



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“INHIBICIÓN DE APOPTOSIS DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS POR EL PARÁSITO
INTRACELULAR *Leishmania mexicana*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

JOSÉ LEONARDO VALDÉS REYES

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH.

Facultad de Medicina



MÉXICO, D.F.

FEBRERO DE 2009.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis fue apoyado por el proyecto 45048-M y beca registrada con el número 194058 de CONACYT y los proyectos IN-229802 e IN-220207 de DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México.

El desarrollo de este proyecto de investigación y de esta tesis estuvo bajo la dirección y revisión de la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, en el Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

En este proyecto de investigación también participaron como miembros del comité tutorial el Dr. Julio Morán Andrade adscrito al Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular y el Dr. Andrés Castell Rodríguez adscrito al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, ambos de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La revisión de esta tesis estuvo a cargo de la Dra. Ana María Fernández Presas adscrita al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina y del Dr. José Angel Gutiérrez Pabello del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ambos de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece el apoyo de la Dra. Ingeborg Becker Fauser y de la Dra. Magdalena Aguirre García.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo fue reconocido con el primer lugar en la categoría de trabajos libres del 3^{er} Congreso Nacional de la Sociedad de Medicina Tropical, celebrado del 7 al 10 de Diciembre de 2005 en Acapulco, Guerrero.

Este proyecto de investigación fue presentado en el 11^o Congreso Internacional de Parasitología (11th International Congress of Parasitology, ICOPA XI) celebrado del 6 al 11 de Agosto de 2006 en Glasgow, Escocia; bajo el apoyo de la Fundación Bill & Melinda Gates.

DEDICATORIA

- ❖ A mi amigo y sobrino Jorge Gabriel por todos los buenos e inigualables momentos, por tu compañía, por ser una gran fuerza para continuar, por los juegos y por tu buena vibra... recuerda siempre que “todo gran poder conlleva una gran responsabilidad 🙌”.
- ❖ A mi papá, por tu lucha incansable de toda la vida 👍 ... a mi mamá, por tu apoyo en todo momento 🌸 ... para ambos mi agradecimiento, cariño y reconocimiento siempre.
- ❖ A Gabriela por buscar y mantener la fuerza para continuar ante cualquier situación.
- ❖ To my grandfather, for all your teachings, advice, support and trust... my affection for you, thank you for your collaboration in this work, and for everything... forever.
- ❖ A mi tía Lupe y a mi abuelita Catalina por su amistad, cariño y apoyo.
- ❖ A mi tío Carlos, a mi tía Beatriz y al Buffet Jurídico Reyes & Nava... gracias por la oportunidad de trabajar, todo el apoyo, la confianza y por reforzar ante todo el compromiso, dedicación y responsabilidad hacia el trabajo.
- ❖ Al Profesor Pedro Jardines por todas las enseñanzas a nivel académico y personal además de su amistad; mi admiración y aprecio como maestro y como persona 👍.
- ❖ A la Dra. Laila Gutiérrez por su confianza, apoyo, oportunidades, enseñanzas y sobre todo por su amistad... mi admiración a su labor profesional y en especial a la gran persona que es... gracias.

- ❖ A las personas del Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, con quienes tuve oportunidad de contar con su amistad y colaboración.
- ❖ A todas mis amigas y a todos mis amigos que durante este trayecto -desde el kinder hasta más allá de la Universidad 😊- se han hecho presentes para compartir juntos grandes momentos y hacerlo aun mejor ✌️.
- ❖ A Laura Irigoyen por tu amistad, compañía y apoyo de siempre; en particular por ese momento en el Congreso Nacional de Parasitología del 2002 en Guanajuato 😊... eres una gran y admirable amiga.
- ❖ A Sandra Camacho por tu amistad, cariño y compañía desde niños.
- ❖ A Julissa Avila por todos esos momentos especiales juntos, por las charlas, las risas, los recorridos interminables, por tu apoyo, tu amistad sin límites, tu ayuda, tu comprensión, tu cariño tan particular y mucho más... eres genial ✌️.
- ❖ A Marina Alba, Frida Chapa, Edgar Lona y Julio Guadarrama por todo lo que hemos compartido juntos desde siempre.
- ❖ A Oscar García, Genova Hernández, Daniel Sánchez y Eric Sánchez por las divertidas y prolongadas reuniones.
- ❖ A Alicia Vázquez, Angel Rivas, Eulalio Nava, Doris Martínez, Erika “Ticuín” Azorín, Francisco “Tendo” Villalobos, Gabriela González, Uriel Cid, Griselda Flores, Sandra “Tikitú” Marrufo, Judith García, Lorena Téllez, Mireya Martínez, Adriana Díaz, Victor Martínez y Yolanda Márquez... todos grandes compañeros y amigos 👍.

- ❖ A Cristina Aguilar, Gina Torres, Lucero Rodríguez, Dolores Monterrubio, Maggy Jiménez, Judith Sánchez, Hilda Rivera y Martha Aguilar por su amistad, apoyo y colaboración.

- ❖ A Griselda Solís por la siempre disponibilidad de los buffy coats del Banco de Sangre del Centro Medico Nacional Siglo XXI, ¡gracias!, además de tu gran amistad, buena onda y alegría constante... eres increíble ☆.

- ❖ A Brissia López, Guillermo Navarro, Norma Alvarez y Allan García que juntos formamos un gran equipo en el Diplomado.

- ❖ A Gabriela Jiménez, Martha Carrillo, Rocío Bernal, Araceli Flores, Francisco Osorio, Melissa Pardo y Nilcy Cruz por su amistad y divertidos momentos en el curso de Ingles.

INDICE

	Página
Indice	1
Glosario.....	4
Resúmen.....	7
Abstract.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	9
I.1. El sistema inmune.....	9
I.2. Principales células del sistema inmune.....	10
I.2.1. Monocitos.....	10
I.2.2. Células dendríticas.....	11
I.2.2.1. Subpoblaciones de células dendríticas.....	12
I.2.2.1.1. Células dendríticas de origen mieloide.....	13
I.2.2.1.2. Células dendríticas de origen linfoide.....	13
I.2.2.1.3. Desarrollo de células dendríticas de precursores inmediatos.....	14
I.2.2.1.4. Células dendríticas inmaduras.....	16
I.2.2.1.5. Células dendríticas maduras.....	17
I.3. El parásito <i>Leishmania</i>.....	17
I.3.1. Formas clínicas de leishmaniasis.....	19
I.3.1.1. Leishmaniasis visceral (kala-azar)	20
I.3.1.2. Leishmaniasis cutánea.....	20
I.3.1.3. Leishmaniasis mucocutánea.....	20
I.3.2. Respuesta inmune a <i>Leishmania</i>.....	20
I.3.3 Papel de las células dendríticas en la leishmaniasis	21

I.4. Apoptosis	23
I.4.1. Características morfológicas de la apoptosis.....	23
I.4.1.1. Las caspasas.....	24
I.4.1.1.1 Caspasa 3.....	25
I.4.2. Vías de inducción de apoptosis.....	26
I.4.2.1. La vía extrínseca.....	26
I.4.2.1.1. Vía de Fas/FasL.....	27
I.4.2.1.2. Vía de TNFR-1/TNF-α, DR-4,5/TRAIL....	27
I.4.2.1.3. Vía de perforina/granzima B.....	28
I.4.2.2. La vía intrínseca.....	28
I.4.2.3. Vía del retículo endoplásmico.....	29
I.4.2.4. Regulación de la apoptosis.....	30
I.5. Modulación de la apoptosis por organismos patogénicos.....	31
I.5.1. Modulación de la apoptosis por el parásito <i>Leishmania</i>.....	34
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	36
III. OBJETIVO.....	37
IV. HIPOTESIS.....	38
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
V.1. Purificación de células dendríticas derivadas de monocitos	
humanos (moDC)	39
V.2. Caracterización de las moDC.....	39
V.3. Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>.....	40
V.4. Tratamiento de las moDC.....	40
V.5. Análisis de viabilidad celular.....	41
V.6. Tinción con Giemsa.....	41

V.7. Análisis de fragmentación de la cromatina por TUNEL.....	41
V.8. Ensayo de fragmentación de DNA	42
V.9. Citometría de flujo de Anexina-V/IP.....	42
V.10. Análisis de la activación de caspasa 3 por fluorometría.....	43
V.11. Análisis de caspasa 3 por Western blot.....	44
VI. RESULTADOS	45
VI.1. Obtención y caracterización de monocitos de sangre	
periférica humana	45
VI.2. Diferenciación y caracterización de células dendríticas	
derivadas de monocitos humanos (moDC)	48
VI.3. <i>Leishmania mexicana</i> incrementa la viabilidad de las moDC.....	51
VI.4. Análisis morfológico de las moDC por tinción con Giemsa.....	53
VI.5. Tinción con TUNEL.....	55
VI.6. Ensayo de fragmentación de DNA	57
VI.7. <i>Leishmania mexicana</i> inhibe la exposición extracelular de	
fosfatidilserina inducida por camptotecina	59
VI.8. <i>Leishmania mexicana</i> inhibe el corte proteolítico de caspasa 3.....	63
VII. DISCUSIÓN.....	66
VIII. CONCLUSIÓN.....	71
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

GLOSARIO

APC	Células presentadoras de antígenos
Bid	Dominio de muerte que interactúa con BH-3
CCR	Receptor para quimiocinas
CD	Células dendríticas
CDp	Células dendríticas plasmacitoides productoras de interferón tipo I
CR3	Receptor del complemento 3
CTL	Linfocitos T citotóxicos
Cyt c	Citocromo c
DD	Dominios de muerte
DED	Dominios efectores de muerte
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERAD	Sistema de degradación asociado al retículo endoplásmico
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GIPL	Proteína unidora de glicoinositol
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos/macrófagos
IAP	Inhibidores de apoptosis
ICE	Enzima convertidora de IL-1 β
IFN-γ	Interferón γ
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12

IL-13	Interleucina 13
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
IP	Ioduro de propidio
JNK	Cinasa amino-terminal c-Jun
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacarido
Mϕ	Macrófagos
MCA	Metilcumarina
M-CSF	Factor estimulador de colonias de monocitos/macrófagos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad II
moDC	Células dendríticas derivadas de monocitos
MOMP	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
NF-κB	Factor nuclear κ B
NK	Células asesinas naturales
ON	Oxido nítrico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMP	Patrones moleculares asociados a organismos patogénicos
PARP	Polimerasa de poli-ADP ribosa
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PMN	Células polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconocimiento de patógenos
PS	Fosfatidilserina

RE	Retículo endoplásmico
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RNA	Acido ribonucleico
Tc1	Linfocitos T citotoxicos tipo 1
TH1	Respuesta inmune de linfocitos T cooperadores 1
TH2	Respuesta inmune de linfocitos T cooperadores 2
TLR	Receptores tipo Toll
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TRAF2	Factor 2 asociado al receptor de TNF
TRAIL	Apoptosis relacionada al ligando de TNF
TUNEL	Marcaje enzimático de fragmentos de ADN con dUTP-fluoresceína y TdT

RESUMEN

La *Leishmania mexicana* es un parásito protozoario intracelular que infecta principalmente a macrófagos (M ϕ) y células dendríticas (CD). Se sabe que este parásito inhibe la apoptosis tanto natural como inducida en M ϕ y neutrófilos, aunque los mecanismos implicados en esta supresión de la apoptosis no han sido determinados. En este trabajo analizamos el efecto que ejerce *Leishmania mexicana* sobre la apoptosis natural e inducida por camptotecina en células dendríticas derivadas de monocitos humanos. Demostramos que la co-incubación de las células dendríticas derivadas de monocitos (moDC) con promastigotes de *Leishmania mexicana* inhibe diversos patrones apoptóticos tales como condensación de la cromatina analizada por tinción con Giemsa, identificación de fragmentos de DNA de bajo peso molecular mediante tinción con TUNEL, fragmentación del DNA por electroforesis en gel y translocación de fosfatidilserina analizado por la unión con anexina-V. Encontramos que el efecto anti-apoptótico está asociado con una reducción significativa en la activación de la caspasa 3. La capacidad de *Leishmania mexicana* para retrasar la apoptosis de las células dendríticas puede tener implicaciones en la patogénesis al favorecer la invasión del hospedero y la persistencia en las células infectadas.

ABSTRACT

Macrophages (M ϕ) and dendritic cells (DC) are the major target cell populations of the obligate intracellular parasite *Leishmania*. Inhibition of host cell apoptosis is a method employed by multiple pathogens to ensure their survival in the infected cell. *Leishmania* has been shown to inhibit M ϕ and neutrophils from both natural and induced apoptosis. As shown in this study, apoptosis in monocyte-derived dendritic cells (moDC) induced by treatment with camptothecin was downregulated by coincubation with *L. mexicana*, as detected by morphological analysis of cell nuclei, TUNEL assay, gel electrophoresis of low m. w. DNA fragments, and annexin V binding to phosphatidylserine. The observed antiapoptotic effect was found to be associated with a significant reduction of caspase-3 activity in moDC. The capacity of *Leishmania mexicana* to delay apoptosis induction in the infected moDC may have implications for *Leishmania* pathogenesis by favoring the invasion of its host and the persistence of the parasite in the infected cells.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. El sistema inmune

El sistema inmune es de gran importancia para el reconocimiento primario de organismos patogénicos (Roos et al., 2004). La inmunidad protectora resulta de la interacción de dos sistemas cardinales:

- La inmunidad innata no específica de antígeno.
- La inmunidad adaptativa específica de antígeno.

El sistema inmune innato incluye varios componentes inmunoreguladores tales como el complemento, las células asesinas naturales (NK) y las células fagocíticas (monocitos/macrófagos, neutrófilos, células dendríticas), que reconocen organismos patogénicos y/o el daño en el microambiente tisular que resulta en una señal de peligro para las células de la inmunidad adaptativa (Palucka y Banchereau, 1999). La respuesta inmune innata es la primera respuesta del hospedero ante la entrada de organismos patogénicos y depende de receptores codificados en la línea germinal que tienen la capacidad de identificar patrones moleculares asociados a organismos patogénicos (PAMPs). Estas moléculas están altamente conservadas en la escala filogenética y están constituidas principalmente por carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Los receptores de estas moléculas se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Pancer y Cooper, 2006). Entre estos receptores se encuentran las moléculas CD14, el receptor de manosa, el DEC205 y los receptores de la familia Toll (TLR). Estos receptores se localizan en las células del sistema inmune innato presentes en las barreras epiteliales y reconocen antígenos no procesados (Palucka y Banchereau, 1999).

De manera contraria a esta vía de reconocimiento no clonal, se encuentra la respuesta inmune adaptativa en donde los constituyentes más importantes son los linfocitos T y B. Estas células se caracterizan por expresar, en grandes números de clones, distintos receptores para antígenos que son reconocidos de manera altamente específica. La gran diversidad de receptores se debe a la recombinación somática de los genes de estos

receptores de linfocitos B y T. Sin embargo, estas células específicas de antígeno no pueden distinguir estructuras inmunogénicas por lo que necesitan ser instruidas por las células del sistema innato. El vínculo esencial entre la inmunidad innata y adaptativa son las células presentadoras de antígenos (APC), en donde las células dendríticas (CD) son las inductoras más potentes de respuestas inmunes primarias y secundarias (Palucka y Banchereau, 1999). Este vínculo entre ambos tipos de respuesta ha quedado evidenciado por el papel central que tiene el sistema inmune innato en la polarización de la respuesta inmune adaptativa hacia células TH1, TH2 o respuestas humorales (Imhof y Aurrand-Lions, 2004).

I.2. Principales células del sistema inmune

Los diferentes tipos celulares del sistema inmune innato pueden interactuar unas con otras e influir en la calidad y potencia de una respuesta inmune (Moretta et al., 2006).

I.2.1. Monocitos

Los monocitos pertenecen al sistema fagocítico mononuclear y fueron inicialmente descritos como precursores circulantes de macrófagos tisulares. En un principio se identificaron por la expresión abundante del receptor para lipopolisacárido (LPS). Sin embargo, la identificación subsecuente de marcadores antigénicos de expresión diferencial mostró que los monocitos en sangre periférica humana son heterogéneos ya que muestran diferencias morfológicas como la variabilidad de tamaño, la granularidad y la morfología nuclear. Además también despliegan una enorme diversidad funcional, ya que llevan a cabo múltiples funciones de defensa desde la eliminación de organismos patogénicos por fagocitosis hasta la inducción de respuestas de células T específicas de antígeno. Este potencial funcional es esencial en el desarrollo de su plasticidad, permitiéndoles diferenciarse en distintas subpoblaciones de macrófagos y células dendríticas (León et al., 2005).

Los monocitos se originan en la médula ósea a partir de un progenitor mielóide común que comparten con los neutrófilos. Circulan en la sangre como monocitos y se diferencian en macrófagos tisulares o células dendríticas mieloides en la periferia (Imhof y Aurrand-Lions, 2004).

Debido a la expresión diferencial de CD14 y CD16, también conocido como FcγRIII, los monocitos se clasifican en dos subpoblaciones:

- Monocitos CD14^{hi}/CD16⁻, comúnmente llamados monocitos “clásicos” porque su fenotipo refleja la descripción original de estas células.
- Monocitos CD14⁺/CD16⁺, que expresan grandes cantidades de moléculas MHCII y CD32, también conocido como FcγRII, lo que sugirió que estas células son semejantes a los macrófagos tisulares maduros (Gordon y Taylor, 2005).

Estas dos grandes subpoblaciones de monocitos varían en el receptor para quimiocina (CCR), expresión de moléculas de adhesión, en propiedades de diferenciación y propiedades migratorias. Por ejemplo, en humanos, los monocitos “clásicos” expresan CCR2, CD64 y CD62L, mientras que los monocitos “no clásicos” CD14^{lo}/CD16⁺ carecen de CCR2 (Wu y Yong-Jun, 2007).

I.2.2. Células dendríticas

Las células dendríticas, llamadas así por la identificación de sus extensiones dendríticas (del griego “dendron” que significa árbol), son esenciales para el reconocimiento de una gran cantidad de antígenos y el control de la respuesta inmune (Steinman y Banchereau, 2007).

La evidencia experimental obtenida en la última década ha mostrado que el sistema de células dendríticas comprende una gran colección de subpoblaciones localizadas ampliamente en distintos órganos donde llevan a cabo funciones específicas (León et al., 2005). Estas células actúan como centinelas ya que capturan antígenos, migran a órganos linfoides y, después de un proceso de maduración, activan a linfocitos al presentar los antígenos procesados, induciendo respuestas inmunológicas adaptativas. Aunado a lo anterior se considera que las células dendríticas son elementos esenciales del sistema inmune debido a su capacidad para participar no solo en mecanismos de defensa primitivos que constituyen la inmunidad innata sino también en la inducción y regulación de respuestas inmunes específicas de antígeno. Este potencial funcional

múltiple permite a las células dendríticas controlar infecciones microbianas y por parásitos, así como crecimientos tumorales ya que ejercen una regulación precisa de la respuesta inmune de células T, células B y células NK. Además, inducen y mantienen la tolerancia de las células T neutralizando a los linfocitos T autoreactivos (Ardavín, 2005).

