparación con el control de monocitos en ausencia del inhibidor y estimulados con LPS. Por otro lado cuando los monocitos se pre-incubaron con el inhibidor PD98059 y se estimularon con LPG se observó una disminución del 45 % en la producción de IL-12, en comparación con el control de monocitos estimulados con LPG en ausencia del inhibidor. Para ambos casos se observó una diferencia significativa $p < .029$ entre el control y los monocitos pre-incubados y estimulados con LPS y LPG respectivamente, analizado por el método estadístico de U Mann-Whitney.

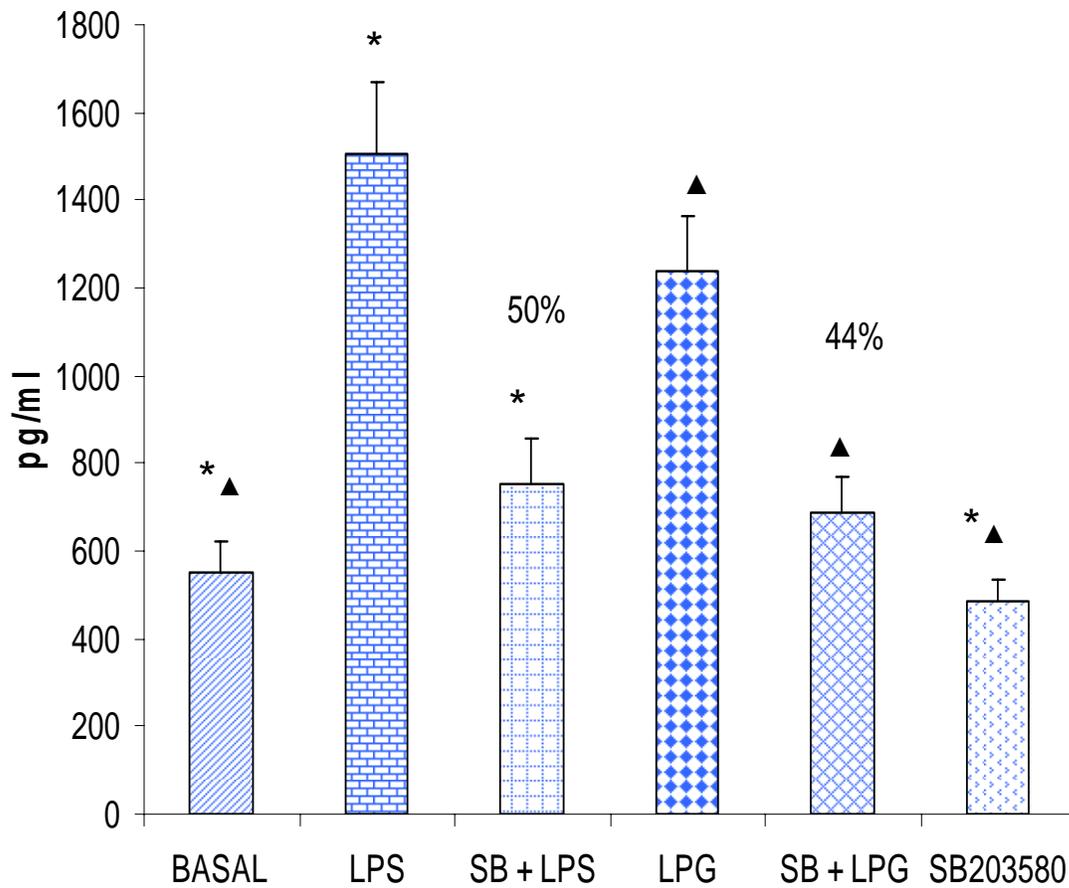


Figura 18. Producción de IL-12 en monocitos humanos incubados con el inhibidor de MAPp38 (SB203580). (A) Concentración de la producción de IL-12 en pg/ml. (1)-Monocitos sin estímulo, (2)-Monocitos estimulados con LPS, (3)- Monocitos pre-incubados con el inhibidor de MAPp38 (SB203580) y estimulados con LPS, (4)- Monocitos estimulados con LPG de *L mexicana*, (5) Monocitos pre-incubados con el inhibidor SB203580 y estimulados con LPG de *L.mexicana* y (6)- Monocitos con el inhibidor SB203580. Los resultados muestran el promedio de 3 experimentos realizados por separado *Diferencia significativa $p < .05$.