La descripción original de la primera subpoblación de células dendríticas fue hecha por Paul Langerhans en 1868, quien las describió como células nerviosas epidérmicas con forma estrellada. Posteriormente fueron identificadas morfológica (Birbeck, 1961), fenotípica (Rowden, 1977; Stingl, 1977) y funcionalmente como células pertenecientes al sistema inmunológico (Palucka y Banchereau, 1999).

Otra subpoblación de células dendríticas fue descrita por Ralph Steinman y Zanvil Cohn quienes las identificaron como células con aparentes dendritas localizadas en los órganos linfoides (Wan y Dupasquier, 2005).

1.2.2.1. Subpoblaciones de células dendríticas

La subpoblación de células dendríticas encontrada en humanos y modelos murinos incluyen a las células dendríticas plasmacitoides productoras de interferón tipo I (CDp) y a las células dendríticas convencionales (CDc) en los tejidos no linfoides, en la circulación y en tejidos linfoides. Las CDc residentes en tejidos linfoides incluyen a las CDc presentes en el timo, bazo y nódulos linfoides y consisten en subtipos fenotípicamente diferentes (Wu y Yong-Jun, 2007).

Las CDc se dividen también en subpoblaciones de acuerdo a su localización tisular, éstas son:

- a. Células dendríticas epiteliales como las células de Langerhans.
- b. Células dendríticas tisulares que incluyen a las células dendríticas de hígado, de pulmón, de corazón, de páncreas y de la dermis.
- c. Células dendríticas asociadas a tejidos linfoides que incluyen las células de la zona marginal esplénica, células interdigitantes asociadas a la zona T dependientes de ganglio linfático.

- d. Células dendríticas circulantes como las células dendríticas de sangre y linfa.

Además, las células dendríticas que no se encuentran en estado basal pero que se desarrollan después de una infección o inflamación incluyen a las células dendríticas derivadas de monocitos, las células dendríticas productoras de TNF- α y las células dendríticas que expresan la óxido nítrico sintasa (iNOS) (Naik et al., 2006).

I.2.2.1.1. Células dendríticas de origen mieloide

Las células dendríticas se consideraron inicialmente de origen mieloide. Los primeros estudios demostraron que los precursores mieloides de la médula ósea de ratón tenían la capacidad para generar macrófagos, granulocitos y células dendríticas en presencia de GM-CSF (Inaba et al., 1993). En estudios con células humanas se encontró un desarrollo similar en el que un precursor CD34⁺ derivado de médula ósea era diferenciado en monocitos CD1a⁻, en una población precursora de granulocitos y en una población precursora bipotencial con la capacidad para producir células dendríticas al ser cultivado en presencia de GM-CSF y TNF- α o en macrófagos al cultivarse en presencia de M-CSF (Reid et al., 1992). Otra evidencia del origen mieloide de las células dendríticas provino de estudios *in vitro* en donde los monocitos se diferencian en células dendríticas en presencia de GM-CSF e IL-4. Un fenómeno similar ha sido observado *in vivo* con monocitos tisulares subcutáneos (Randolph et al., 1999).

I.2.2.1.2. Células dendríticas de origen linfoide

Los primeros estudios sobre las células dendríticas tisulares residentes linfoides demostraron que las CDc tímicas, las subpoblaciones de CDc en el bazo de ratón y las células de Langerhans expresan marcadores asociados con células linfoides, incluyendo CD2, CD4, CD8 α , CD25 y BP1. Estos datos sugirieron que algunas células dendríticas podrían tener un origen linfoide. La primera evidencia directa de un origen linfoide fue demostrada por estudios en los que la transferencia de precursores linfoides intratímicos, que expresan cantidades bajas de CD4 dentro del timo, dieron origen a células T y células dendríticas CD8⁺ en recipientes irradiados. Asimismo, se demostró

que estos precursores tenían el potencial para generar CDc esplénicas CD8⁺ y CD8⁻ cuando eran inyectados de forma intravenosa (Wu et al., 1996).

El hecho de que tanto los progenitores mieloides y linfoides comunes son capaces de originar todos los subtipos de células dendríticas del bazo y del timo, no sólo demuestra que las células dendríticas pueden tener un origen mieloides o linfoides, sino que también indica que el fenotipo de las células dendríticas no es un reflejo de su linaje de origen (Wu y Yong-Jun, 2007).

1.2.2.1.3. Desarrollo de células dendríticas de precursores inmediatos

Los precursores que están en una etapa de desarrollo justo antes de la formación de una célula dendrítica son identificables fenotípicamente y se denominan precursores inmediatos de células dendríticas. Se identificaron y aislaron de sangre periférica de ratón y tienen la capacidad para diferenciarse *in vitro* en subpoblaciones maduras de células dendríticas. En el ratón se han descrito dos poblaciones de precursores de células dendríticas presentes en sangre:

- Las CD45RA⁻/CD11c^{int}/CD11b⁺ son una población que representa CD inmaduras que adquieren la morfología de CD maduras al cultivarse en presencia de TNF- α y la capacidad para estimular a las células T y producir IL-12 en respuesta a estímulos microbianos.
- Las CD45RA⁺/CD11c^{lo}/CD11b⁻ es una población que representa a las CDp. Estas células maduran a células semejantes a las CD únicamente en presencia de estímulos tales como CpG y GM-CSF. En estado maduro estimulan débilmente a las células T y producen grandes cantidades de IFN tipo I. Aunque esta población precursora de células dendríticas es capaz de diferenciarse en una población semejante a las CDc, su baja capacidad para presentar antígenos hacen de ésta una forma distinta a las CDc maduras (Krug et al., 2003).

Los monocitos también pueden diferenciarse en CD esplénicas durante un proceso inflamatorio mediado por GM-CSF (León et al., 2005).

Las células dendríticas pueden diferenciarse *in vitro* a partir de monocitos. Este sistema de diferenciación de monocitos *in vitro* no reproduce totalmente las condiciones fisiológicas que controlan la diferenciación de monocitos *in vivo*, pero es una buena herramienta para estudiar los factores que controlan la diferenciación de células dendríticas (León et al., 2005).

En sistemas murinos y humanos, los monocitos cultivados con GM-CSF e IL-4 se diferencian en células dendríticas inmaduras, caracterizadas por su baja expresión de moléculas MHCII y moléculas coestimuladoras. Se ha descrito que la diferenciación de monocitos de médula ósea de ratón a células dendríticas ocurre después de 24-48 horas en cultivo con GM-CSF e IL-4 (Leon et al., 2005). Bajo condiciones experimentales equivalentes, los monocitos de sangre humana toman más tiempo para generar células dendríticas (Ardavin, 2005). Sin embargo, existe un método alternativo para la generación de células dendríticas de monocitos humanos después de 24 horas de cultivo (Leon et al., 2005).

Se sabe que la IL-4 tiene un papel esencial como regulador de la diferenciación de monocitos en células dendríticas al bloquear el desarrollo a macrófagos. Se ha demostrado que esta citocina ejerce su efecto al inhibir la producción de M-CSF que es una citocina que dirige el desarrollo de macrófagos. Provoca una desregulación en la expresión del receptor de M-CSF y previene la pérdida de la expresión de la cadena α del receptor de GM-CSF. De manera contraria, el M-CSF actúa como un regulador negativo de la diferenciación de los monocitos a células dendríticas al inducir la producción autócrina de M-CSF y la expresión del receptor para M-CSF en los monocitos. Además, la IL-4 también puede influir en la producción de IL-12 inducida por LPS en células dendríticas derivadas de monocitos y en su capacidad para polarizar la respuesta de las células T cooperadoras en TH1 o TH2. En contraste, se ha demostrado que algunos componentes derivados de organismos patogénicos tales como los ligandos de TLR y mediadores inflamatorios, que normalmente inducen la maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos, pueden bloquear el desarrollo de estas células y promover su diferenciación a macrófagos (León et al., 2005).

Es de notar que en la generación de células dendríticas murinas y humanas no hay proliferación celular. Se han descrito también sistemas de diferenciación de células dendríticas en ausencia de citocinas exógenas. Randolph y colaboradores utilizaron un sistema experimental de migración transendotelial diseñado para imitar el proceso de diferenciación de monocitos en células dendríticas después de la extravasación y que la subpoblación de monocitos CD16⁺ es más eficiente en esta diferenciación a células dendríticas después de la transmigración inversa (Randolph et al., 1998).

Por otra parte, otros estudios sugieren que la diferenciación de monocitos hacia macrófagos, en comparación con la diferenciación hacia células dendríticas, está controlada por quimiotaxis, factores de activación y maduración, aunque los mecanismos reguladores precisos que determinan la adquisición de una especialización funcional de los monocitos bajo condiciones fisiológicas de homeostasis o inflamación e infección aún no son muy conocidos (Quah y O'Neill, 2005).

Las células dendríticas además de presentar diferencias de acuerdo a su origen y localización tisular, presentan diferencias funcionales relacionadas a un estado de maduración (Quah y O'Neill, 2005).

I.2.2.1.4. Células dendríticas inmaduras

Las células dendríticas que residen en tejidos periféricos no linfoides que no han sido estimuladas se considera que se encuentran en un estado inmaduro. Estas células están principalmente relacionadas con el reconocimiento y captura de antígenos. Por otro lado, las células dendríticas que tienen la capacidad de migrar a tejidos linfoides secundarios y estimular células T se definen como células dendríticas maduras. Esta terminología refleja el desarrollo funcional de las células dendríticas (Quah y O'Neill, 2005).

Las células dendríticas inmaduras se localizan en tejidos periféricos en estado inmune basal. Presentan características que les permiten identificar organismos patogénicos y facilitar su captura. Expresan una amplia variedad de receptores que pueden reconocer específicamente PAMPs. Entre estos receptores se encuentran TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-8 y TLR-9, que reconocen específicamente un gran número de moléculas

tales como lipoproteínas derivadas de procariontes, glicolípidos, flagelina, CpG de DNA y lipopolisacáridos. Las células dendríticas inmaduras expresan también varias lectinas tipo-C como CD207 en células de Langerhans, el receptor de manosa en células dendríticas de la dermis, DEC-205 en células de Langerhans y células dendríticas de la dermis y DC-SIGN en células dendríticas de la dermis, etcetera, que reconocen estructuras de carbohidratos en los organismos patogénicos. Una vez en contacto con el antígeno, las células dendríticas inmaduras utilizan diferentes vías para facilitar su captura. Estas incluyen la endocitosis mediada por receptores a través de lectinas tipo-C, Fc γ RII y Fc γ RIII, endocitosis, fagocitosis y macropinocitosis. Además, las células dendríticas inmaduras expresan integrinas $\alpha\beta$ 3, integrinas $\alpha\beta$ 5 y CD36 que facilitan la captura continua de material apoptótico. Una vez que los antígenos son internalizados a través de la vía endocítica, son procesados para ser presentados a los linfocitos en conjunto con las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) (Steinman et al., 2000).

I.2.2.1.5. Células dendríticas maduras

Las células dendríticas maduras tienen la capacidad de migrar a través de la linfa aferente desde órganos periféricos no linfoides hacia las áreas paracorticales abundantes en células T del tejido linfoide. Su maduración se caracteriza por la expresión en la superficie celular del complejo péptido/MHC junto con moléculas coestimuladoras. La maduración funcional culmina con la localización de las células en áreas ricas en células T de tejidos linfoides presentando péptidos del antígeno adquirido en la periferia, a través de MHC a las células T. Las moléculas de MHC se expresan 10-100 veces más en células dendríticas maduras que en células B y macrófagos. Las células dendríticas maduras también sobrerregulan la expresión de varias moléculas coestimuladoras incluyendo CD40, CD80, CD86 y la expresión de una nueva quimiocina, DC-CK-1 que atrae de manera preferente a células T vírgenes CD45RA⁺ (Turley et al., 2000).

I.3. El parásito *Leishmania*

Leishmania es un parásito protozoario intracelular obligado que fue descubierto por William Leishman y Charles Donovan en el bazo de pacientes que sufrían una enfermedad similar a la malaria y que en 1903 fue identificada como leishmaniasis

visceral. El agente causal de esta enfermedad fue llamado *Leishmania donovani* en honor a sus descubridores (McConville y Handman, 2007).

Leishmania presenta un ciclo de vida digenético y tiene dos formas morfológicas, el amastigote que es la forma intracelular, sin flagelo y no móvil y el promastigote que es la forma infectiva, con flagelo, móvil y presenta las fases procíclica y metacíclica. La diferenciación de promastigotes metacíclicos a amastigotes es una de las principales transiciones del desarrollo en el ciclo de vida de *Leishmania* y es un evento clave en el establecimiento de la infección en el hospedero mamífero. En esta diferenciación son muy importantes algunos factores microambientales tales como un leve aumento en la temperatura de entre 33-37 °C y la disminución del pH a 5.5, condiciones que se presentan en el fagolisosoma del macrófago (McConville y Handman, 2007).

Los amastigotes viven dentro de los fagolisosomas presentes en las células fagocíticas del hospedero vertebrado tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas. Los amastigotes son ingeridos por un mosquito hembra durante la picadura a un hospedero mamífero. Las especies de mosquitos transmisores de las diferentes especies de *Leishmania* son de la subfamilia Phlebotominae. El género *Phlebotomus* es el transmisor de las especies de *Leishmania* del Viejo Mundo y *Lutzomyia* de las especies del Nuevo Mundo. En estos insectos hematófagos el parásito desarrolla una serie de modificaciones morfológicas. Se diferencia de un promastigote procíclico unido a la pared del tracto del vector a un promastigote metacíclico incapaz de dividirse y de unirse a la probóscide lo que le permite migrar a otras partes del tracto digestivo. La capacidad infectiva máxima ocurre cuando el parásito ingiere sangre nuevamente, regurgita de 1-1000 promastigotes metacíclicos y se cierra el ciclo de vida. La coordinación de estos eventos le dan al parásito oportunidad óptima para infectar al hospedero vertebrado y perpetuar su ciclo (Shaha, 2006).

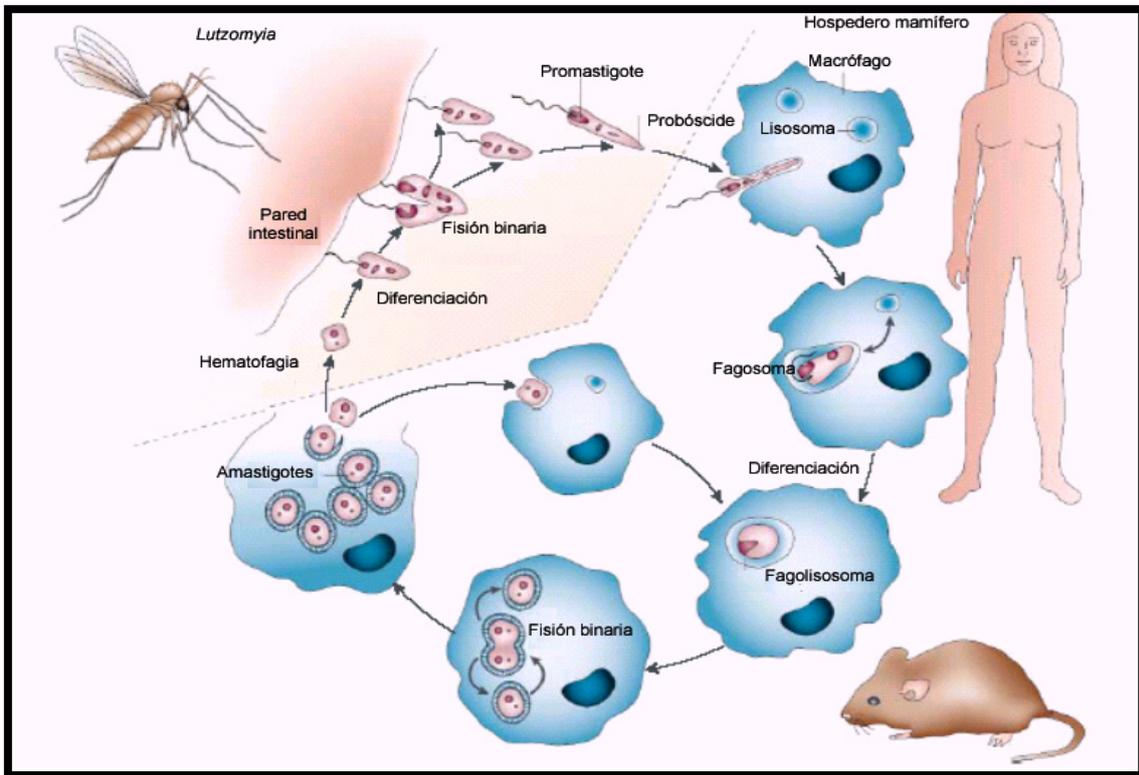


Figura 1.- Ciclo de vida de *Leishmania* (Sacks y Noben-Trauth, 2002).

I.3.1. Formas clínicas de leishmaniasis

Leishmania es el agente causal de la leishmaniasis. Esta enfermedad es uno de los principales problemas de salud en el mundo, junto con la malaria, tripanosomiasis y esquistosomiasis, que son causadas por parásitos (Tripathi et al., 2007). La leishmaniasis es una causa importante de morbilidad y mortalidad en varios países (Sereno et al., 2001). Aproximadamente 12 millones de personas alrededor del mundo están infectadas y cerca de 2 millones de nuevas infecciones son reportadas anualmente (von Stebut y Udey, 2004).

La leishmaniasis se ha clasificado en diferentes clases con base en las diferentes características que presentan los cuadros clínicos, estas son: leishmaniasis visceral, mucocutánea y cutánea (Awasthi et al., 2004).

I.3.1.1. Leishmaniasis visceral (kala-azar)

El agente causal de la leishmaniasis visceral es *Leishmania donovani*. Se presenta en Africa y la India principalmente. Las manifestaciones aparecen generalmente a los 3 meses posteriores a la picadura y son fiebre, típicamente nocturna, taquicardia, diarrea, tos y uno de los más evidentes es la hepatoesplenomegalia. Después de un tratamiento favorable, 3-10% de los casos desarrollan leishmaniasis cutánea con nódulos verrugosos sobre la cara y en las extremidades superiores (Awasthi et al., 2004).

I.3.1.2. Leishmaniasis cutánea

Esta forma de leishmaniasis es causada por diferentes especies tanto del Viejo Mundo como del Nuevo Mundo. *Leishmania tropica* y *Leishmania major* son los agentes causales en el Viejo Mundo y *Leishmania mexicana* y *Leishmania brasiliensis* en el Nuevo Mundo. Se caracteriza por lesiones localizadas únicas o múltiples sobre áreas expuestas de la piel que se ulceran. El periodo de incubación va de 2-6 semanas (Awasthi et al., 2004).

I.3.1.3. Leishmaniasis mucocutánea

La leishmaniasis mucocutánea y/o espundia es causada por *Leishmania brasiliensis* que comúnmente produce lesiones sobre las extremidades bajas que se ulceran y después de unos meses o años aparecen lesiones metastásicas en la nasofaringe. La obstrucción nasal y epistaxis son los síntomas más frecuentes (Awasthi et al., 2004).

I.3.2. Respuesta inmune a *Leishmania*

Los modelos humanos y murinos de leishmaniasis cutánea han sido empleados para estudiar la respuesta inmune al parásito *Leishmania*. Los estudios realizados en ratones resistentes y susceptibles a *Leishmania major* han sido de gran importancia en el desarrollo del paradigma actual sobre la subpoblación de células TH implicadas en enfermedades infecciosas. En el modelo de infección por *Leishmania major*, además de la respuesta inmune, el fondo genético de los ratones es muy importante en el desarrollo de la enfermedad. Los ratones C57BL/6 son resistentes y desarrollan pequeñas lesiones

en el sitio de inoculación del parásito que pueden auto-sanar. La recuperación de la leishmaniasis depende de manera crítica del desarrollo de una respuesta TH1 y participan también linfocitos T citotóxicos tipo 1 (Tc1). El control de la enfermedad es inducido por el reclutamiento activo de células T CD4⁺ y CD8⁺ en los sitios de infección. Ambos tipos de células son específicas contra *Leishmania major* y liberan IFN- γ como resultado de su activación. El IFN- γ activa a los macrófagos haciéndolos capaces de producir intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno como por ejemplo el óxido nítrico. El óxido nítrico, a su vez, facilita la eliminación de amastigotes intracelulares de los macrófagos infectados. Los ratones BALB/c son susceptibles y desarrollan una enfermedad progresiva debido a que no pueden controlar la proliferación del parásito, presentan una elevada diseminación visceral de parásitos y finalmente sucumben a la infección. La susceptibilidad está asociada con una respuesta TH2 que se caracteriza por la ausencia de una potente respuesta al parásito en las primeras lesiones, un bloqueo relativo en la liberación de IL-12 y una elevada producción de IL-4, citocina que antagoniza con la diferenciación TH1, IL-10, IL-13 y producción de anticuerpos (von Stebut y Udey, 2004).

I.3.3 Papel de las células dendríticas en la leishmaniasis

Las distintas células que se localizan en la piel tales como neutrófilos, macrófagos, células cebadas y células dendríticas llevan a cabo funciones diferentes en la respuesta inmune del hospedero contra la infección por *Leishmania major*. Participan diferentes PRR's como ha sido observado en la leishmaniasis cutánea. En la fase inicial que se considera silenciosa debido a que no hay inflamación clínicamente aparente, los promastigotes de *Leishmania major* son fagocitados por los macrófagos residentes activados por las moléculas más abundantes en la superficie del parásito como es la glicoproteína de 63 kDa, conocida como gp63 y que es una metaloproteínasa y la otra molécula es un glicofosfolípido formado de un dominio de unidades repetidas de fosfosacaridos llamado lipofosfoglicano o LPG, a través del receptor del complemento 3 (CR3). Posteriormente, se activan las células cebadas cutáneas, los neutrófilos y los monocitos que son reclutados en la piel lo que coincide con la formación de una placa nodular. Por otro lado, los promastigotes de *Leishmania* son endocitados por las células dendríticas cutáneas, las cuales activan a linfocitos B y T que son muy importantes para la resolución de la lesión. Las células dendríticas endocitan promastigotes y amastigotes

de *Leishmania major* a través de receptores Fc, esto dirige la producción de IL-12 y la generación de Th1/Tc1 que son requeridos para eliminar eficientemente al parásito presente en macrófagos infectados; situación observada en ratones C57BL/6 como modelo experimental. Finalmente, la fagocitosis de *Leishmania major* mediada por el receptor CR3 de macrófagos induce la producción de IL-10, citocina reguladora, y esto lleva a la persistencia del parásito como es observado en ratones BALB/c. De esta manera el balance entre FcγR y CR3 participa en el desarrollo de mecanismos inflamatorios y antiinflamatorios que implican a las células dendríticas y los macrófagos, respectivamente y es crítico para el desenlace de la enfermedad (Von Stebut, 2007).

En células dendríticas plasmacitoides, subpoblación que además de las células de Langerhans y de las células dendríticas dérmicas fagocitan promastigotes metacíclicos de *Leishmania major*, se ha observado una sobrerregulación de moléculas CD40, CD86 y HLA-DR, lo que sugiere un proceso de maduración, aunque requieren del acoplamiento de CD40-CD40L para la producción de diferentes citocinas tales como IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p70 o TNF-α. Además de la coestimulación por CD40L, la capacidad de producir IL-12p70 por células dendríticas derivadas de monocitos humanos infectadas con *Leishmania* varía de acuerdo a la especie. Por ejemplo, la infección con *Leishmania major* puede autosanar por la producción y liberación de IL-12p70 a diferencia de la infección con *Leishmania tropica* que causa lesiones cutáneas persistentes y *Leishmania donovani* que es viscerotrópica. Estos efectos opuestos pueden estar relacionados con la diferencia entre las moléculas de superficie como LPG y GPIs, que muestran una gran diversidad en las diferentes especies. La respuesta de las células dendríticas derivadas de monocitos y macrófagos de donadores sanos a diferentes especies de *Leishmania* ha sido investigada también mediante el uso de microarreglos en donde se observó que posteriormente a la infección con promastigotes metacíclicos de *Leishmania major* o de *Leishmania donovani* hubo una regulación diferencial de genes inductores de IFN-γ entre las dos especies (Brandonisio et al., 2004).

I.4. Apoptosis

La apoptosis es un proceso altamente regulado de eliminación celular que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis tisular en el organismo adulto y durante el desarrollo. Es una forma de muerte celular que no induce inflamación o daño tisular por lo que es crucial en la embriogénesis, homeostasis tisular y control de la enfermedad en metazoarios (Sudhandiran y Shaha, 2003). La apoptosis presenta diferencias importantes con la necrosis que es una forma de muerte celular patológica o accidental, caracterizada por un aumento del volumen celular y de los organelos, incluyendo a la mitocondria. Eventualmente esta pérdida de la integridad membranal resulta en la ruptura y liberación de enzimas que afectan a las células contiguas lo que provoca inflamación (Rich et al., 1999).

La apoptosis fue descrita inicialmente por Andrew Wyllie, John Kerr y Alastair Currie a principios de 1970 y se definió como un tipo de muerte programada con una serie de características morfológicas que incluyen la vesiculación de la membrana, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, cambio a una forma esférica por la pérdida de contacto con las células vecinas, disgregación celular, entre otras (Shaha, 2006).

El sistema inmune es un muy buen ejemplo que ilustra los diferentes papeles que juega la apoptosis en el desarrollo, diferenciación y regulación del número de células en este sistema (Doseff, 2004).

I.4.1. Características morfológicas de la apoptosis

En la apoptosis se presenta una serie de eventos celulares de forma ordenada y secuencial bien caracterizados. Un evento temprano y bien identificado en el proceso apoptótico es la pérdida de la asimetría de fosfolípidos de la membrana celular. Esto lleva a la exposición de fosfolípidos tales como fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC) hacia el exterior de la membrana celular (Roos et al., 2004). Esto está relacionado con los mecanismos de eliminación de la célula apoptótica por células fagocíticas. Durante la muerte apoptótica también ocurre un procesamiento internucleosomal del DNA en fragmentos regulares, así como un rearrreglo de la cromatina que resulta en una forma típica de condensación nuclear. Otra

serie de cambios incluye un encojimiento celular, condensación del núcleo y alteraciones membranales (blebbing). Eventualmente ocurre una fragmentación celular en partículas rodeadas de membrana llamadas cuerpos apoptóticos que contienen organelos intactos y porciones nucleares los cuales son eliminados por células fagocíticas (Jacobson et al., 1997).

Una parte importante de los cambios morfológicos observados durante la apoptosis tienen su origen en la activación de un grupo de proteasas conocidas como caspasas (Jacobson et al., 1997).

I.4.1.1 Las caspasas

Las caspasas son proteasas de cisteína que cortan los sustratos después de un residuo de aspartato. Diversas caspasas se expresan de manera constitutiva en las células y residen en el citosol en forma inactiva. El primer miembro identificado de la familia de las caspasas fue la caspasa 1 que inicialmente se conoció como la enzima convertidora de interleucina 1β , IL- 1β , (ICE); una enzima necesaria para la maduración de esta citocina (Kumar, 2007).

La familia de caspasas de mamíferos contiene 14 miembros, muchos de los cuales participan en la apoptosis y otros están relacionados con el procesamiento de citocinas e inflamación. Estas proteasas se expresan como proenzimas que deben ser procesadas proteolíticamente para activarse. Las caspasas iniciadoras están encargadas de la activación autocatalítica y las caspasas efectoras necesitan de las caspasas iniciadoras para su activación. El resultado final de esta cascada intracelular de activación proteolítica es el desmantelamiento secuencial y ordenado de la célula en apoptosis generando cuerpos apoptóticos que son eliminados por células fagocíticas cercanas. El corte de diferentes sustratos llevado a cabo por las caspasas es el responsable de las características morfológicas típicas de la apoptosis. Por ejemplo, el corte de la gelsolina, proteína que une a actina, y las cinasas ROCK-1 y PAK2 se han relacionado con la formación de burbujas en la membrana celular. En la fase final de la apoptosis participan también las caspasas en donde pueden eliminar inhibidores apoptóticos y promover la activación de otras caspasas. Por ejemplo, el corte de Bcl-2 resulta en la

eliminación del dominio BH4 amino-terminal con lo que pierde su función antiapoptótica y se convierte en una molécula proapoptótica (Cheng et al., 1997).

Como ya se mencionó anteriormente, existen caspasas que no únicamente participan en la apoptosis. La caspasa 1 participa en el procesamiento de la IL-1 β durante la inflamación y parece no ser esencial en la apoptosis. Las caspasas 1 y 12 pertenecen a un subgrupo de caspasas llamado caspasas inflamatorias y estudios recientes han mostrado que estas caspasas son activadas por el ensamble de un complejo de proteínas llamado inflamosoma. Otras caspasas como la caspasa 8 tienen funciones bien definidas en la apoptosis y pueden participar en otras funciones celulares como la proliferación celular. Se ha demostrado que esta caspasa y FADD, su molécula adaptadora, son requeridas para la proliferación inducida por citocinas de las células madre en ratones. (Pellegrini et al., 2005). Otros estudios han mostrado que mutaciones en la caspasa 8 humana producen defectos en la activación de células B, células T y células NK e inmunodeficiencia (Chun et al., 2002). Se ha demostrado que la activación de caspasas se requiere en la diferenciación terminal eritroide, trombopoiesis y fragmentación de proplaquetas (Zermati et al., 2001).

Además, aunque la muerte celular pueda efectuarse en ausencia de la participación de caspasas, los patrones morfológicos característicos que definen a la apoptosis son dependientes de la activación de caspasas y del corte específico de proteínas celulares o sustratos de muerte dentro de la célula (Fadeel y Orrenius, 2005).

I.4.1.1.1 Caspasa 3

La caspasa 3 es la responsable de la mayoría de los efectos que finalmente llevan a la muerte de las células. Existen otras caspasas que forman parte de la vía de inducción de apoptosis y la caspasa 3 normalmente se encuentra al final de la vía por lo que es una caspasa efectora. Se activa por el corte de la caspasa 8 ó de la caspasa 9, pero no por la caspasa 2. La caspasa 7 es muy semejante a la caspasa 3 y tienen una especificidad similar por el sustrato (Kumar, 2007).

La caspasa 3 se conoce también como apopaína, SCA-1, Yama y CPP32. Se expresa en las células como un precursor inactivo de 32 kDa. Durante el desarrollo del proceso

apoptótico la caspasa 3 genera por proteólisis dos fragmentos activos de 17kDa (p17) y 11kDa (p11). El precursor de la caspasa 3 es seccionado inicialmente en Asp-175-Ser-176, lo que genera la subunidad p11 y el péptido de 20 kDa (p20). Subsecuentemente, el péptido p20 es cortado en Asp-28-Ser-29 para generar la subunidad p17 activa (Nicholson et al., 1995).

Durante la apoptosis, la caspasa 3 corta proteolíticamente a un gran número de sustratos que incluye elementos del citoesqueleto y enzimas como la polimerasa de poli-ADP-ribosa y otras caspasas como la 6, 7 y 9 (Nicholson et al., 1995).

I.4.2 Vías de inducción de apoptosis

Se han descrito dos vías principales de apoptosis en mamíferos mediadas por caspasas. La vía extrínseca está mediada por receptores de muerte localizados en la membrana plasmática y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis tisular, especialmente en el sistema inmune. La vía intrínseca es dependiente de la mitocondria y se activa en respuesta a señales internas como el daño al DNA.

I.4.2.1. La vía extrínseca

Esta vía se inicia por el acoplamiento de receptores conocidos como receptores de muerte que poseen una serie de motivos protéicos que incluyen los dominios de muerte (DD) y los dominios efectores de muerte (DED). La unión a los receptores de muerte tales como Fas (también conocido como APO-1 o CD95) continúa con la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC) que activa a la procaspasa 8. La proteína adaptadora FADD se une a los DD de Fas y recluta la procaspasa 8 a los DED. Una elevada concentración local de procaspasa 8 lleva a su autoactivación catalítica y a la subsecuente activación de la caspasa efectora, caspasa 3 (Fadeel y Orrenius, 2005).

Otros receptores de muerte que responden a diferentes ligandos de muerte son conocidos como APO-2 o apoptosis relacionada al ligando de TNF (TRAIL). La formación de DISC, la activación de caspasas y la fragmentación del dominio de muerte que interactúa con BH-3 (Bid) después de la unión al receptor de TRAIL es similar a la vía de Fas (Fadeel y Orrenius, 2005).

I.4.2.1.1 Vía de Fas/FasL

Las señales de muerte por el ligando de Fas (FasL), son reconocidas por su correspondiente receptor de muerte Fas en la membrana plasmática. Su unión lleva a activar los receptores de muerte, así, Fas puede unirse al dominio de muerte asociado a Fas (FADD) provocando su agregación y la aparición de los dominios efectores de muerte (DED) que al estar expuestos interactúan con el dominio de pro-caspasa 8 induciendo su oligomerización localizada en el lado citosólico de la membrana plasmática. Esto lleva a la formación del complejo molecular conocido como el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) quien interactúa con dos subunidades de pro-caspasa 8 generando por autoactivación a caspasa 8. La activación de la señalización de caspasa 8 puede llevar en células tipo I (células de algunas líneas de diferenciación linfocítica) a activar directamente a caspasa 3 mientras que en células tipo II (otras células diferentes a las de tipo I) caspasa 8 se encuentra medianamente activada y es incapaz de activar directamente a caspasa 3, sin embargo, puede activar la vía mediada por la mitocondria al truncar en el citosol a Bid (miembro proapoptótico de la familia Bcl-2), un tipo de proteína proapoptótica, generando su forma activa tBid encargada de disparar la activación de la vía mitocondrial al liberar el citocromo c, el factor inductor de apoptosis (AIF) y otras moléculas de la mitocondria finalizando en la inducción de la apoptosis (Wang et al., 2005).

I.4.2.1.2 Vía de TNFR-1/TNF- α , DR-4,5/TRAIL

De manera muy similar a la vía Fas/FasL, esta vía apoptótica es activada por TNFR-1 al unirse el ligando TNF- α generando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) formado por el dominio de muerte, la proteína del dominio de muerte asociada a TNFR-1; para reclutar a pro-caspasa 8 generando la forma activa, caspasa 8, por autoactivación catalítica para después generar la forma activa de caspasa 3 quien es capaz de inducir la muerte de la célula por apoptosis o también que caspasa 8 active a la familia de miembros pro-apoptóticos Bcl-2, llevando a la muerte celular por apoptosis tras la pérdida de la MOMP y la subsecuente liberación de el citocromo c de la mitocondria (Rahman y McFadden, 2006).

I.4.2.1.3 Vía de perforina/granzima B

Esta vía implica la formación de un poro constituido de proteínas, perforina y una proteasa de serina, granzima B, que es inyectada en el citoplasma de la célula posteriormente a la desgranulación de la CTL o NK. La granzima B puede cortar directamente y activar a la procaspasa 3, iniciando la cascada de apoptosis en la célula o fragmentando otros sustratos como Bid, miembro de la familia de Bcl-2, llevando a la muerte de la célula (Goping et al., 2003).

I.4.2.2. La vía intrínseca

La vía intrínseca involucra un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (MOMP), proceso que es regulado y controlado por miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Jin y El-Deiry, 2005).

La familia de Bcl-2 en mamíferos consta de 20 miembros que se dividen en tres grupos que contienen al menos uno de los cuatro dominios homólogos conservados de Bcl-2 (Bcl-Xl, Bcl-w, A1 y Mcl-1) y que promueven la sobrevivencia celular. Otros dos grupos de miembros proapoptóticos promueven la muerte celular. El “dominio multi-BH” Bax, Bak y Bok comparte tres dominios (BH1, BH2 y BH3) con Bcl-2 y tiene una estructura tridimensional que forma un barril de hélices con una hendidura superficial hidrofóbica. De manera contraria, las ocho o más proteínas BH3, tales como Bid, el promotor de muerte asociado a Bcl-xL/Bcl-2 (Bad) y el miembro de la familia Bcl-2 que promueve la apoptosis (Bim), poseen únicamente el dominio corto de interacción BH3 que es necesario, y probablemente suficiente, para la inducción de la apoptosis. Ambos grupos proapoptóticos son necesarios para iniciar la apoptosis. La relación de moléculas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas presente en una célula es determinante en susceptibilidad a la apoptosis por la vía intrínseca (Cheng et al., 2001).

La MOMP lleva a la muerte celular a través de dos mecanismos que incluyen la liberación de proteínas intramembranales mitocondriales solubles (SIMPs) como el citocromo c (cyt c) y la alteración de funciones mitocondriales esenciales. Entre las diferentes moléculas liberadas, algunas están relacionadas con la inducción de apoptosis dependiente de caspasas y otras pueden promover la muerte celular de forma

independiente. La primera proteína identificada que se libera de la mitocondria es el citocromo c (Cheng et al., 2001), que se une a Apaf-1, proceso dependiente de ATP, formando un complejo conocido como apoptosoma. La unión entre citocromo c y APAF-1 es dependiente de ATP y esto ocurre en presencia de ATP/dATP. El apoptosoma puede reclutar a la procaspasa 9 y a su vez activa la oligomerización que lleva a la activación de las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7 (Li et al., 1997).

I.4.2.3. Vía del retículo endoplásmico

Recientemente se describió una nueva vía apoptótica en la que participa el retículo endoplásmico (RE). El retículo endoplásmico rugoso (RER) es el sitio de ensamblaje de las proteínas destinadas a la secreción. Cuando las células son expuestas a estrés en el RE por diferentes agentes tales como tunicamicina, brefeldina A o taspigargina se acumulan en el lumen proteínas mal plegadas o sin plegar. Esta acumulación de proteínas es llevada hacia el citoplasma, mediante una translocación por el RER, donde son degradadas por el sistema proteosoma-ubiquitina llamado sistema de degradación asociado al RER (ERAD). Sin embargo, si la degradación no es suficiente, el estrés prolongado activa varias vías apoptóticas. IRE1 α puede reclutar a la proteína adaptadora citosólica, factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2), que a su vez recluta y activa a ASK, el componente proximal de la vía de la cinasa amino-terminal c-Jun (JNK). La activación prolongada de ASK y JNK tiene como resultado la apoptosis (Momoi, 2004).

Otra vía de muerte del RER es la activación de procaspasa 12 la cual puede ser activada a través de la maquinaria intrínseca del RER ya sea por la vía UPR o a través del corte de calpaina que puede, a su vez, ser activada por elevaciones en el Ca²⁺ citoplásmico. Una vez activada, la caspasa 12 es translocada al citoplasma donde corta y activa a la procaspasa 9 de forma independiente a la formación del apoptosoma. Este mecanismo podría significar el punto donde el RER influye en la vía apoptótica intrínseca de manera independiente de la mitocondria (Movassagh y Foo, 2008).