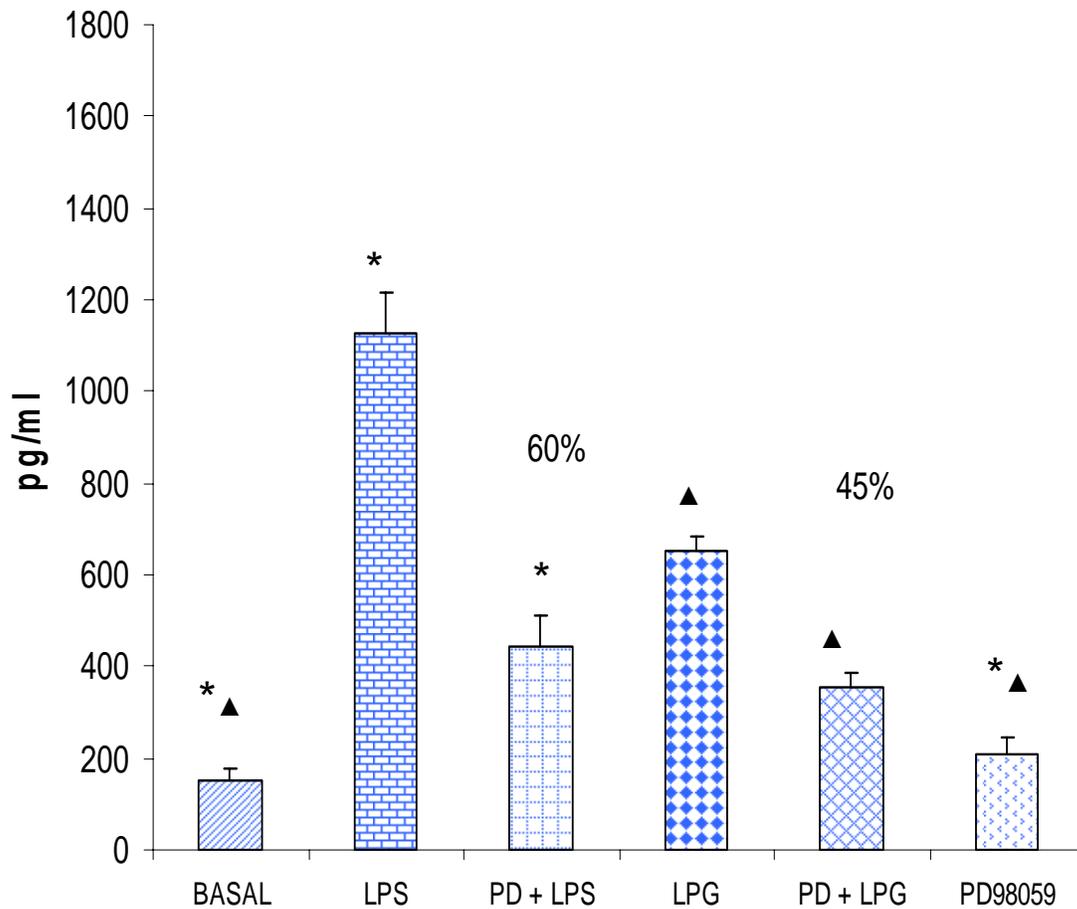


Figura 19. Producción de IL-12 en monocitos humanos incubados con el inhibidor de MAPp38 (PD98059). (A) Concentración de la producción de IL-12 en pg/ml. (1) Monocitos sin estímulo, (2) Monocitos estimulados con LPS, (3) Monocitos pre-incubados con el inhibidor de ERK (PD98059) y estimulados con LPS, (4) Monocitos estimulados con LPG de *L mexicana*, (5) Monocitos pre-incubados con el inhibidor PD98059 y estimulados con LPG de *L mexicana* y (6) Monocitos con el inhibidor PD98059. Los resultados muestran el promedio de 3 experimentos realizados por separado. *Diferencia significativa $p < .05$.

8. Discusión

Las vías de las MAPquinas regulan procesos como la proliferación o activación de células que juegan un papel importante en la regulación de funciones que participan en la inflamación y en la defensa del hospedero ⁽⁴¹⁾.

La interacción del parásito *Leishmania* con el macrófago puede dar como resultado la alteración intracelular de algunas vías de señalización entre las cuales podemos mencionar la vía de MAPquinas.⁽⁵⁸⁾

En este trabajo nosotros demostramos la activación de MAPp38 y ERK 1/2 con LPG de *Leishmania mexicana* en monocitos humanos.