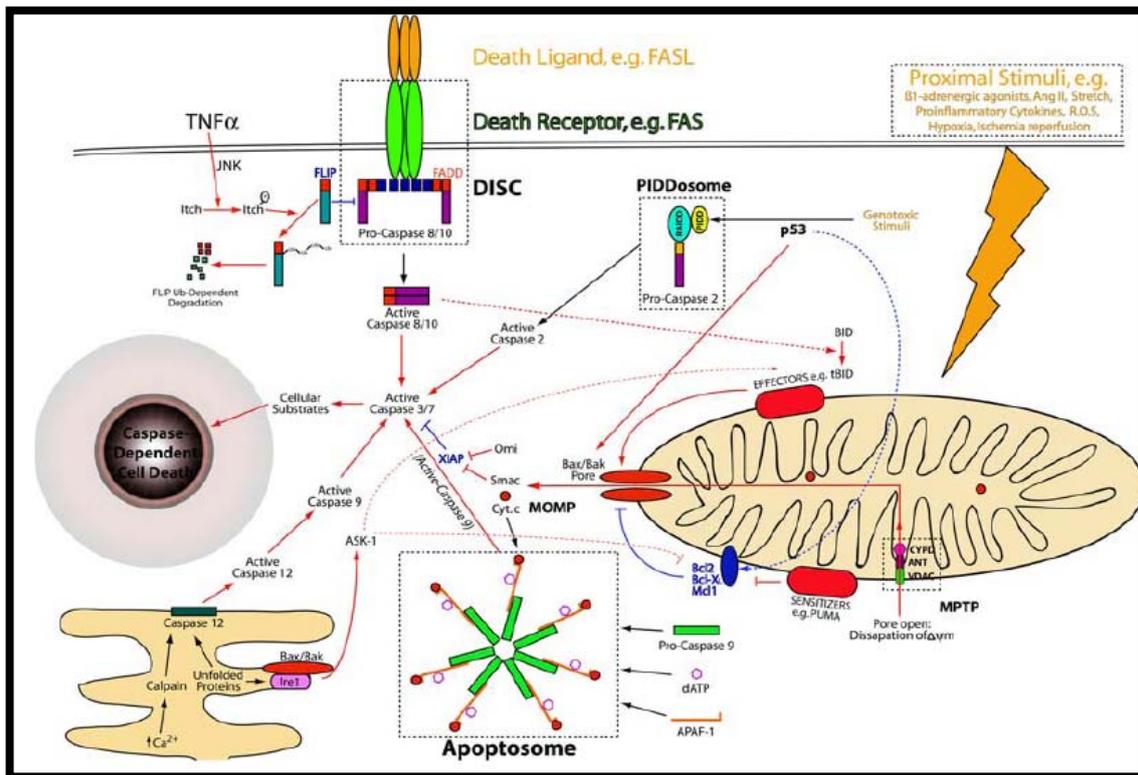


Figura 2.- Vías apoptóticas extrínseca (mediada por receptor de muerte), intrínseca (mediada por la mitocondrial) y por el retículo endoplásmico (mediada por estrés causado por proteínas mal plegadas o sin plegar y activación de procaspasa 12) (Movassagh y Foo, 2008).

1.4.2.4. Regulación de la apoptosis

Como se mencionó, existe un grupo de proteínas de la familia Bcl-2 que pueden tener una acción antiapoptótica inhibiendo la MOMP y/o interfiriendo con la liberación de factores proapoptóticos como el citocromo c. Además de esto, también existe un grupo muy importante de proteínas conocidas como proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). La familia de las IAP incluye proteínas que contienen un dominio Bir (Baculoviral IAP repeat), un dominio de 70 residuos de unión a zinc, cuyo nombre deriva del descubrimiento de estos supresores de apoptosis en el genoma del baculovirus. Estos dominios son esenciales para la actividad antiapoptótica de las IAPs, la cual se ha asociado a la unión y consecuente inhibición de las caspasas. Hasta ahora, se han descrito ocho miembros de las IAPs en humanos. Se sabe que al menos la XIAP, c-

IAP1, c-IAP2 y survivina unen e inhiben a las caspasas 3, 7 y 9, pero no a las caspasas 1, 6, 8 y 10 (Devereaux y Reed, 1999) (Salvesen y Duckett, 2002).

Un segundo grupo de proteínas que se liberan de la mitocondria posteriormente a la MOMP son los antagonistas de IAP que incluyen a Smac/DIABLO, HtrA2/Omi y GSPT1/eRF3. Como se menciono, las IAPs actúan como un freno para la apoptosis al inhibir las caspasas activadas. Smac/DIABLO, HtrA2/Omi y GSPT1/eRF3 se unen a las IAPs de manera similar a las caspasas por lo que funcionan como inhibidores competitivos. El coactivador de caspasas Smac/DIABLO se libera junto con el citocromo c durante la apoptosis para neutralizar la actividad inhibitoria de las IAPs y promover la activación de las caspasas dependiente de citocromo c. Smac/DIABLO también juega un papel de protección importante en la apoptosis mediada por receptores de muerte. Omi/HtrA2 también pueden cortar proteolíticamente e inactivar a las proteínas IAPs, a la vez que son más eficientes que los supresores de IAPs y son un agente dual, ya que promueven la fragmentación del DNA bajo condiciones apoptóticas y mantienen las funciones mitocondriales normales en células vivas de manera similar al citocromo c (Yang et al., 2003).

1.5. Modulación de la apoptosis por organismos patogénicos

Los parásitos protozoarios que residen dentro de una célula hospedera evitan su destrucción directa por el sistema inmune del hospedero. La célula infectada, sin embargo, tiene la capacidad de contrarrestar a los organismos patogénicos que la invaden al iniciar su propia muerte por apoptosis. Las células apoptóticas son reconocidas y fagocitadas principalmente por macrófagos y células dendríticas y el parásito es eliminado junto con la célula infectada. Este potente mecanismo de defensa de la célula hospedera ejerce una fuerte presión selectiva sobre los parásitos que la infectan y dependen de esta célula para crecer. A su vez, los parásitos han desarrollado diferentes estrategias para modular la apoptosis de la célula hospedera en su beneficio. En la última década se ha demostrado la existencia de diferentes vías de señalización celular que participan en la apoptosis y se ha visto que varias de ellas son blanco de diferentes organismos patogénicos con el fin de inhibir la apoptosis de su célula hospedera para asegurar su propia sobrevivencia en la célula infectada (Heussler et al., 2001). En el caso de las bacterias, muchas de ellas son reconocidas por receptores

celulares induciendo una multitud de señales que pueden, entre otros efectos, alterar la respuesta celular a un estímulo apoptótico. Diversas bacterias y productos bacterianos han sido reconocidos como agentes que pueden actuar en esta vía y al mismo tiempo inducir o inhibir la muerte celular (Häcker et al., 2006).

La modulación de la apoptosis es una estrategia importante en la patogenia de diferentes parásitos protozoarios intracelulares tales como *Cryptosporidium parvum*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Theileria* spp., *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium* spp. En los que se ha demostrado que inhiben la apoptosis de la célula hospedera. Los mediadores del organismo patogénico responsables de esta modulación aún no se conocen del todo, pero se sabe que los parásitos interactúan con diversos sistemas reguladores de la apoptosis con el fin de revertirla durante fases críticas de la infección intracelular que incluyen la invasión, establecimiento y replicación. Se sabe que la etapa del ciclo de vida del parásito tiene un impacto sobre la modulación de la apoptosis al igual que su diferenciación. El análisis de las interacciones hospedero/parásito sobre la modulación de la apoptosis revela que son complejas y dinámicas y diferentes estudios las están definiendo de manera más precisa. (Carmen y Sinai, 2007).

**Tabla 1.- Sitios en las vías apoptóticas modulados por parásitos protozoarios
(Carmen y Sinai, 2007)**

	Parasite species	Effect of infection	Reference
Intrinsic pathway			
Cytochrome <i>c</i> release	<i>Leishmania major</i> <i>Toxoplasma gondii</i>	Inhibition Inhibition	Akarid <i>et al.</i> (2004) Carmen <i>et al.</i> (2006); Goebel <i>et al.</i> (2001)
Apoptosome	<i>T. gondii</i>	Inhibition of apoptosome activity	Keller <i>et al.</i> (2006)
Caspase 9	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Reduced caspase 9 activity Transialidase (PDNF) reduces caspase 9 activity	Petersen <i>et al.</i> (2006) Chuenkova and Perelra (2003)
	<i>Theileria parva</i>	Cells cured of infection exhibit increased caspase 9 activity	Guergnon <i>et al.</i> (2003); Kuenzi <i>et al.</i> (2003)
	<i>T. gondii</i>	Inhibition of caspase 9 activation	Carmen <i>et al.</i> (2006); Goebel <i>et al.</i> (2001); Payne <i>et al.</i> (2003)
	<i>Plasmodium berghei</i>	Inhibition*	van de Sand <i>et al.</i> (2005)
Bcl-2 family			
Anti-apoptotic	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>T. cruzi</i>	Increased Bcl-2 Increased Bcl-2	Mele <i>et al.</i> (2004) Aoki <i>et al.</i> (2004); Nakajima-Shimada <i>et al.</i> (2000)
	<i>T. cruzi</i>	Increased Bcl-xL	Aoki <i>et al.</i> (2004); Aoki Mdel <i>et al.</i> (2006)
	<i>T. parva</i>	Increased Mcl-1 (decreases in the absence of <i>T. parva</i>)	Dessauge <i>et al.</i> (2005b)
	<i>T. gondii</i>	Increased Transcription: Bcl-2; Bfl-1; Bcl-xL Mcl-1	Molestina <i>et al.</i> (2003) Goebel <i>et al.</i> (2001)
Pro-apoptotic multidomain	<i>T. gondii</i>	Decreased Bax	Carmen <i>et al.</i> (2006)
Pro-apoptotic BH3 only	<i>L. major</i> / <i>Leishmania amazonensis</i> <i>T. cruzi</i> <i>Theileria annulata</i> <i>T. gondii</i>	Inactivation of Bad Inactivation of Bad Decreased Bad	Ruhland <i>et al.</i> (2007) Aoki Mdel <i>et al.</i> (2006) Guergnon <i>et al.</i> (2006) Carmen <i>et al.</i> (2006)
Extrinsic pathway			
c-FLIP	<i>T. cruzi</i> <i>T. parva</i>	Post-transcriptional upregulation Infected T cells express c-FLIP	Hashimoto <i>et al.</i> (2005) Kuenzi <i>et al.</i> (2003)
Caspase 8	<i>T. cruzi</i>	Inhibition of activation	Hashimoto <i>et al.</i> (2005); Nakajima-Shimada <i>et al.</i> (2000)
	<i>T. parva</i>	T cells cured of infection exhibit increased caspase 8 activity	Kuenzi <i>et al.</i> (2003)
	<i>T. gondii</i>	Inhibition of activation	Carmen <i>et al.</i> (2006); Payne <i>et al.</i> (2003)
Caspase 3	<i>P. berghei</i> <i>Leishmania spp.</i>	Inhibition* Decreased caspase 3 activity	van de Sand <i>et al.</i> (2005) Aga <i>et al.</i> (2002); Akarid <i>et al.</i> (2004); Lisi <i>et al.</i> (2005); Ruhland <i>et al.</i> (2007)
	<i>T. cruzi</i>	Transialidase (PDNF) reduces caspase 9 activity Cruzipain-dependent inhibition of caspase 3 activation	Chuenkova and Pereira (2003) Aoki Mdel <i>et al.</i> (2006)
	<i>T. parva</i>	Decreased caspase 3 activity Cells cured of infection exhibit increased caspase 3 activity	Petersen <i>et al.</i> (2006) Guergnon <i>et al.</i> (2003);
	<i>T. gondii</i>	Inhibition of caspase 3 activation	Carmen <i>et al.</i> (2006); Goebel <i>et al.</i> (2001); Payne <i>et al.</i> (2003)
IAPs	<i>P. berghei</i> <i>T. parva</i> <i>T. gondii</i>	Inhibition* Infected T cells express c-IAP and XIAP Increased expression of NAIP1 and 2, c-IAP1 and 2, and XIAP	van de Sand <i>et al.</i> (2005) Kuenzi <i>et al.</i> (2003) Molestina <i>et al.</i> (2003)
Signalling cascades			
JNK	<i>T. cruzi</i> <i>T. parva</i> ^a <i>T. gondii</i>	Activation Activation Decreased phospho-JNK following UV exposure	Lizundia <i>et al.</i> (2005); Lizundia <i>et al.</i> (2006) Carmen <i>et al.</i> (2006)
NF-κB	<i>C. parvum</i> <i>L. major</i> <i>T. cruzi</i> <i>Theileria spp.</i> <i>T. gondii</i>	Activation Activation Activation Activation following recruitment of IKK to the surface of the parasite Activation by both host IKK and parasite encoded kinase (TgIKK)	Chen <i>et al.</i> (2001) Akarid <i>et al.</i> (2004) Petersen <i>et al.</i> (2006) Heussler <i>et al.</i> (2002) Molestina <i>et al.</i> (2003; 2005a,b)
PI3K	<i>L. major</i> / <i>L. amazonensis</i> <i>T. cruzi</i> <i>T. gondii</i> <i>Plasmodium</i>	Activation Activation Activation Activation	Ruhland <i>et al.</i> (2007) Aoki Mdel <i>et al.</i> (2006) Kim and Denkers (2006) Leiriao <i>et al.</i> (2005)
PKA	<i>T. annulata</i>	Activation	Guergnon <i>et al.</i> (2006)
Erk1/2	<i>T. cruzi</i> <i>T. gondii</i>	Activation Activation	Aoki Mdel <i>et al.</i> (2006) Kim and Denkers (2006)
Soluble factors	<i>Leishmania spp.</i> <i>T. cruzi</i>	Lipophosphoglycan exposure inhibits actinomycin induced apoptosis Transialidase induces PI3K inhibiting neuronal apoptosis Cruzipain inhibits apoptosis in neonatal cardiomyocytes	Lisi <i>et al.</i> (2005) Chuenkova <i>et al.</i> (2001) Aoki <i>et al.</i> (2004); Aoki Mdel <i>et al.</i> (2006)

a. The inhibition of caspases in *P. berghei*-infected cells was performed using FITC-VAD-FMK which binds active caspases. More specific analysis of caspase inhibition remains to be performed.

b. While both *T. parva* and *T. annulata* have been shown to activate JNK and thereby induce AP-1-dependent gene expression the activation of JNK has been linked to the inhibition of apoptosis in studies concerning *T. parva*.

I.5.1. Modulación de la apoptosis por el parásito *Leishmania*

Como ya se ha mencionado anteriormente, *Leishmania* es un parásito protozoario intracelular que infecta principalmente macrófagos y células dendríticas. Se ha demostrado que la infección de M ϕ por promastigotes de *Leishmania donovani* y la presencia de lipofosfoglicano (LPG), molécula más abundante en la superficie del parásito, inhiben la apoptosis de estas células aún en ausencia de factores de crecimiento exógenos. Este efecto se ha observado también con los sobrenadantes colectados de los M ϕ infectados con el parásito y se ha relacionado con la existencia de un factor soluble producido por las células infectadas como mediador de esta inhibición. Así, la infección de M ϕ por *Leishmania donovani* indujo la expresión de genes para diferentes citocinas y algunas de éstas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y GM-CSF recombinantes aplicadas de manera exógena inhiben la apoptosis inducida por la eliminación de M-CSF (Moore y Matlashewski, 1994).

La inhibición de la apoptosis inducida por la ausencia de M-CSF se ha demostrado también en M ϕ infectados con *Leishmania major*. Así mismo, este efecto inhibitorio se presenta igualmente en la apoptosis inducida por estaurosporina en M ϕ de ratones BALB/c susceptibles a *Leishmania major* y ratones C57BL/6 resistentes a *Leishmania major* y no es dependiente de la secreción de citocinas del tipo TH1 o TH2. La inhibición de la apoptosis e inactivación de las caspasas efectoras se asocia con la represión de la liberación mitocondrial de citocromo c y no se relaciona con la vía de NF- κ B (Akarid et al., 2004).

Por otro lado, se ha demostrado que ratones de la cepa C57BL/6 normales o deficientes en perforina son capaces de sanar espontáneamente las lesiones cutáneas provocadas por *Leishmania major* y que los ratones singénicos *gld* y *lpr*, carentes del sistema Fas funcional, no fueron capaces de sanar estas lesiones. Esta incapacidad para controlar la infección no fue atribuida a una disminución en células CD4⁺ TH1 que responden a la infección o a una respuesta de activación pobre de los M ϕ ante IFN- γ . La administración de FasL recombinante exógeno a los ratones deficientes en esta molécula permitió la curación de las lesiones, lo que demostró la importancia de la vía Fas-FasL en la eliminación del parásito. Además, los M ϕ infectados *in vitro* por

Leishmania major aumentaron la expresión de Fas en respuesta a IFN- γ y como resultado de esto fueron susceptibles a la apoptosis inducida por las células T CD4⁺. Estos resultados sugieren que la apoptosis de los M ϕ inducida por las células T CD4⁺, observada *in vitro* y que funciona a través de la vía Fas (Apo-1/CD95), es de gran importancia en el sistema *in vivo* (Conceição-Silva et al., 1998).

Aunque los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son capaces de internalizar promastigotes de *Leishmania*, estas células no se consideran hospederas de este parásito, principalmente por su corto tiempo de vida. Está demostrado que la coincubación de los PMN con promastigotes de *Leishmania major* disminuye de manera significativa la apoptosis. Este efecto antiapoptótico está asociado con una reducción significativa de la actividad de caspasa 3 en los neutrófilos (Aga et al., 2002).

Por otro lado, aún cuando se reconoce la importancia que juegan las células dendríticas en la respuesta inmune ante la infección de parásitos protozoarios como *Leishmania*, no hay información sobre el papel del parásito en la muerte y su regulación en células dendríticas.

Esta capacidad de *Leishmania* para retrasar la apoptosis en células infectadas incluidas las células dendríticas, puede tener implicaciones para la patogénesis del parásito al favorecer la invasión del hospedero y la persistencia del parásito en las células infectadas.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Leishmania es un parásito protozoario intracelular causante de diversas formas clínicas de leishmaniasis. Al ser una de las poblaciones celulares donde el parásito puede vivir de manera intracelular, las células dendríticas son un modelo de estudio importante para analizar la inhibición de la apoptosis ejercida por el parásito *Leishmania mexicana* lo cual repercute sobre su supervivencia y progreso de la enfermedad además de contribuir con el conocimiento de los mecanismos moleculares y la manera en que participa el parásito sobre la apoptosis de la célula hospedera.

III. OBJETIVO

De acuerdo a los antecedentes mencionados, se sabe que el parásito intracelular *Leishmania* es capaz de inhibir la apoptosis natural e inducida de macrófagos y neutrófilos. Sin embargo, no se conoce el efecto del parásito en la apoptosis de células dendríticas que es otra de las poblaciones celulares preferentemente infectadas por *Leishmania*.

El objetivo general de este proyecto fue analizar el efecto que ejerce el parásito *Leishmania mexicana* en la apoptosis natural e inducida de células dendríticas derivadas de monocitos humanos.