Estudios previos han correlacionado la activación de la vía de las MAPquinas con el parásito de *Leishmania* ^(36, 57, 58). Usando, mutantes de LPG defectuosos se demostró que los promastigotes de *Leishmania donovani* requieren de la expresión de moléculas de LPG en el parásito para evadir la activación de ERK 1/2 ⁽⁵⁷⁾

Nosotros encontramos en los ensayos realizados en la cinética de fosforilación por Western-blot que MAPp38 y ERK se activan al ser estimulados con LPS y también demostramos que no existen diferencias en la activación de estas cinasas, ya que a los diez minutos de estímulo ambas cinasas presentaron una óptima fosforilación (Figura 10 y 11). Esto coincide con lo ya reportado en estudios previos realizados en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c que al ser estimulados con LPS presentan una activación de la fosforilación siendo la máxima a los 10 minutos ⁽³⁵⁾. Se sabe que el receptor para LPS es CD14 y este se puede asociar físicamente con un complejo proteico que incluye al TLR4 que pertenece a la familia de los Toll like. El receptor de LPS es capaz de inducir la fosforilación en residuos tirosina de un gran número de proteínas citoplasmáticas y la consiguiente activación de múltiples MAPquinas como MAPp38, que es activada en respuesta al LPS y a otros estímulos de estrés celular ⁽⁵⁹⁾. También se ha descrito que el LPS es capaz de activar a las cinasas ERK 1/2, a pesar de que estas proteínas han sido ampliamente relacionadas con procesos de proliferación ⁽⁴²⁾.

Por otro lado también observamos que el LPG purificado de *L. mexicana*, induce la fosforilación de MAPp38 y ERK 1/2 (Figura 12).

En nuestro estudio observamos que para el caso de la cinasa MAPp38 se presentó una fosforilación desde los 2 minutos de interacción con la molécula de LPG de *Leishmania mexicana* en monocitos humanos y alcanzó un pico máximo de fosforilación a los 15 minutos, disminuyendo esta fosforilación a medida que se incrementó el tiempo de interacción, esto es un dato nuevo e interesante ya que al compararlo con estudios previos realizados en la línea celular de macrófagos J774A.1 se muestra que promastigotes de *L. donovani* inducen una máxima fosforilación hasta los 30 minutos ⁽⁵⁷⁾. Para la cinasa de ERK 1/2 se observó que a los 10 minutos de interacción de los monocitos humanos estimulados con el LPG de *Leishmania mexicana* se presentó una mayor fosforilación y mientras transcurría el tiempo de interacción esta fosforilación disminuía. Es importante resaltar que la fosforilación de ERK se presentó más temprano en comparación con la fosforilación de la cinasa MAPp38 (Figuras 16 y 17). Esto representa sin duda un dato muy importante ya que solo se habían realizado estudios previos en macrófagos obtenidos de médula ósea de ratones BALB/c estimulados con promastigotes de *L. donovani* y mutantes de la molécula de LPG de *L. donovani* ⁽⁵⁷⁾. En este estudio realizado en macrófagos de médula ósea de ratones BALB/c se muestra que los promastigotes de *L. donovani* fosforilan a la cinasa MAPp38 a partir de los 5 minutos, presentándose el mismo caso para los mutantes de LPG de *L. donovani* y esta fosforilación se mantiene a medida que se incrementa el tiempo de interacción que es hasta los 60 minutos ⁽⁵⁷⁾. Para el caso de la cinasa ERK1/2 no se observó una fosforilación constante después de la interacción con los promastigotes de *Leishmania*, sin embargo cuando se estimulan los macrófagos con la molécula mutante de LPG de *L. donovani* se observa una fosforilación de la cinasa ERK 1/2 desde los 5 minutos ⁽⁵⁷⁾. Es importante señalar que las MAPcinasas pueden activarse por diferentes estímulos y de acuerdo al estímulo que originó esta activación se desencadenan diferentes tipos de respuesta. Por tal motivo, es muy importante conocer de que manera pueden comportarse estas moléculas en células humanas, como el macrófago, célula que

participa en la respuesta inmune, el parásito ha desarrollado estrategias evolutivas para evadir la respuesta inmune de su hospedero como multiplicarse, reproducirse, y sobrevivir regulando los mecanismos de transducción de señales y la producción de citocinas en estas células ⁽¹⁰⁾ que puede determinar el curso de la enfermedad y es ahí donde radica la importancia de esta enfermedad que afecta principalmente a los seres humanos.

Por otro lado se quiso demostrar si inhibidores específicos de las cinasas MAPp38 (SB203580) a una concentración de 10µM y ERK 1/2 (PD98059) a una concentración de 40µM, inhibían la fosforilación de MAPp38 y ERK 1/2 en presencia de LPS y LPG de *Leishmania mexicana*.

Inicialmente los monocitos fueron colocados en presencia de los inhibidores durante 2 horas y posteriormente fueron estimulados con LPS y LPG respectivamente en base al tiempo de fosforilación obtenido en ensayos anteriores previamente mencionados.

Los inhibidores SB203580 y PD98059 disminuyeron la fosforilación de MAPp38 y ERK 1/2 respectivamente en monocitos humanos infectados con LPG de *L mexicana*.

Al analizar la fosforilación de MAPp38, al estimular los monocitos con LPS en ausencia del inhibidor se observó que MAPp38 se fosforiló y cuando estos monocitos estuvieron previamente en contacto con el SB203580 un potente y selectivo inhibidor de MAPp38 esta fosforilación disminuyó un 22 % con relación al control de monocitos estimulados con LPS (Figura 14). En un estudio previo realizado en macrófagos murinos se observó que al utilizar SB203580 a una concentración de 5 µM durante 1 hora de pre-incubación con los macrófagos, disminuyó la fosforilación en mas del 60 %, en comparación con los macrófagos estimulados con LPS ⁽³⁵⁾. Nosotros encontramos para el caso de la cinasa ERK 1/2 una inhibición parcial del 25 %, cuando los monocitos fueron estimulados en presencia del inhibidor (PD98059) comparándolo con el control de monocitos estimulados con LPS (Figura 15). Estudios previos realizados en macrófagos murinos han mostrado que al utilizar el inhibidor específico de la cinasa ERK 1/2 en monocitos pre-incubados con PD98059 a una concentración de 40 µM, este

logró disminuir la fosforilación en casi un 50 % comparándolo con el control de LPS ⁽³⁵⁾. Por otra parte, cuando los monocitos fueron estimulados con LPG de *L. mexicana* en ausencia del inhibidor se observó que la cinasa MAPp38 se fosforiló y esta fosforilación se inhibió en un 19 % cuando los monocitos estuvieron en contacto previo con el inhibidor (SB203580) (Figura 14). En estudios previos realizados en macrófagos de la línea celular J774A.1 utilizando el inhibidor de MAPp38 a una concentración de 5 μ M y estimulados con LPG de *Leishmania donovani* se observó una inhibición del 68 % ⁽³⁶⁾. Para el caso de la cinasa ERK 1/2 al ser estimulada con LPG de *L. mexicana* en presencia del inhibidor PD98059 se observó una inhibición de 29 % en comparación con el control de LPG (Figura 20). Estudios previos reportan que en monocitos de la línea celular J774A.1 pre-incubados con el inhibidor PD98059 utilizado a una concentración de 40 μ M presentó una inhibición de mas del 50 % ⁽³⁶⁾.

Los inhibidores específicos de las MAPcinasas que utilizamos en este estudio no afectaron la viabilidad de las células y fueron adecuados para inhibir parcialmente la fosforilación de las cinasas al ser estimulados con LPG de *L. mexicana*. Antes del análisis de Western blot, hemos establecido que el patrón de activación de estas cinasas es diferente frente a ambos estímulos y por consiguiente la respuesta que se desencadena. Dichas diferencias pueden deberse a la habilidad del parásito para usar una gran variedad de receptores que facilitan su entrada al macrófago y probablemente este es un mecanismo de supervivencia. Quizá la utilización de uno u otro receptor depende de la especie de *Leishmania*, ya que pudieran depender de la expresión de LPG en la superficie del parásito. Existen un reporte que indican que posiblemente el LPG de *Leishmania major* en células NK puede unirse a TLR2 y como consecuencia activa a NF-kB ⁽⁵⁸⁾. Por otro lado las distintas condiciones ambientales o extracelulares en las que se encuentra cada población, puede jugar un papel importante, por ejemplo, el proceso de adhesión de los monocitos es suficiente para estimular la activación de la cinasa ERK ⁽⁶⁰⁾. Además, las poblaciones de monocitos circulantes o tisulares a diferencia de los macrófagos de la médula ósea, pueden haber recibido señales estimuladoras o inhibitoras durante su tránsito dentro del organismo o en el momento de su

aislamiento *in vitro*, mientras que los macrófagos obtenidos de médula ósea son células inmaduras no estimuladas que son diferenciadas *in vitro* bajo condiciones controladas, por esta razón los inhibidores podrían estar comportándose de una manera diferente en líneas celulares o monocitos de ratones. Esto destaca una vez más la importancia de entender los mecanismos de activación en células humanas.

Como ya hemos mencionado anteriormente, las MAPquinasas son moduladoras importantes de la secreción de citocinas como IL-12, TNF- α , y otras citocinas como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9 e IL-10, así como la generación de óxido nítrico ⁽⁴²⁾. Por otro lado se conoce que el LPG de *Leishmania donovani* modula la activación de MAPp38 y ERK, suprimiendo la producción de IL-12 y NO en macrófagos de la línea celular J774 A.1 ⁽³⁶⁾.

Por tal motivo en este trabajo hemos determinado, mediante la utilización de inhibidores específicos de MAPp38 y ERK 1/2, el papel que desempeña estas cinasas en la secreción de citocinas como TNF- α e IL-12.