Los objetivos particulares fueron:

- II.1. Evaluar la muerte apoptótica inducida por camptotecina en células dendríticas derivadas de monocitos humanos.
- II.2. Evaluar la viabilidad de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos y el efecto de *Leishmania mexicana*.
- II.3. Analizar el efecto del parásito *Leishmania mexicana* sobre diferentes patrones apoptóticos en células dendríticas derivadas de monocitos humanos tales como translocación de fosfatidilserina, morfología nuclear, fragmentación de DNA y activación de caspasa 3.

IV. HIPOTESIS

El parásito *Leishmania mexicana* tiene un efecto inhibitorio sobre la apoptosis de células dendríticas para asegurar su supervivencia.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1. Purificación de células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC)

Las células dendríticas se diferenciaron de monocitos CD14⁺ de acuerdo a métodos descritos previamente (Romani et al., 1994; Sallusto y Lanzavecchia, 1994). Los monocitos humanos se obtuvieron de agregados celulares (“buffy coats”) de donadores sanos proporcionados por el Banco de Sangre del CMN, Siglo XXI, IMSS. Los monocitos se purificaron por centrifugación en gradiente utilizando Ficoll-Hypaque (Sigma, St Louis, MO, EUA) y se centrifugaron a 300 ×g por 20 min a 20 °C. Las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 estéril y libre de pirógenos (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor, 2 mM de L-Glutamina (Gibco Invitrogen Grand Island, NY), 10mM de buffer HEPES, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de streptomycin, 24 mM de NaHCO₃ (R-10) y se incubaron con microperlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-CD14 (MACS CD14 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) durante 15 min y se purificaron por selección magnética. Los monocitos CD14⁺ se lavaron con amortiguador de fosfatos salino (PBS) y se incubaron durante toda la noche en tubos de teflón (Daigger). Posteriormente, se cultivaron 1 × 10⁶ monocitos en medio R-10 suplementado con 50 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 1000 U/ml de GM-CSF (BD Pharmingen, San Diego, CA) y 500 U/ml de IL-4 (BD Pharmingen, San José, CA). En los días 2 y 4 de cultivo se eliminó el 50% del medio y se reemplazó con medio fresco adicionado con las citocinas. En el día 7 de cultivo se obtuvieron las células no adherentes, se lavaron dos veces con PBS, se caracterizaron y se utilizaron en los experimentos.

V.2. Caracterización de las moDC

Las células dendríticas derivadas de monocitos humanos se caracterizaron mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos dirigidos contra marcadores específicos. 1 × 10⁶ moDC se fijaron con paraformaldehído (Sigma, St. Louis, MO, EUA) al 2% por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS y se bloquearon con PBS adicionado con suero de cabra no inmune al 5% por 1 h a 4 °C. Se lavaron y se

incubaron con anticuerpos dirigidos contra CD14 (CD14-PE clona M5E2), CD1a (CD1a-FITC clona HI149), MHCII (HLA-DR,DP,DQ, clona Tü39), CD86 [CD86-FITC clona 2331 (FUN-1)], CD3 (CD3-cychrome clona UCHT1) y los controles de isotipo respectivos, todos obtenidos de BD Pharmingen, San José, Ca, EUA. Las células se incubaron con los anticuerpos por 1 h en frío, se lavaron, se resuspendieron en 500 μ l de PBS y se leyeron en un citómetro FACSsort con el software CellQuest (BD Immunocytometry Systems, San José, CA, EUA). Las células fueron 85-90% CD1a⁺ y presentaron el fenotipo CD1a⁺/CD86⁺/MHCII⁺.

V.3. Cultivo de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Los promastigotes de *Leishmania mexicana* (MHOM/MX/92/UADY/ 68) se cultivaron en medio RPMI-1640 estéril, libre de pirógenos (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, USA) y suplementado con 5% de suero fetal bovino (Gibco Invitrogen Grand Island, NY, EUA) inactivado con calor a 28 °C. Los parásitos se subcultivaron cada 4-5 días y crecidos a una densidad de 1×10^6 /ml. Los promastigotes se recolectaron del cultivo en fase estacionaria, se centrifugaron a $350 \times g$, 10 min a 20 °C y se lavaron 3 veces en PBS a temperatura ambiente para finalmente contarlos después de su inmovilización con glicerol.

V.4. Tratamiento de las moDC

Los cultivos celulares se sometieron a diferentes tratamientos: (1) sin estímulo, (2) infección con promastigotes de *Leishmania mexicana* (en una proporción de 5:1 y 10:1 parásitos:células), (3) tratamiento con el agente proapoptótico camptotecina (5 μ g/ml) (Sigma, St Louis, MO, EUA) como control positivo, (4) tratamiento con 5 μ g/ml de camptotecina (Sigma, St Louis, MO, USA) e infección con promastigotes de *Leishmania* (en una proporción de 5:1 y 10:1 parásitos:células). Las moDC se co-incubaron con los parásitos a 28 °C en 1 ml de medio R-10 (Gibco Invitrogen Grand Island, NY, EUA) durante 1 hr para permitir la infección. Posteriormente, las coincubaciones se llevaron a cabo a 37 °C en una atmósfera húmeda con inyección de 5% de CO₂ por diferentes tiempos. Finalmente, las células se lavaron varias veces con PBS para eliminar a los promastigotes que no fueron fagocitados y las células infectadas

se utilizaron en los experimentos. Las moDC sin estímulo se utilizaron como control negativo.

V.5. Análisis de viabilidad celular

Con el objetivo de analizar el efecto de *Leishmania mexicana* sobre la viabilidad de las moDC, éstas se tiñeron con el colorante vital azul tripán (Gibco Invitrogen Grand Island, NY, EUA). Las moDC tratadas bajo las diferentes condiciones arriba mencionadas se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 céls/ml. Se tomaron 10 μ l de esta suspensión y se agregaron 10 μ l de una solución de azul tripán al 0.2%, se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y se contaron 100 células como mínimo. El número absoluto de células vivas se obtuvo al restar el número de células teñidas con azul tripano del número total de moDC.

V.6. Tinción con Giemsa

La morfología nuclear se analizó mediante tinción con Giemsa. 1×10^6 moDC obtenidas de los diferentes tratamientos se lavaron con PBS y se fijaron en etanol absoluto, se tiñeron con el colorante Giemsa (Sigma, St. Louis MO, EUA) diluído 1/10 con agua bidestilada por 15 min, se lavaron con agua y se fijaron con resina. Se observaron bajo aceite de inmersión en un microscopio de luz (OZAUS) y se examinaron 200 células como mínimo por cada tratamiento.

V.7. Análisis de fragmentación de la cromatina por TUNEL

El análisis por TUNEL (In Situ Cell Death Detection kit; Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Alemania) se utilizó para detectar la muerte celular apoptótica por el marcaje enzimático de fragmentos de DNA con dUTP-fluoresceína y TdT (Gorczyca et al., 1993). Se fijaron 1×10^6 con PBS/paraformaldehído al 4% (pH 7.4) durante 60 min a temperatura constante, se lavaron con PBS y se incubaron por 10 min con metanol/H₂O₂ al 3% para bloquear la actividad inespecífica de la peroxidasa. Las células se lavaron nuevamente con PBS y se resuspendieron en solución permeabilizadora (Tritón X-100 al 0.1%/Citrato de sodio al 0.1%) durante 2 min en

hielo. Las células se lavaron y se resuspendieron en 50 µl de mezcla de reacción de TUNEL o solamente en 50 µl de solución de marcaje, como control negativo, durante 60 min y se incubaron en una cámara húmeda y oscura a 37 °C. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 50 µl de Convertidor-POD [anticuerpo antifluoresceína, fragmento Fab de cabra, conjugado con peroxidasa (POD)] (In Situ Cell Death Detection kit; Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Alemania). La actividad de la peroxidasa se reveló con diaminobenzidina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) y las muestras se analizaron en un microscopio de luz.

V.8. Ensayo de fragmentación de DNA

La fragmentación del DNA de moDC se utilizó como un índice de apoptosis (Eldadah et al., 1996). Esta fragmentación se analizó en el DNA genómico aislado de una misma cantidad de moDC sometidas a los diferentes tratamientos. 3×10^6 moDC obtenidas de cada tratamiento se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200 µl de PBS. El DNA genómico se aisló mediante el kit DNeasy[®] Blood and Tissue (Qiagen GMBH Hilden, Alemania). Después de la elución de las columnas DNeasy[®], el RNA contaminante se digirió con 1 µg de RNase A (Sigma, St Louis MO, EUA) durante 30 min a una temperatura de 37 °C. El DNA se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualizó por tinción con bromuro de etidio.

V.9. Citometría de flujo de Anexina-V/IP

La unión de Anexina V-Isotiocianato de fluoresceína (Anexina V-FITC) (Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Alemania) se utilizó como una característica de moDC apoptóticas junto con la tinción con Ioduro de propidio (IP) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) para discriminar células necróticas. En células viables, la fosfatidilserina (PS) está estrictamente confinada a la parte interna de la membrana plasmática. La expresión superficial de este fosfolípido es una característica de apoptosis temprana y ocurre después de la pérdida de la integridad membranal (Homburg et al., 1995). Así, las células en apoptosis temprana unen Anexina V-FITC, una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio con alta afinidad por PS externalizada. Además, las células vivas excluyen al IP y permiten la detección y cuantificación específica de la

apoptosis por medio por FACS (Koopman et al., 1994). Las células tratadas se recolectaron, centrifugaron y se lavaron con PBS, posteriormente se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 /ml en amortiguador de unión (HEPES-NaOH 10mM (pH 7.4), NaCl 140 mM y CaCl_2 2.5 mM). Después, se transfirieron 100 μl de la suspensión de células y se incubaron con 5 μl de Anexina V-FITC y 5 μl de IP durante 15 min a 25 °C en oscuridad. Finalmente, se agregaron 0.4ml de amortiguador de unión y las muestras se analizaron por citometría de flujo en un lapso de tiempo menor a 1 h en un citómetro FACSort con el software CellQuest (BD Immunocytometry Systems, San José, CA, EUA). Las moDC se regionalizaron en base al criterio de tamaño/complejidad y los resultados se presentaron como el porcentaje de células viables (Anexina V-FITC⁻/IP⁻), células en apoptosis temprana (Anexina V-FITC⁺/IP⁻) y células no viables o necróticas (Anexina V-FITC⁺/IP⁺ o Anexina V-FITC⁻/IP⁺).

V.10. Análisis de la activación de caspasa 3 por fluorometría

La caspasa 3 activa consiste de una subunidad de 11 kDa y una de 17 kDa que se derivan de la fragmentación de la proenzima de 32 kDa (procaspasa 3) (Shi, 2002). La actividad enzimática de la caspasa 3 se evaluó usando un ensayo fluorométrico el cual está basado en el reconocimiento de secuencias específicas de aminoácidos por la caspasa 3 y la fragmentación proteolítica del sustrato MOCAc-DEVDAPK(Dnp)-NH₂ (Peptides International, Louisville, Kentucky, USA) en el fluoróforo metilcumarina (MOCAc-DEVD). Después de 3-18 hrs de coincubación de las moDC con promastigotes de *Leishmania mexicana* y/o camptotecina, las células se recolectaron, se lavaron dos veces con PBS frío y se homogenizaron con amortiguador de muestra [HEPES 100 mM, 10% sacarosa (m/v), 0.1% CHAPS (m/v), DTT 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, NaF 1 mM, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pepstatina y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina (todos obtenidos de Sigma, St Louis, MO, EUA)]. La cantidad total de proteína extraída se cuantificó por el método de Bradford y se utilizaron 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína del lisado celular total en el ensayo. Los lisados se transfirieron a una microplaca de 96 pozos de fondo plano (Costar-Corning Corning, NY) y se adicionó el amortiguador de reacción y el sustrato fluorogénico MOCAc-DEVDAPK(Dnp)-NH₂ (25 μM). Después de 4 hrs de incubación a 37 °C, la actividad de caspasa 3 se determinó por la liberación de metilcumarina debida a la fragmentación proteolítica en un

fluorómetro/luminómetro (Fluoroskan Ascent FL, Termo Labsystems, Helsinki, Finlandia). Los resultados se expresaron como el corte de MOCAC-DEVD determinado por el cambio en intensidad de fluorescencia (Δ fluorescencia)/hr./mg de proteína.

V.11. Análisis de caspasa 3 por Western blot

Además de la determinación de la actividad de la caspasa 3 por fluorometría, se realizó la inmunodetección del fragmento activo. Se recolectaron las moDC tratadas, se lavaron una vez con PBS frío y se centrifugaron a $13,000 \times g$ por 10 s a 4 °C. Posteriormente la pastilla de células se resuspendió en 40 μ l de amortiguador de lisis RIPA (NP-40 al 1%, deoxicolato de sodio al 0.5% y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.1% en PBS adicionado con NaCl 150 mM, NaF 50 mM, Na_3VO_4 1mM, 20 μ g/ml de PMSF, 10 μ g/ml de aprotinina, 2 μ g/ml de pepstatina A y 2 μ g/ml de eupeptina) (todos obtenidos de Sigma, St Louis, MO, EUA), se agitó en un vortex y se colocó a 4 °C por 20 min. Los lisados se centrifugaron a $11,200 \times g$, 10 min a 4 °C y el sobrenadante se almacenó a -70 °C hasta que se realizó el inmunoblot. Se adicionaron cantidades iguales del extracto de proteínas a 5 μ l de amortiguador de carga 2 \times , las muestras se hirvieron por 3 min y se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15% (PAGE) a 120 V durante 90 min bajo temperatura ambiente. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a 20 V durante 90 min bajo temperatura ambiente, se lavaron con agua destilada y se bloquearon con amortiguador Tris-salino/Tween-20 al 0.05% (TBST) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) adicionado con leche baja en grasas durante 30 min a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron toda la noche con un anticuerpo policlonal anti-caspasa 3 humana (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) en TBST/leche en agitación constante a 4 °C. Después, las membranas se lavaron seis veces con TBST por 10 min cada una y se incubaron con una IgG (H+L) anti-conejo (1:15000, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, EUA). Las membranas se lavaron nuevamente con agua destilada y TBST cuatro veces cada 10 min. Las bandas se visualizaron por detección con quimioluminiscencia (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) usando placas fotográficas Kodak (Kodak Biomax MR). El análisis de densitometría de las bandas se hizo con el programa Image-J, NIH Image versión 0.93e.

VI. RESULTADOS

VI.1. Obtención y caracterización de monocitos de sangre periférica humana

Los monocitos se obtuvieron por un gradiente con Ficoll Hypaque de células mononucleares y se aislaron por selección positiva con perlas dirigidas contra el marcador de superficie CD14. Los monocitos se caracterizaron por citometría de flujo con anticuerpos dirigidos contra los marcadores de superficie CD1a, CD14, CD86, MHC-II y CD3 (Figura 3) para posteriormente diferenciarse a células dendríticas. Se muestra que la población de células obtenida fue homogénea de acuerdo a su tamaño y complejidad además de que en los histogramas de citometría se observa que el receptor para LPS (CD14) se encuentra altamente expresado en estas células a diferencia de CD1a que es un marcador expresado en células dendríticas plasmacitoides. Los monocitos muestran también una elevada expresión de la molécula coestimuladora CD86 y el MHCII. Se utilizó un anticuerpo contra CD3 para descartar la presencia de linfocitos en el aislamiento, situación que se confirmó al no observarse su expresión.

Monocitos

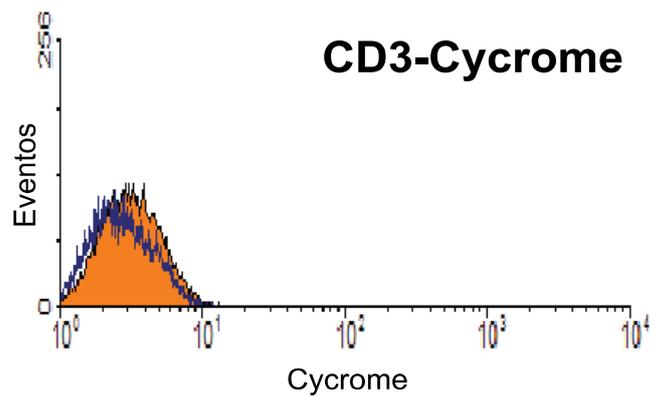
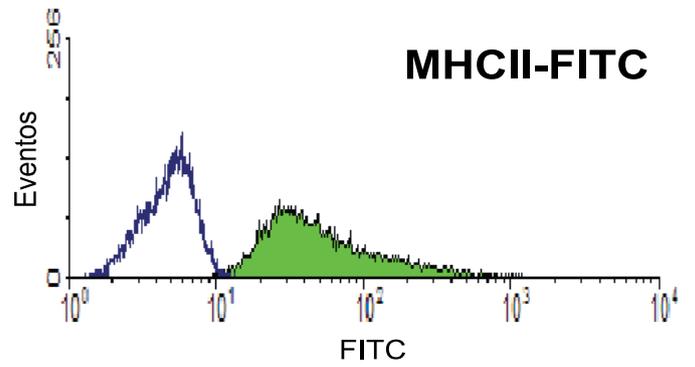
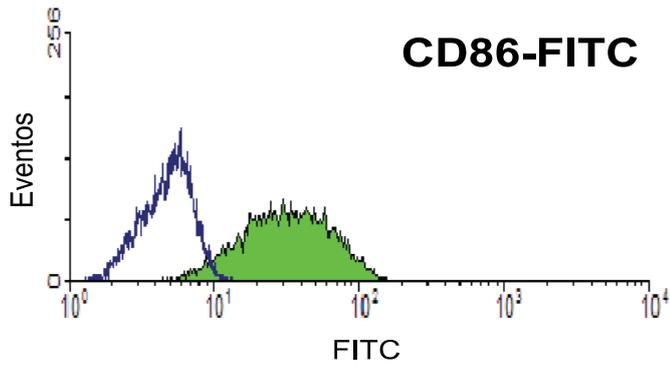
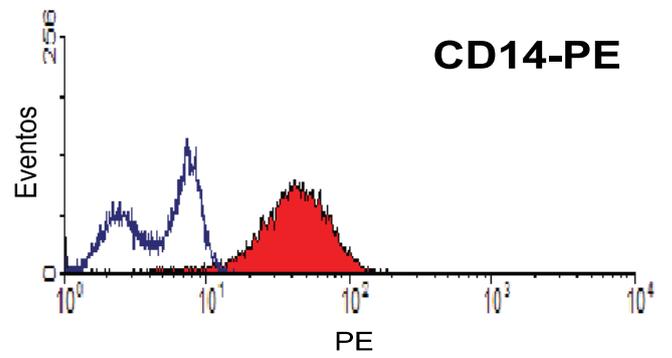
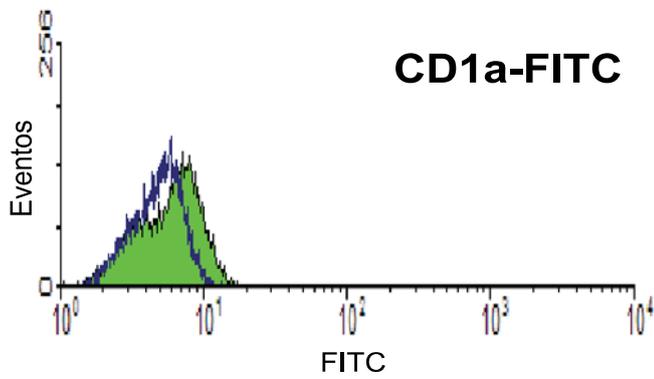
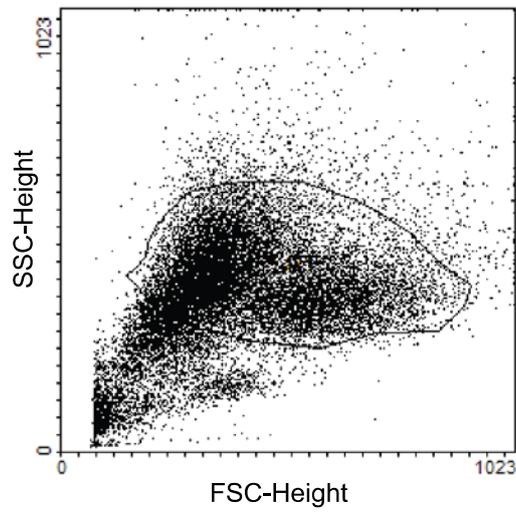


Figura 3. Caracterización de monocitos de sangre periférica humana por citometría de flujo. Los monocitos se aislaron por selección positiva con microperlas magnéticas anti-CD14 y se determinó la expresión en superficie de CD1a, CD14, CD86, MHCII y CD3 por citometría de flujo. Las células se fijaron y se tiñeron para determinar la expresión en superficie de los diferentes marcadores como se indica en la sección de Materiales y Métodos. La gráfica muestra un experimento representativo (n=3).