Cuando los monocitos se colocaron en presencia del inhibidor de la cinasa MAPp38 SB203580 y se estimularon con LPS se obtuvo una disminución en la secreción parcial de TNF- α de un 27 %, la inhibición de esta cinasa (MAPp38) afectó la secreción de TNF- α en un 24 % en monocitos estimulados con LPG (Figura 16). En estudios realizados con macrófagos murinos de médula ósea se ha demostrado que los promastigotes de *Leishmania donovani* inducen la secreción de TNF- α ⁽⁵⁷⁾. En lo que se refiere a la cinasa ERK 1/2 cuando los monocitos estuvieron en presencia del inhibidor PD98059 se observó una disminución en la secreción de TNF- α de un 37 % con respecto al control después del estímulo con LPG. En el análisis estadístico para muestras independientes (*U de Mann-Whitney, Kolmogorov-Smirnov*) se observó que hubo diferencias significativas entre las diferentes condiciones con los estímulos de LPS y LPG.

En un estudio previo realizado por Carrada y col en el 2006 ⁽³⁴⁾, se muestra que el LPG de *L. mexicana* induce la secreción de IL-12, IL-18, IL-15 y TNF- α , así mismo comprueba que no existen diferencias en la producción de TNF- α por monocitos en pacientes con LCL y LCD. Sin embargo, al analizar de manera individual a los

pacientes con LCD, se encontró una correlación negativa entre la severidad clínica y la producción de TNF- α , conforme aumenta la severidad del padecimiento, disminuye la producción de esta citocina.

Sorprendentemente, las 2 MAPquinasas están implicadas en la regulación de la secreción de TNF- α inducida por el LPG, pero a diferentes niveles, ERK y MAPp38 regulan la producción de TNF- α principalmente a través de mecanismos aun no conocidos que son responsables de la activación y la respuesta inflamatoria. Resulta interesante analizar la participación de estas cinasas en monocitos de pacientes con LCL y LCD.

Estos datos sugieren que mientras MAPp38 y ERK parecen desempeñar un papel positivo en la producción de TNF- α , la activación de ERK 1/2 es mas crítica y necesaria para la producción de esta citocina.

A pesar de que se ha demostrado ampliamente en modelo murinos que IL-12 es muy importante para la resolución de la enfermedad, se sabe que los promastigotes de *L. major* pueden inhibir selectivamente *in vitro* como *in vivo* la producción de IL-12, tanto en ratones como en humanos. Entre los factores asociados para contar con una respuesta Th1 o Th2, esta la secreción de IL-12 e IL-10, por los macrófagos. La IL-12 induce la producción de IFN- γ por las células NK y una respuesta de tipo Th1, mientras que la IL-10 teniendo un efecto antagónico sobre el IFN- γ lleva a una respuesta de tipo Th2.

Se sabe que la producción de IL-12, en monocitos de pacientes con LCD, estimulados con LPG de *Leishmania*, también disminuye, cuando aumenta la severidad clínica del padecimiento ⁽³⁴⁾. Nosotros demostramos que la producción de esta citocina también se ve afectada al colocar las células previamente con los inhibidores de las cinasas en estudio. Para el caso de MAPp38 se observó que la producción de IL-12 disminuyó un 50%, cuando los monocitos estuvieron previamente en contacto con el inhibidor SB203580 y fueron estimulados con LPS con respecto al control de monocitos en ausencia del inhibidor y estimulados solo con LPS, sin embargo cuando los monocitos estuvieron previamente en contacto con el inhibidor y posteriormente fueron estimulados con LPG de *L mexicana* se observó una inhibición de 44%.(Figura 18). Para el caso de ERK 1/2 esta

producción disminuye un 60% en monocitos en presencia del inhibidor PD98059 y estimulados con LPS, mientras que la producción de IL-12 en monocitos estimulados con LPG de *Leishmania mexicana* disminuye en un 45% comparándolo con el control de monocitos, en ausencia del inhibidor y estimulados con LPG (Figura 19).

Es importante destacar que ambas cinasas parecen participar de manera importante en la producción de esta citocina ya que entre las condiciones de los monocitos en presencia y ausencia del inhibidor al ser estimulados con LPG se observan diferencias significativas. Estudios realizados en macrófagos peritoneales estimulados con LPS demuestran que MAPp38 y ERK son capaces de inducir la producción constitutiva de IL-12 donde PD98059 aumento la producción de IL-12 en una forma dependiente de la dosis lo que sugiere que ERK desempeña un papel regulador negativo, en cambio SB203580 inhibe la producción de IL-12 lo que indica que MAPp38 induce la producción positiva de esta citosina ⁽³⁵⁾. Por otro lado también se ha demostrado en macrófagos de la línea celular J774A.1 estimulados con un fosfoglicano sintético de *Leishmania donovani* que puede inhibir selectivamente la producción de IL-12 generada por las cinasas MAPp38 y ERK 1/2.

En otro estudio se reporta que cuando *Leishmania* infecta macrófagos murinos regula la transducción de señales mediante la vía de JAK/STAT modulando la producción de IL-12.

La inhibición de la vía de señalización de las MAPcinasas resulta benéfica para la supervivencia del parásito de *Leishmania* dentro de la célula hospedera utilizando mecanismos aun desconocidos.

La actividad leishmanicida es debido probablemente al incremento de la capacidad de los macrófagos de producir radicales oxígeno y radicales de nitrógeno en respuesta al interferon gamma (IFN- γ). *Leishmania* induce la producción de TNF- α por el macrófago el cual potencia la acción del IFN- γ y promueve la activación del macrófago, y TGF- β , asociado a la desactivación del macrófago e inhibición del IFN- γ . La sobrevivencia inicial de *Leishmania* dentro del macrófago puede

depender críticamente de la presencia de estas citocinas antagónicas que predominan en el microambiente de la infección.

Adicionalmente, la presencia de la infección por *Leishmania*, dentro del macrófago, interfiere con la presentación del antígeno lo que puede influenciar en el curso de la enfermedad.

Estos resultados destacan la participación de la activación de MAPp38 y ERK 1/2 y podemos sugerir que juegan un papel clave en las actividades biológicas de los macrófagos, en procesos tan importantes como la activación en respuesta a los estímulos externos, y su actividad es estrictamente necesaria para el desarrollo de algunos procesos como la producción de citocinas.

Hemos establecido que la activación de las cinasa ERK 1/2 es crítica para la determinación de algunas respuestas celulares. Sin embargo, desconocemos el mecanismo exacto por el cual, ERK 1/2 participa en alguno de estos procesos de activación en los macrófagos.

Una vez activadas, ERK 1/2 y MAPp38 son capaces de fosforilar y regular, ya sea positiva o negativamente, numerosas proteínas citoplasmáticas o pueden trasladarse al núcleo donde regulan la expresión de genes y con ello la modulación en la producción de citocinas ⁽⁴⁰⁾.

9.-Resumen de Resultados

- 1.-Se demostró que la mejor fosforilación inducida por LPS de MAPp38 y ERK fue a los 10 minutos.
- 2.-Encontramos que LPG de *L. mexicana* es capaz de estimular la fosforilación de MAPp38 a los 15 minutos y de ERK a los 10 minutos en monocitos humanos.
- 3.-Se observó que al estimular los monocitos con LPG de *L. mexicana* había fosforilación de MAPp38 y ERK y que cuando se colocaban en presencia de inhibidores específicos, esta fosforilación disminuía parcialmente en un 19% para MAPp38 y un 29% para ERK.
- 4.- La Inhibición de MAPp38 disminuyó la secreción de TNF- α e IL-12 en monocitos estimulados con LPG de *Leishmania mexicana*
- 5.- La inhibición de ERK disminuyó la secreción de TNF- α e IL-12 en monocitos estimuladas con LPG de *Leishmania mexicana*.

Este trabajo aporta datos importantes sobre posibles mecanismos relacionados con la activación de las MAPcinasas, MAPp38 y ERK 1/2 en monocitos humanos estimulados con LPG de *Leishmania mexicana*. Hasta el momento solo se habían reportado datos en líneas celulares y en modelos murinos. Es de gran importancia, realizar estudios en células de sujetos con LCL y LCD, que es en donde radica principalmente la infección por *Leishmania*. Entender los mecanismos de la modulación de la producción de citocinas, contribuiría a implementar medidas para mejorar la calidad de vida de las personas afectadas y quizá en un futuro con mas datos y trabajando en equipo, poder diseñar fármacos y tratamientos muy específicos para la resolución de la enfermedad.

10.-Conclusiones

- El LPG de *Leishmania mexicana* induce la fosforilación de MAPp38 y ERK 1/2 en monocitos humanos
- Las MAPcinasas MAPp38 y ERK 1/2 participan en la producción de TNF- α e IL-12 en monocitos humanos estimulados con LPG de *Leishmania mexicana*.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Miguel A, Hernández A, Alvarado N. 2001. Interleucinas e inmunidad innata Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología (CIINDE). Universidad de Guadalajara. Jalisco, México. Rev Bio. 12: 272-280.
- (2) International *Leishmania* Network, ILN. 1992. PAHO and Brazilian Research Council, CNPq.
- (3) Velasco C. O, Guzmán B. C, Sánchez R. B., Torrentera A. F, Hernández Márquez J G. 1994. Las leishmaniasis con especial referencia a México. Publicación Técnica del INDRE, - No. 7. 2ª Ed. Secretaria de Salud México
- (4) Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud Epidemiológica, Diagnostico, Tratamiento y control de la leishmaniasis en América Latina. 1994. Taller Interamericano sobre la leishmaniasis en las Americas. Nicaragua, C.A.
- (5) Velasco O, Savarino S, Walton B, Gam A and Neva F. 1989. Diffuse cutaneous leishmaniasis in México. Am J Trop Med Hyg. 41(3):280-288.
- (6) Feliciangelli M. D. 1990. Actualización sobre los aspectos de biología y ecología de *Lutzomyia* spp en las Américas. Mem I. Simp Lat Biol Control. Enf. Trop (México). MSAS Venezuela 36-52.
- (7) Handman E. 2000. Cell Biology of *Leishmania*. Advances in Parasitology, Vol 44.
- (8) Cunningham A. C. 2002. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. Experimental and Molecular Pathology, Vol 72, p 132 – 141.
leishmaniasis.WHO/TDR.<http://www.ars.usda.gov/diseases/leish/default.htm>
(Consultado en septiembre 2006)
- (9) Guha N A, Sullivan D R, and Turco S. J. 2001. Glycoconjugate Structures of Parasitic Protozoa. Glycobiology, Vol 11, no 4, p 45R – 59R.
- (10) Späth G, Garraway L, Turco S, Beverley S. 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian host. Proc Nat Acad. 100:9536-9541.