VI.2. Diferenciación y caracterización de células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC)

Las células dendríticas se diferenciaron a partir de monocitos humanos mediante la utilización de las citocinas GM-CSF e IL-4 por 7 días. Las células se caracterizaron por citometría de flujo con anticuerpos dirigidos hacia los marcadores de superficie CD1a, CD14, CD86, MHC-II y CD3 (Figura 4). Como se observa, la población de células obtenida fue homogénea de acuerdo a su tamaño y complejidad y en los histogramas de citometría se observa que CD1a, que pertenece a la familia CD1 de moléculas presentadoras de lípidos y que están altamente expresadas en CD plasmacitoides, se expresó ampliamente en las moDC. El receptor para LPS (CD14) (marcador de monocitos/macrófagos) no se expresó en las moDC. Las moDC mostraron una menor expresión de CD86 y MHCII en comparación a los monocitos lo cual es indicativo de una población de CD con fenotipo inmaduro que corresponde a las moDC. Al igual que los monocitos, la ausencia de CD3 indicó que no hubo contaminación por linfocitos. Se obtuvo una pureza del 85-90% y una adecuada diferenciación de la población de monocitos a células dendríticas (Figura 4).

Células dendríticas

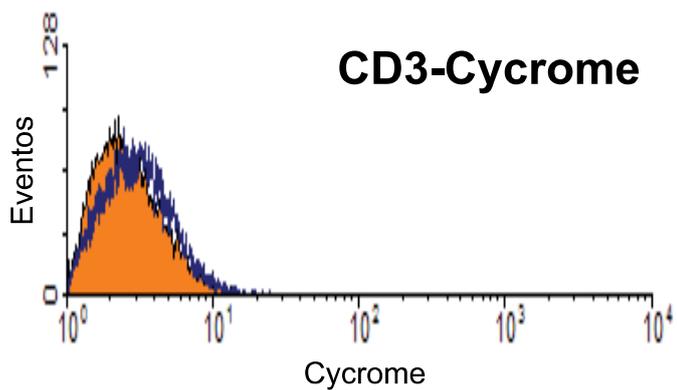
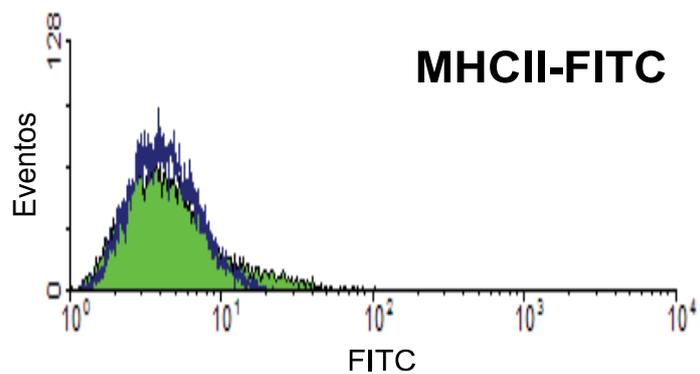
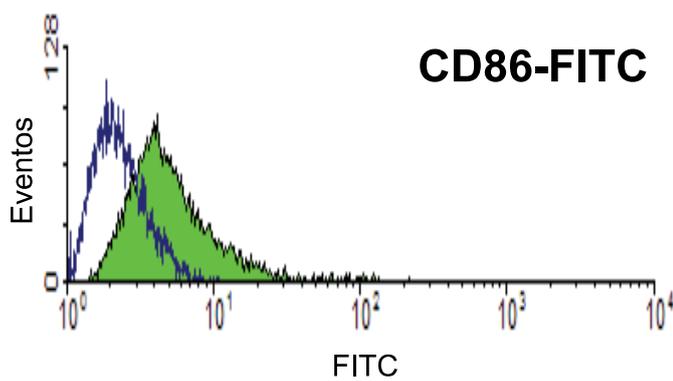
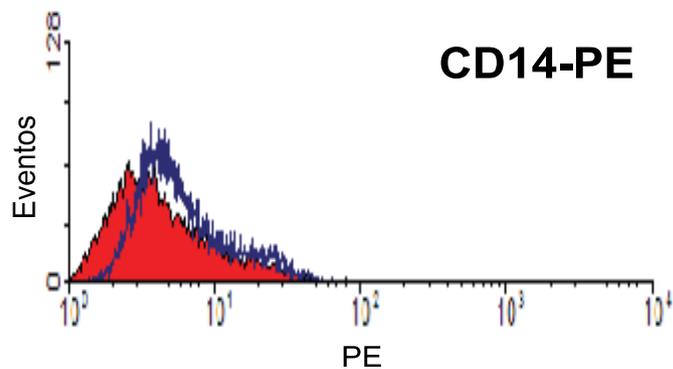
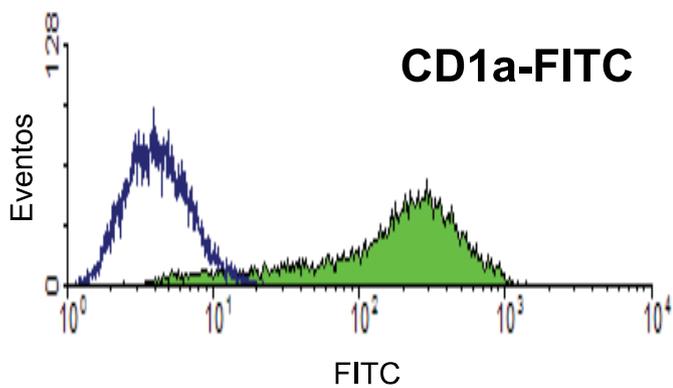
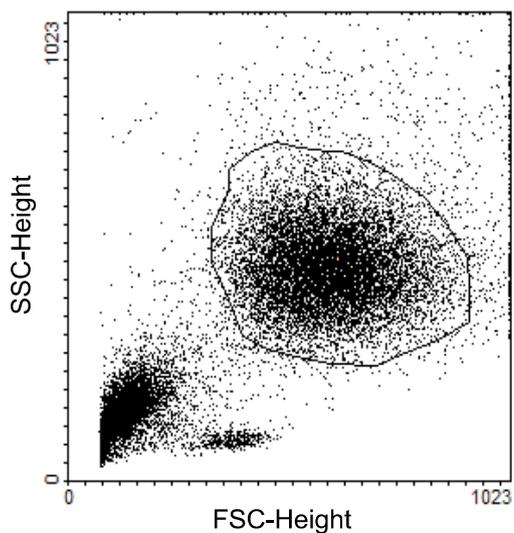


Figura 4. Caracterización de células dendríticas por citometría de flujo. Las moDC se diferenciaron a partir de monocitos humanos por el cultivo durante 7 días con GM-CSF e IL-4 y se determinó la expresión en superficie de CD1a, CD14, CD86, MHCII y CD3 por citometría de flujo. Las células se fijaron y se tiñeron para determinar la expresión en superficie de los diferentes marcadores como se indica en la sección de Materiales y Métodos. La gráfica muestra un experimento representativo (n=3).

VI.3. *Leishmania mexicana* incrementa la viabilidad de las moDC

Una vez purificadas y caracterizadas las moDC, lo primero que analizamos fue el efecto de los promastigotes de *Leishmania mexicana* sobre la viabilidad de las moDC tratadas con camptotecina. Estudios previos en macrófagos han demostrado que los promastigotes de *Leishmania major* previenen la apoptosis por inductores de la vía mitocondrial (Akarid et al., 2004). Por esta razón, en estos estudios elegimos como inductor a la camptotecina, el cual es un inhibidor de la topoisomerasa I. Se conoce que la camptotecina es un inductor de la vía mitocondrial de apoptosis (Liu et al., 1996). Se trataron 2×10^6 moDC con 5 $\mu\text{g/ml}$ de camptotecina y se coincubaron con promastigotes de *Leishmania mexicana* en una proporción de 5:1 y 10:1 parásitos:células por periodos de tiempo de 9 a 72 h. Como se muestra en la Figura 5, la camptotecina disminuyó la viabilidad aproximadamente un 50% a las 9 h de cultivo y la mayoría de las células murieron después de 72 h. La coincubación de las moDC con promastigotes de *Leishmania mexicana* en una proporción de 5:1 y 10:1 parásitos:células aumentó significativamente la viabilidad de las moDC tratadas con camptotecina y, en menor grado, en las células cultivadas en medio solo.

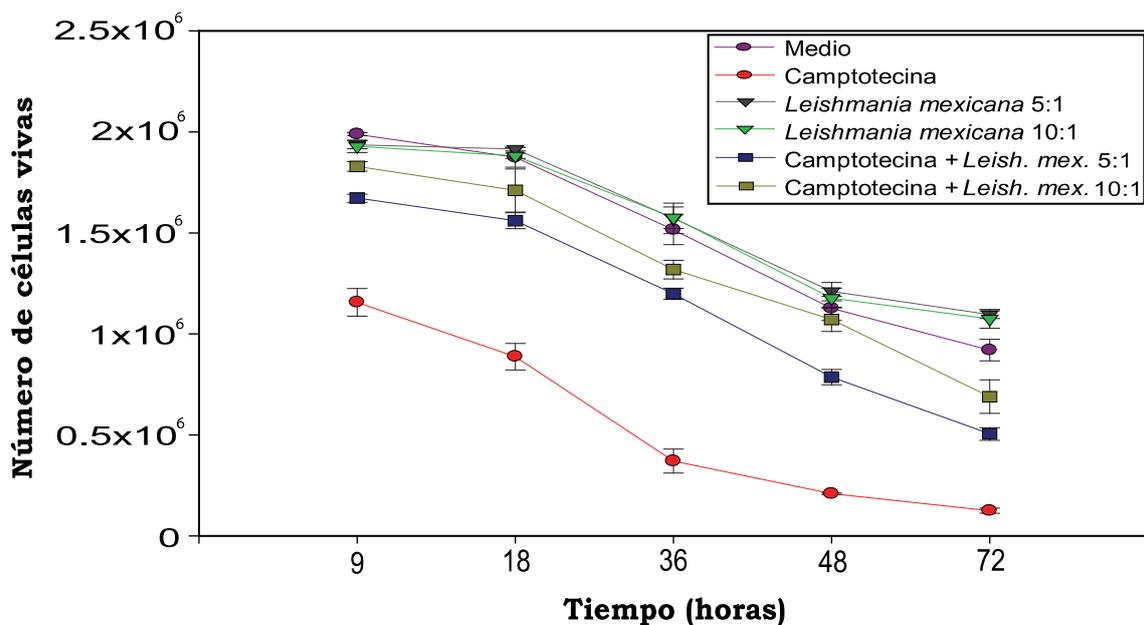


Figura 5. Curso temporal de viabilidad de moDC tratadas con camptotecina e infectadas con *Leishmania mexicana*. Las moDC se incubaron en medio solo, se trataron con 5 µg/ml de camptotecina, se infectaron con promastigotes de *Leishmania mexicana* en proporción 5:1 y 10:1 (parásitos:células) y/o se trataron con camptotecina. Las células se incubaron por diferentes tiempos y su viabilidad se determinó mediante exclusión con azul tripán. La gráfica representa el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

VI.4. Análisis morfológico de las moDC por tinción con Giemsa

Se utilizaron moDC humanas para analizar el efecto de *Leishmania mexicana* sobre la apoptosis en una de sus células hospederas. Para determinar el efecto de *Leishmania mexicana* sobre la apoptosis de las moDC, las células se trataron con camptotecina y se incubaron con promastigotes de *Leishmania mexicana* durante 12 horas y se analizó la morfología utilizando la tinción con Giemsa. Como se indica en la Figura 6A, las moDC no infectadas mostraron sus nucleos intactos. El tratamiento con camptotecina causó cambios morfológicos apoptóticos como la pérdida de la estructura nuclear (Figura 6B). Sin embargo, cuando fueron incubadas con *Leishmania mexicana*, estas alteraciones morfológicas disminuyeron significativamente (Figura 6C).

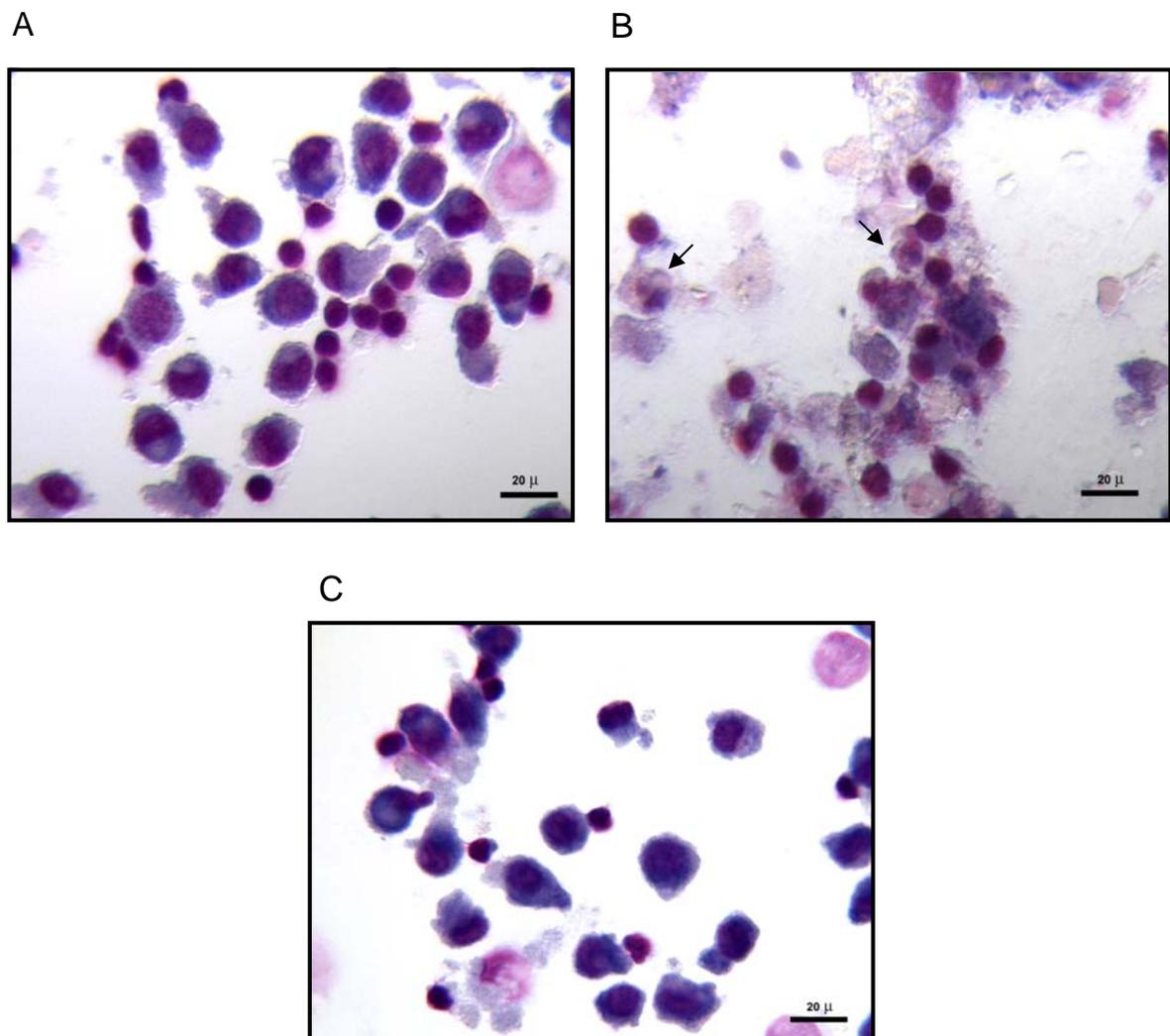


Figura 6. *Leishmania mexicana* reduce los cambios morfológicos inducidos por camptotecina en células dendríticas. Las preparaciones de las moDC se tiñeron con Giemsa y las células apoptóticas (flecha) se analizaron morfológicamente ($\times 400$). Las microfotografías muestran a las moDC tratadas de la siguiente manera: **A.** moDC incubadas únicamente con medio R-10 por 12 horas, **B.** moDC tratadas con camptotecina (5 $\mu\text{g/ml}$) y **C.** moDC tratadas con camptotecina y co-cultivadas con promastigotes de *Leishmania mexicana*. La gráfica muestra un experimento representativo (n=3).

VI.5. Tinción con TUNEL

Además del análisis de la morfología nuclear, también se analizó el efecto inhibitor de *Leishmania mexicana* sobre la apoptosis de las moDC por ensayo de TUNEL. Durante la apoptosis, los cambios en la organización nuclear son provocados por la activación de nucleasas específicas lo que resulta en la fragmentación del DNA (Gorczyca et al., 1993). Los extremos libres del DNA ligador seccionado son detectables usando el ensayo con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) mediado por el marcaje del extremo terminal con dUTP (TUNEL) (Sanders y Wride, 1996). Como se muestra en la Figura 7, después de la incubación con camptotecina durante 12 horas las moDC mostraron una tinción intensa con TUNEL (Figura 7B). La mayoría de las moDC que se co-incubaron con promastigotes de *Leishmania mexicana* fueron negativas a TUNEL (Figura 7C), de manera similar a las moDC que se incubaron con medio solo. (Figura 7A). Estos resultados muestran que la infección con *Leishmania mexicana* inhibe la aparición y progreso de múltiples características asociadas a la apoptosis.

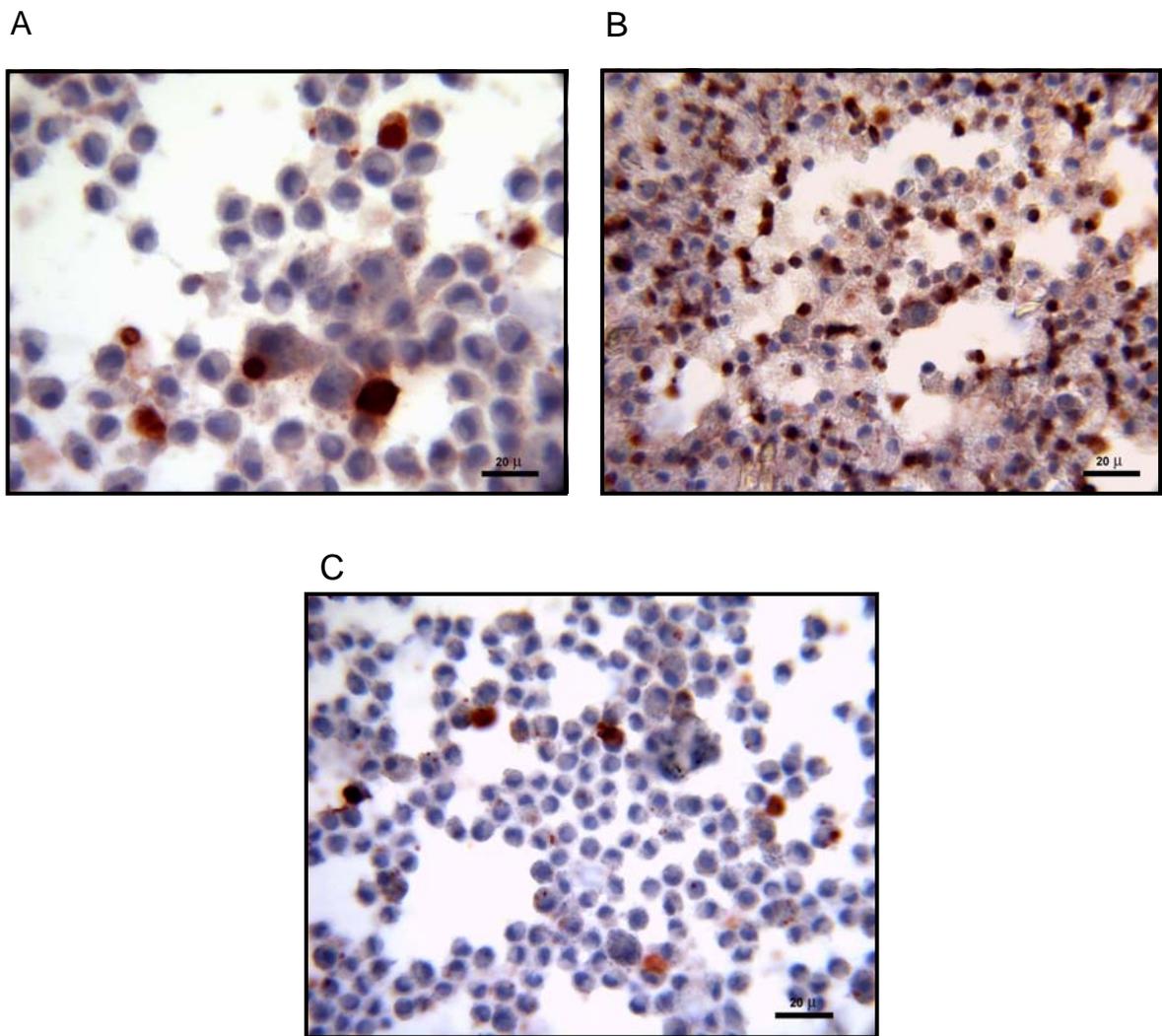


Figura 7. Apoptosis de células dendríticas detectada mediante TUNEL. Las moDC se cultivaron a una concentración de 1×10^6 /ml en medio R-10 durante 12 horas. Las células se fijaron en portaobjetos y se realizó la tinción con TUNEL como se describe en la sección de Material y Métodos. Las microfotografías muestran a las moDC tratadas en el siguiente orden: **A.** las células cultivadas solamente en medio son negativas a la tinción con TUNEL, **B.** la apoptosis inducida con camptotecina muestra una elevada tinción con TUNEL y **C.** la mayoría de las moDC incubadas en presencia de camptotecina y con promastigotes de *Leishmania mexicana* muestran una mínima tinción con TUNEL. La gráfica muestra un experimento representativo (n=3).

VI.6. Ensayo de fragmentación de DNA

La electroforesis de DNA de bajo peso molecular extraído de moDC incubadas con camptotecina durante 18 horas mostró la fragmentación del DNA como un indicativo de activación de endonucleasas característica de la apoptosis. La fragmentación de DNA inducida por camptotecina fue prevenida después del tratamiento de moDC con promastigotes de *Leishmania mexicana*. El análisis de la degradación del DNA internucleosomal reveló una inhibición de la apoptosis en moDC mostrado por la marcada reducción de fragmentos de cromatina de bajo peso molecular después de la coincubación con los parásitos comparado con las moDC incubadas solo con camptotecina. Interesantemente, el efecto inhibitorio de *Leishmania mexicana* sobre la fragmentación del DNA de moDC no fue dosis-dependiente a partir de que estas eran mas evidentes en células coincubadas con una proporción de 5:1 comparándola con una proporción de 10:1 parásitos:células (Figura 8).

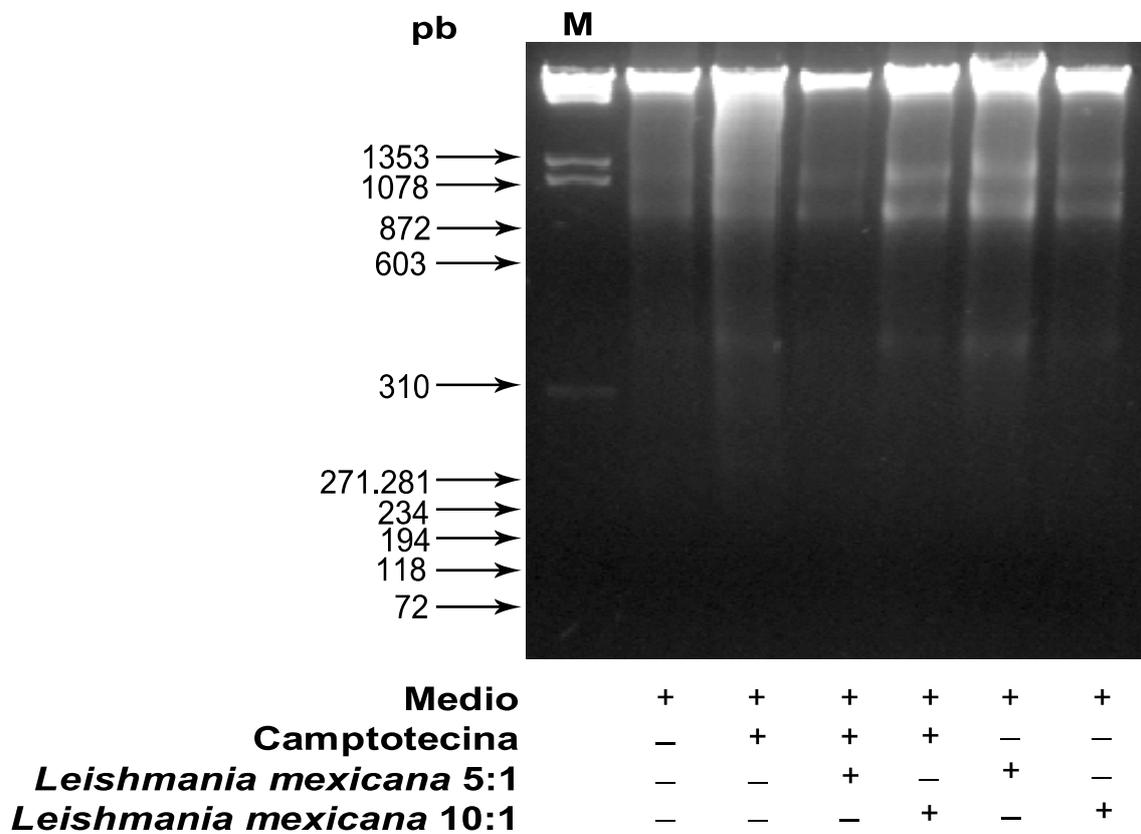
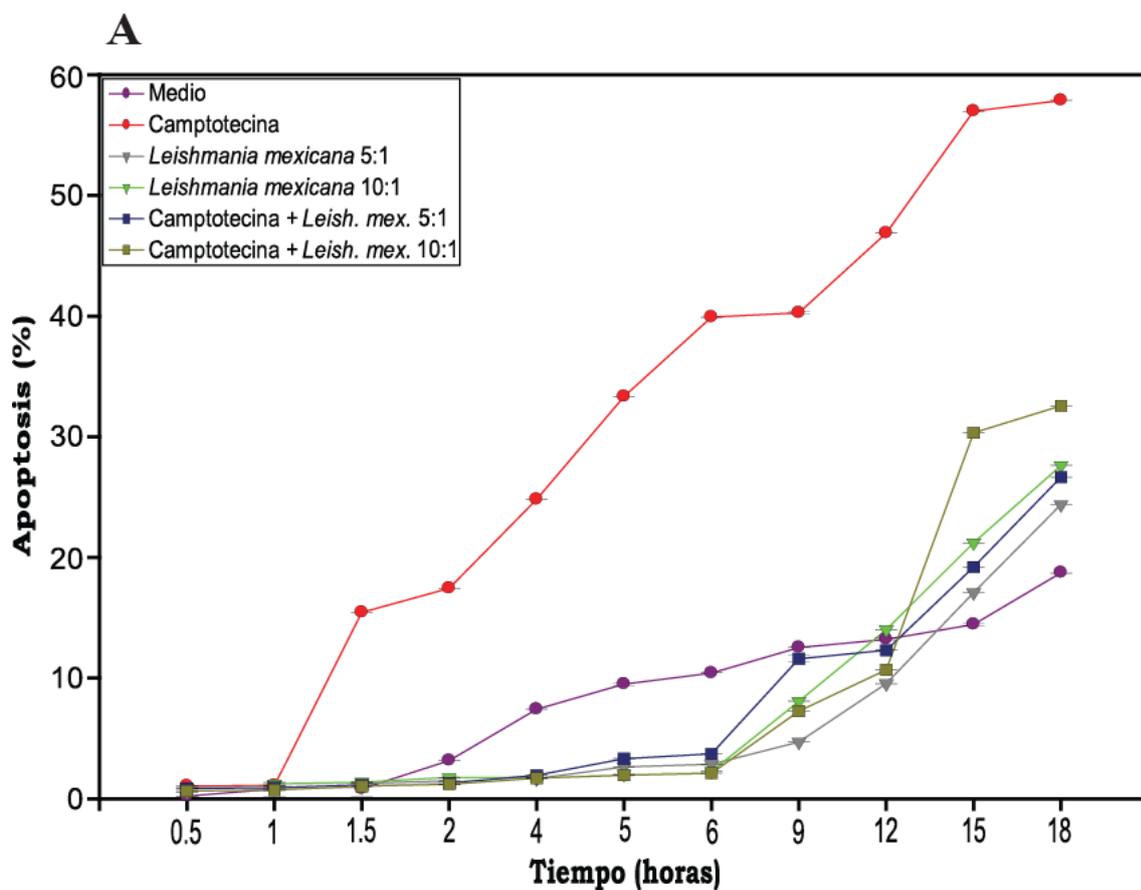


Figura 8. Análisis por electroforesis de la fragmentación del DNA en moDC. La degradación del DNA de las moDC se utilizó como índice de apoptosis. La fragmentación del DNA se analizó mediante el aislamiento del DNA genómico de moDC sometidas a las diferentes condiciones experimentales. Se utilizaron 3×10^6 moDC de cada condición se lavaron con PBS y se resuspendieron 200 μ l. El DNA genómico se aisló utilizando DNeasy[®] Blood and Tissue Kit (Qiagen GmbH Hilden, Alemania). El DNA obtenido se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% y se visualizó con una tinción con bromuro de etidio. La gráfica muestra un experimento representativo (n=3).

VI.7. *Leishmania mexicana* inhibe la exposición extracelular de fosfatidilserina inducida por camptotecina

Un marcador temprano de apoptosis celular es la aparición de fosfatidilserina (PS) sobre la membrana externa, un proceso que es llamado translocación membranal de PS. La PS puede ser detectada por la tinción con Anexina V. La inhibición de la apoptosis inducida con camptotecina por *Leishmania mexicana* se estudió mediante el análisis de la expresión superficial de PS utilizando Anexina V-FITC en conjunto con yoduro de propidio (IP) por FACS. El curso temporal y un experimento representativo de tres ensayos individuales se describen en la Figura 9. Como se muestra en la Figura 9A, se observó el efecto inhibitorio de *Leishmania mexicana* sobre la translocación de PS en moDC tratadas con camptotecina a las 12 horas de incubación con el inductor de apoptosis y los parásitos. En este mismo tiempo, como se muestra en la Figura 9B, el 95.1% de las moDC no infectadas fueron identificadas como células viables (Anexina V-FITC⁻/IP⁻) mientras que sólo el 0.3% fueron apoptóticas (Anexina V-FITC⁺/IP⁻). En contraste, como se muestra en la figura 9C, únicamente el 26.5% de las células tratadas con camptotecina fueron viables (Anexina-V⁻/IP⁻) y 45.5% fueron apoptóticas (Anexina-V⁺/IP⁻). En la Figura 9D, se infectaron las células con *Leishmania mexicana* en una proporción 5×10^6 parásitos por cada 1×10^6 moDC donde el 67% fueron viables (Anexina V-FITC⁻/IP⁻) y el 21% fueron apoptóticas (Anexina V-FITC⁺/IP⁻) mientras que en la Figura 9E se infectaron las células en una proporción 10×10^6 parásitos por cada 1×10^6 moDC y el porcentaje de células viables (Anexina V-FITC⁻/IP⁻) fue de 89.1% y el de células apoptóticas (Anexina V-FITC⁺/IP⁻) fue de 10.4%. Además, al infectar las células con *Leishmania mexicana* (5×10^6 parásitos por cada 1×10^6) e inducir apoptosis con camptotecina se muestra que el 88.7% fueron viables (Anexina V-FITC⁻/IP⁻) y el 5.6% fueron apoptóticas (Anexina V-FITC⁺/IP⁻). Interesantemente, el 98.6% fueron viables (Anexina V-FITC⁻/IP⁻) y únicamente el 1.3% de las moDC infectadas con *Leishmania mexicana* (10×10^6 parásitos por cada 1×10^6) y tratadas con camptotecina fueron apoptóticas (Anexina-V⁺ PI⁻) (Fig. 9G). En la Figura 9H se muestra la media del porcentaje de las células tratadas con camptotecina e infectadas con *Leishmania mexicana* en apoptosis (Anexina-V⁺ PI⁻) de tres experimentos independientes. En comparación con las células tratadas con camptotecina y sin infectar, la infección con *Leishmania mexicana* mostró una disminución en la

apoptosis similar a la detectada en las moDC cultivadas en medio solamente ($47.6\% \pm 10.7\%$ versus $1.4\% \pm 0.2\%$). Las células necróticas se diferenciaron de las apoptóticas por la tinción nuclear del DNA con IP. La tinción con Anexina V mostró una baja expresión de PS en las moDC después de la incubación por 12 h. Hubo cierto marcaje con IP que probablemente es una indicación de una apoptosis tardía. La co-incubación con camptotecina resultó en un incremento marcado en la unión de Anexina-V mientras que la co-incubación de las moDC con camptotecina y promastigotes de *Leishmania mexicana* resultó en una disminución marcada en la unión de Anexina y IP.



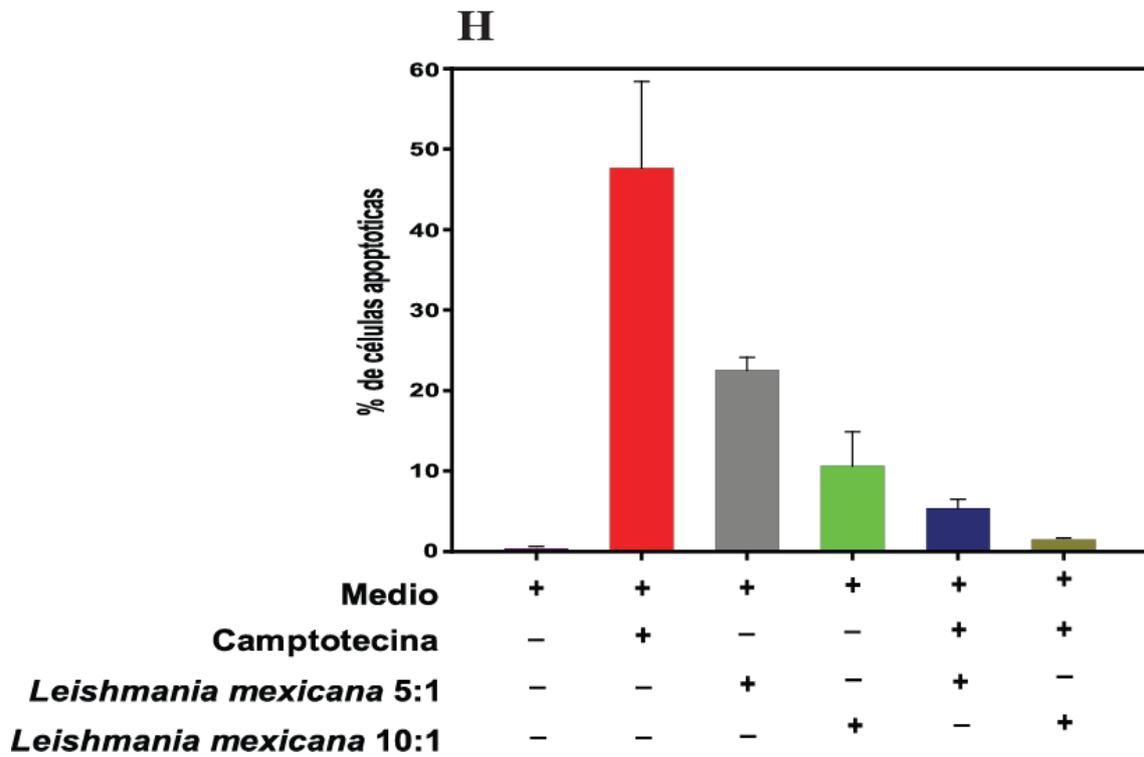
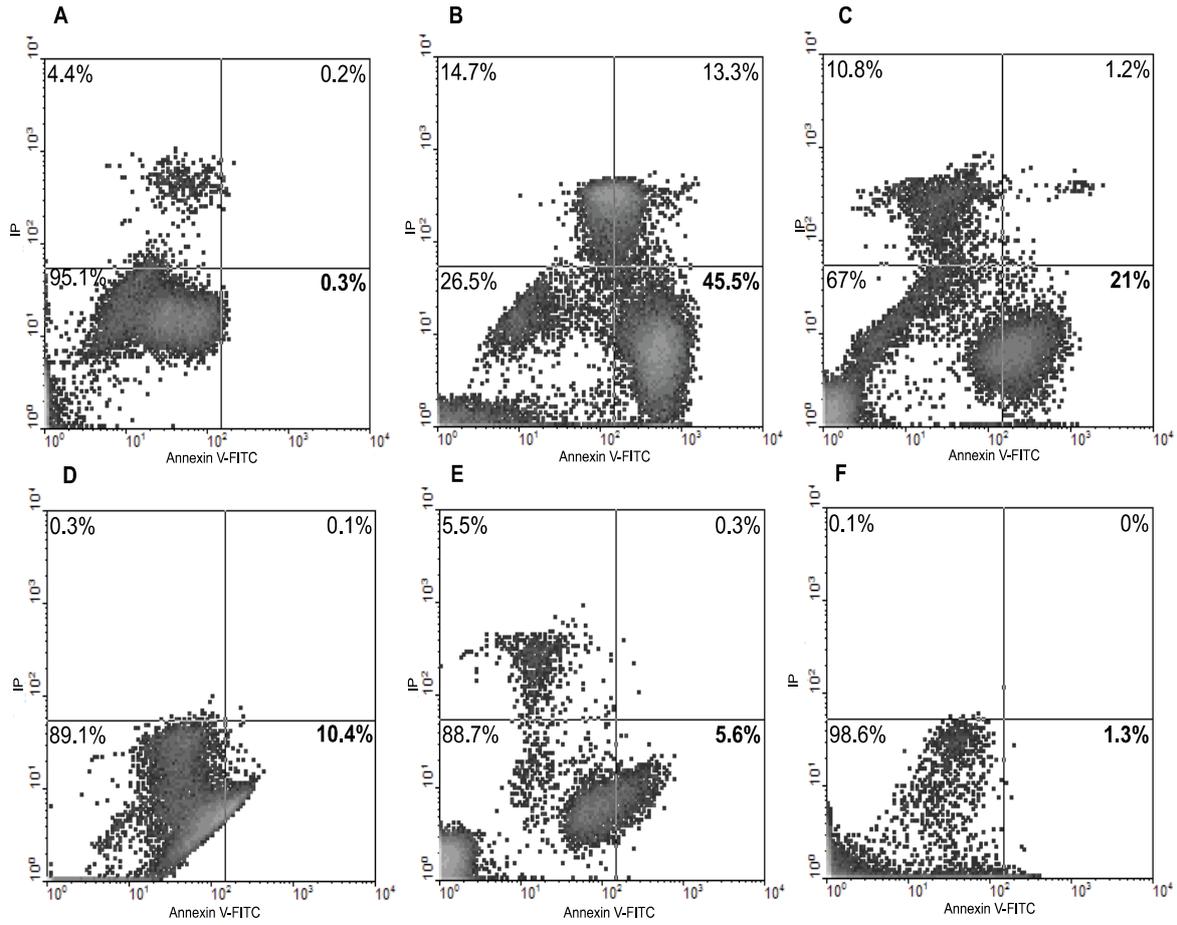