- (11) Descoteaux A, Turco S J, Sacks D L, Matlashewski G. 1991. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *J Immunol.* 146:2747–2753.
- (12) Mc Conville M, Turco S, Fegurson M and Sacks. D. 1992 Developmental Modification of lipophosphoglycan During the Differentiation of *Leishmania major* Promastigotes to an Infectious Stage. *EMBO.* 11:3593-3600.
- (13) Sacks DL, Brodin T and Turco S. 1990. Developmental Modification of the Lipophosphoglycan from *Leishmania major* Promastigotes During Metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 42:225-235.
- (14) Stafford J. L, Neumann N. F. and Belosevic. 2002 Macrophage-mediated innate defense against protozoan parasites. *Rev Microbiology.* 28: 187-248.
- (15) Awashti A, Ram K, Mathur and Bhaskar S. 2004. Immune Response to *Leishmania* Infection. *Indian J Med Res* 119, June, p 238 – 258.
- (16) Herdewalt B L. 1999. Leishmaniasis. *The Lancet*, Vol 354, October 2. 1191 – 99.
- (17) Handman E. and Bullen D. (2002). Interaction of *Leishmania* with the Host Macrophage. *Trends in Parasitology*, August, Vol 18, no 8, p 332 – 334.
- (18) Zambrano V, Rosales D, Carrero J, Ortíz L. 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 18: 272-278.
- (19) Ponte A, Heise D, Moll H. 2001. *Leishmania major* lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. *Immunol.* 104: 462-467.
- (20) Frankenburg S, Leibovici V, Mansbach N, Turco S, Rosen G. 1990. Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan. *J Immunol.* 145:4284-4289.
- (21) Sacks D and Noben N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Rev Immunol.* 2: 845-858.
- (22) Ding A H, Nathan C F, Stuehr D J. 1998. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 41: 2407

- (23) Chaudhri G and Clark IA. 1989. Reactive oxygen species facilitate the *in vitro* and *in vivo* lipopolysaccharide induced release of tumor necrosis factor, J Immunol. 143:1290.
- (24) Titus RG, Sherry B, Cerami A. 1989. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. J Exp Med. 170(6):2097-104.
- (25) Liew FY, Parkinson C, Millor S, Severn A, Carrier M. 1990. Tumor necrosis factor TNF- α in leishmaniasis. Immunol. 69:570-573.
- (26) Liew FY, Li Y, Millot S. 1990. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. J Immunol. 145(12):4306-10.
- (27) Sypek J P, Chung C L, Mayor S E, Subramanyam J M, Goldman S J, Sieburth D S, Wolf S F, Schaub R G. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: Interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. J Exp Med. 177(6):1797-802.
- (28) Heinzl FP, Rerko RM, Ahmed F, Pearlman E. 1995. Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. J Immunol. 155:730-739.
- (29) Jones D, Elloso MM, Showe L, Williams D, Trinchieri G, Scott P. 1998. Differential regulation of the interleukin-12 receptor during the innate immune response to *Leishmania major*. Infect Immunol. 66(8):3818-24.
- (30) Piedrafita D, Proudfoot L, Nikolaev AV. 1999. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans. Eur Immunol. 29: 235–44.
- (31) Belkaid Y, Butcher B, Saacks D. 1998. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in the *Leishmania*-infected cells. J Immunol. 28:1389-1400.
- (32) D Agostino P, Milano S, Arcoleo F, Di Bella G, La Rosa M. 2004. Interleukin-15, as Interferon-gamma, induces the killing of leishmania infantum in phorbol-myristate-acetate-activated macrophages increasing Interleukin-12. Scand J Immunol. 60 (6):609-614

- (33) Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero J, Ortiz-Ortíz L. 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 18, 272-78.
- (34) Georgina Carrada, Análisis cuantitativo del efecto que ejerce LPG de *Leishmania* sobre la producción de TNF- α , IL-12, IL-18 e IL-15 y la expresión de CD 40, B7-1 (CD 80) y B7-2 (CD86) en monocitos de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y diseminada. Tesis de Doctorado 2005.
- (35) Gui-JF, Goodridge HS, Harnett MM. 1999. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania* phosphoglycan subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol.* 163:6403–12.
- (36) Sridevi B, Vandana K, Singh, Poonam T, Reantala M. 2005. *Leishmania* lipophosphoglycan activates the transcripción factor activating protein 1 in J774A.1 macrophages through the extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinasa. *Molecular and Biochem parasitol.* 139: 117-127.
- (37) Nandan D R., Loand N E, Reiner. 1999. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* 67:4055–4063.
- (38) Philippe P, Roux J B. 2004. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions *Microbiol and molecul biology rev.* 68(2): 320–344.
- (39) Vitale G L, Bernardi et al. 2000. "Susceptibility of mitogen-activated protein kinase kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor." *Biochem J* 352: 739-45.
- (40) Treisman R. 1996. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Biol.* 8: 205-215
- (41) Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu B E, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Rev.* 22: 153-183.

- (42) Crews C, Alessandrini A, Erikson, R. 1992. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*. 258: 478-480.
- (43) Nick J A, Avdi N J, Gerwins P, Johnson G L, Worthen S. 2001 Activation of p38 Mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. *J Immunol* 156: 4867-487.
- (44) Johnson N L, Gardner A M, Diener K M, Lange C A, Gleavy J, Jarpe M B, Minden A, Karin M, Johnson L I, Johnson G L. 1996. Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase kinase induce cell death. *J Chem*. 271: 3229.
- (45) Mohammed A S, Khan J K, Theodore S S. 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAPkinase activation. 112:651-660.
- (46) Guntram A G, Michael K, Agnes W, Elke H, Martin A, Christoph E S, Erwin B, Ingo B A. 2003. Activation of NF- κ B and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasion protein is conferred by engagement of Rac1 and MAPkinase cascades. 5(1) 957-971.
- (47) Yue Zhang, Adrian T T, Kenneth B, Marcu and James Bliska. 2005. Inhibition of MAPK and NF- κ B Phathways is necessary for rapid Apoptosis in Macrophages infected with *Yersinia*. *J Immunol*. 174:7939-7949.
- (48) Young-Suk R, Jae-Ho C, Ju-Youn P. 2004. Involvement of MAPkinases in Apoptosis of Macrophage Treated with *Trichomonas vaginalis* *Yonsey Med J*. 45:741-754
- (49) Jae-Ho Chang, Ju-Youn. 2006. Dependence on p38 signalling in the up-regulation of TLR2, TLR4 y TLR9 gene expression in *Trichomonas vaginalis*-treated HeLa cells. *Immunol*. 118:167-170.
- (50) Seema R S, Majumdar, Vohra H. 2005. Activation of MAPK kinase pathway by Gal/GalNac adherence lectin of *E histolytica*: Gateway to host response. *Molecular and Celular Biochem*. 268:93-101.
- (51) Olivier M. 1996. Modulation of host cell intracellular Ca²⁺. *Parasitol today*. 12:145-150.

- (52) Gowdahalli K, Adeline M H, Jianzhong Z, Erika J, Douglass S U, Shizui A, Amina SW, Channe Gowda. 2005. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 280:8606-8616.
- (53) Reiner N E. 1987. Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin 1 response by *Leishmania donovani*. *J. Immunol*. 138:1919–1925.
- (54) Frankenburg S V, Leibovici N, Mansbach S, Turco J, Rosen G. 1990. Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan. *J. Immunol*. 145:4284–4289.
- (55) McNeely T B, Turco S J. 1987. Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 148:653–657.
- (56) Ran K M, Amit A, Pallawi W, Boppana R, Braskar Saha. 2004. Reciprocal CD40 signals through p38 MAPK and ERK 1/2 induce counteracting immune responses. *Nat. Med*. 10: 540-544
- (57) Prive C and Descoteaux A. 2000. *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein Kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naïve macrophages. *Eur J Immunol*. 30:2235-2244.
- (58) Michael J V, Joan M C, Tracey M B, Joseph A D Adrienne S. 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major* possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol*. 33:2822-2831.
- (59) Ulevitch R J., Tobias P S. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol*. 13 :437-457.
- (60) Hoog S S y Means A. 2001. Ca²⁺/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41: 471-505.
- (61) Fuente: www.ars.usda.gov/ve/leish.htm
- (62) McDowell M A and Sacks D L. 1999. Inhibition of cell signal transduction by *Leishmania* observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. *Current Opinion in Microbiology* 2(4): 438-443.