Figura 9. *Leishmania mexicana* inhibe la apoptosis en moDC, analizado por la unión de Anexina-V a la fosfatidilserina externalizada. Las moDC se infectaron con *Leishmania mexicana* en una proporción de 10:1 parásitos por moDC durante 18 horas. **A.** Curso temporal de la exposición de PS en moDC tratadas con camptotecina e infectadas con *Leishmania mexicana*, **B-G** Un análisis por FACS representativo de tres experimentos independientes. Las células viables (Anexina-V⁻/PI⁻); no viables, incluyendo las células en apoptosis tardía o células necróticas (Anexina-V⁺/PI⁺ o Anexina-V⁻/PI⁺) y las células apoptóticas (Anexina-V⁺/PI⁻) se detectaron por la unión de Anexina-V a la fosfatidilserina externalizada en conjunto con el IP que es excluido por las células viables. **B.** El 95.1% de las moDC no infectadas fueron viables (Anexina-V⁻/PI⁻) mientras que sólo el 0.3% fueron apoptóticas (Anexina-V⁺/PI⁻). **C.** El 45.5% de las moDC tratadas con 5 µg/ml de camptotecina (control positivo de apoptosis) fueron apoptóticas (Anexina-V⁺/PI⁻) y el 13.3% no fueron viables (Anexina-V⁺ PI⁺). **D.** El 21% de las moDC infectadas con *Leishmania mexicana* 5:1 fueron apoptóticas (Anexina-V⁺/PI⁻) mientras que el 1.2% no fueron viables (Anexina-V⁺/PI⁺). **E.** El 10.4% de las moDC infectadas con *Leishmania mexicana* en una proporción de 10:1 parásitos por célula durante 18 h fueron apoptóticas (Anexina-V⁺/PI⁻) y el 0.1% de las células no fueron viables (Anexina-V⁺/PI⁺). **F.** El 5.6% de las moDC tratadas con 5 µg/ml de camptotecina e infectadas con *Leishmania mexicana* en una proporción de 5:1 parásitos por célula fueron apoptóticas (Anexina-V⁺/PI⁻) mientras que el 0.3% no fueron viables (Anexina-V⁺/PI⁺). **G.** El 1.3% de las moDC tratadas con 5 µg/ml de camptotecina e infectadas con *Leishmania mexicana* en una proporción de 10:1 parásitos por célula durante 18 horas fueron apoptóticas (Anexina-V⁺/PI⁻) y el 0% no fueron viables (Anexina-V⁺/PI⁺). **H.** Gráfica del promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes de las moDC tratadas bajo las diferentes condiciones experimentales.

VI.8. *Leishmania mexicana* inhibe el corte proteolítico de caspasa 3

Los cambios morfológicos y celulares asociados con la apoptosis se deben a la activación de la cascada de caspasas, dentro de la cual destaca por su papel como ejecutora, la caspasa 3 (Earnshaw et al., 1999, Thornberry y Lazebnik, 1998). Nosotros examinamos si la infección de moDC con *Leishmania mexicana* protege a estas células posteriormente a la inducción de apoptosis con camptotecina. Cuantificamos la actividad enzimática de caspasa 3 directamente en los extractos celulares usando el sustrato fluorogénico MOCAC-DEVDAPK(Dnp)-NH₂. Se obtuvo un aumento del producto fluorescente después de la fragmentación por la enzima. Los extractos celulares se incubaron con el sustrato y la liberación de MCA se cuantificó fluorométricamente. Se observó una elevada actividad enzimática de caspasa 3 en las moDC después de ser incubadas con camptotecina durante 1 a 18 horas (Fig. 10A). La inhibición de la actividad de caspasa 3 se observó en las moDC coincubadas con camptotecina y promastigotes de *Leishmania mexicana* durante 1 a 18 horas y el efecto más evidente fue a las 12 horas de incubación. La reducción en la actividad de caspasa 3 en este punto fue de 80.21%. Sorpresivamente, cuando las células se incubaron con camptotecina y con los parásitos durante 3, 6 y 9 horas, *Leishmania mexicana* no ejerció un efecto inhibitorio sobre la actividad de caspasa 3. Por el contrario, la actividad fue más elevada que la observada sólo con camptotecina. A su vez, para confirmar los datos del ensayo fluorogénico, estudiamos la activación de caspasa 3 con un ensayo de inmunoblot. Como se muestra en la Figura 10B, el tratamiento con camptotecina indujo el procesamiento de caspasa 3 con una disminución de la forma inactiva (32 kDa) y observándose el fragmento activo de 17 kDa (Nicholson, 1999) en moDC sin infectar. Por el contrario, en las células infectadas con *Leishmania mexicana*, tratadas bajo condiciones idénticas, la presencia del fragmento activo fue menor de acuerdo a la determinación de la densidad de las bandas (Fig. 10C).

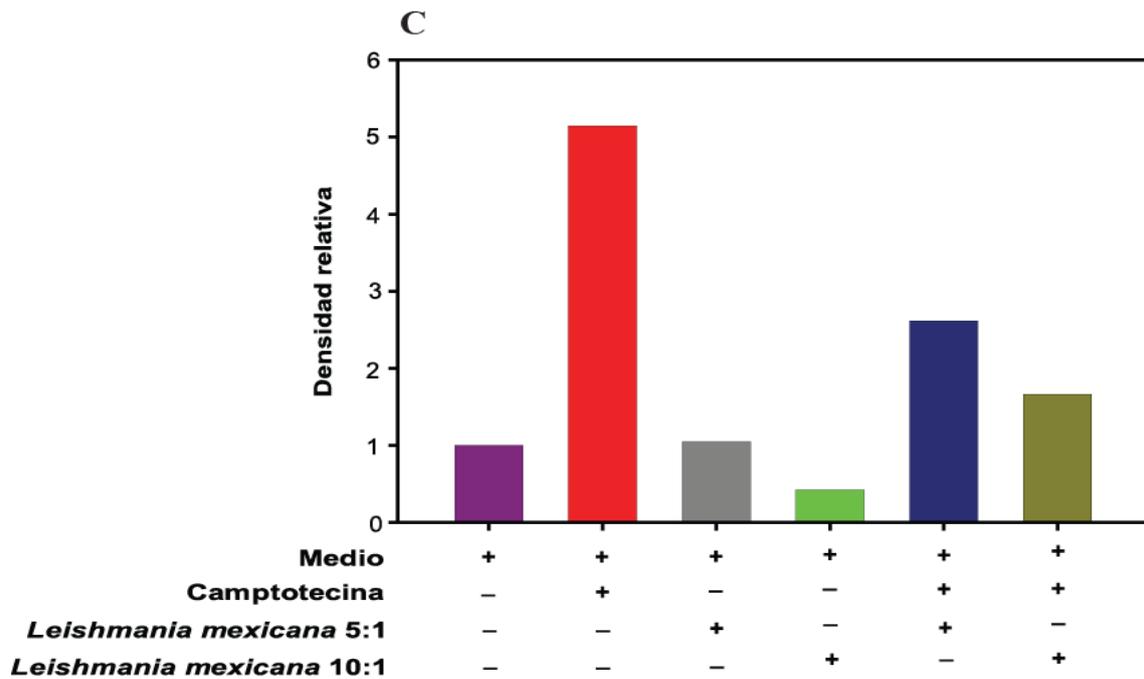
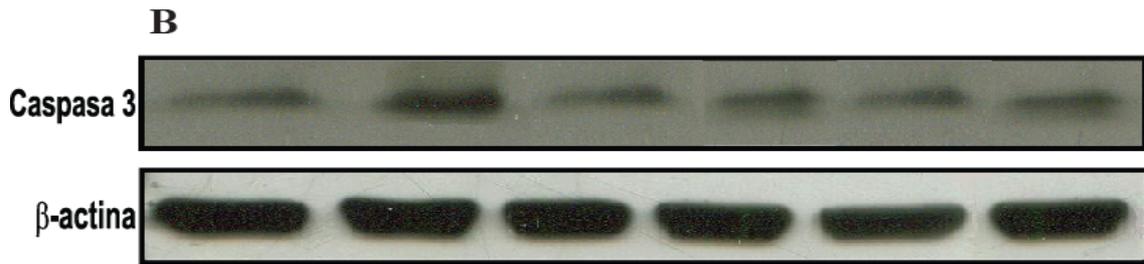
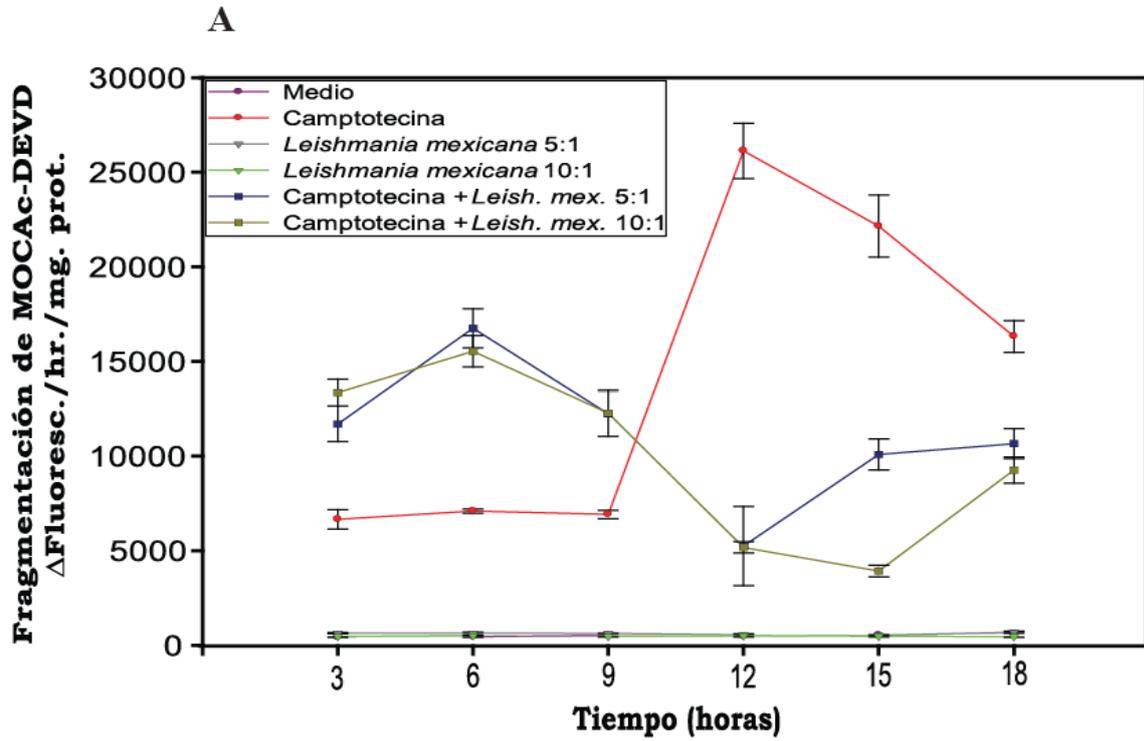


Figura 10. Efecto de *Leishmania mexicana* sobre la activación de caspasa 3 inducida por camptotecina en las moDC. Las moDC se cultivaron medio R-10, con camptotecina (5 $\mu\text{g/ml}$) y en presencia de promastigotes de *Leishmania mexicana* en una proporción de 5:1 y 10:1. **A.** Curso temporal de la actividad de caspasa 3 medida por el rompimiento de DEVD-AMC. Los valores son el promedio \pm desviación estándar de por lo menos seis experimentos independientes. **B.** Presencia del fragmento de 17-kDa de la caspasa 3 determinada por inmunodetección después de 12 h de incubación con promastigotes de *Leishmania mexicana* ya sea en presencia o ausencia de camptotecina. **C.** Análisis densitométrico de la banda de 17-kDa (caspasa 3) y β -actina (control de carga) presentes en el inmunoblot. El análisis densitométrico se llevó a cabo con el programa Image-J, NIH Image versión 0.93e. La gráfica muestra un experimento representativo (n=3).

VII. DISCUSIÓN.

La principal observación reportada en el presente estudio es que *Leishmania mexicana* inhibe la apoptosis en células dendríticas derivadas de monocitos (moDC). La coincubación *in vitro* de moDC con promastigotes de *Leishmania mexicana* llevó a una inhibición de la apoptosis inducida por camptotecina. Este efecto se observó por el análisis morfológico de moDC, detección de la fragmentación del ADN asociada a la apoptosis, así como la unión de Anexina V-FITC a la fosfatidilserina (PS). Nosotros demostramos que el retraso de la apoptosis de las moDC mediado por *Leishmania mexicana* está asociado con una disminución significativa en la actividad de caspasa 3. Los parásitos han desarrollado diversas estrategias para asegurar su supervivencia. La inhibición de la apoptosis es un tema recurrente en la biología de las bacterias intracelulares obligadas como *Chlamydia* (Perfettini et al., 2002), *Rickettsiae* (Clifton et al., 1998) y protozoarios que incluyen incluyendo *T. gondii* (Payne et al., 2003) y *Theileria* spp. (Heussler et al., 1999). La modulación de la apoptosis se observa también en varios organismos intracelulares facultativos (Gao y Abu Kwaik, 2000) y con distintas fases intracelulares y extracelulares que incluyen a *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi* (Freire-de-Lima et al., 2000) así como diferentes virus (Roulston, 1999). La dependencia de estos organismos patogénicos hacia el metabolismo de la célula hospedera para su propagación se debe a que han contribuido a la evolución de estrategias elaboradas para bloquear la apoptosis como una forma para asegurar el continuo suministro de nutrientes. Algunos de estos organismos intracelulares confieren resistencia a la apoptosis de su célula hospedera cuando la apoptosis es inducida por una amplia variedad de agentes (Gao y Abu Kwaik 2000; Heussler et al., 2001). La importancia de este fenómeno no ha sido determinada, pero el hecho de que una gran variedad de organismos confieren esta propiedad a su célula hospedera, sugiere que tiene una importancia evolutiva. La explicación de los mecanismos por medio de los cuales los organismos patogénicos confieren esta propiedad a su célula hospedera ha sido reportada recientemente (Maiti et al., 2001; Payne et al., 2003; Yilmaz et al., 2004). Dado que cada organismo intracelular tiene una interacción única con su célula hospedera, es de esperarse que cada uno de ellos emplee un mecanismo diferente para llevar a cabo la resistencia a la apoptosis.

En este trabajo confirmamos observaciones previas que han mostrado que la infección con la forma de promastigote de *Leishmania* inhibe efectivamente la apoptosis aunque la contribución de la apoptosis en la respuesta inmune contra *Leishmania* no ha sido analizada y podría representar un nuevo mecanismo de evasión del parásito.

Varios reportes han mostrado que macrófagos infectados con *Leishmania* resisten distintos estímulos apoptóticos (Aga et al., 2002; Akarid et al., 2004; Lisi et al., 2005; Moore y Matlashewski, 1994). Este efecto fue originalmente relacionado con un factor soluble secretado por los macrófagos infectados con *Leishmania donovani* al inducir la apoptosis mediante la eliminación del M-CSF (Moore y Matlashewski, 1994). Se reportó también que la molécula más abundante en la superficie de *Leishmania*, el lipofosfoglicano (LPG) inhibe la maquinaria apoptótica de la célula hospedera (Moore y Matlashewski, 1994). En otro caso, en macrófagos infectados con *Leishmania major*, el efecto antiapoptótico se relacionó con una inhibición en la liberación mitocondrial del citocromo c sin involucrar a la vía de NF- κ B, que está relacionada con la resistencia a la apoptosis inducida por eliminación de M-CSF (Akarid et al., 2004). Por otra parte, se ha demostrado también que *Leishmania major* inhibe la apoptosis espontánea de los neutrófilos. Se observó que el efecto antiapoptóticos en estas células estaba asociado con una reducción significativa de la actividad de caspasa 3 (Aga et al., 2002). Esto es indicativo de que *Leishmania* pueda emplear un mecanismo común para bloquear la apoptosis de las células infectadas. Sin embargo, el mecanismo por el cual *Leishmania* lleva a cabo esta inhibición de la apoptosis no se conoce. Recientemente se reportó que los promastigotes de *Leishmania* activan la vía de señalización de PI3K/Akt para conferir resistencia a la apoptosis a la célula hospedera (Ruhland et al., 2007).

En este trabajo se ampliaron estas observaciones y se mostró que el parásito *Leishmania mexicana* induce resistencia a la apoptosis en células dendríticas. Las células dendríticas son una célula hospedera importante para *Leishmania* y el efecto del parásito sobre la apoptosis de estas células no ha sido analizado. Se analizó el efecto del parásito sobre la viabilidad de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC) tratadas con el inductor de apoptosis, camptotecina para lo cual se realizó un curso temporal de 9 a 72 horas. Se demostró que la camptotecina disminuyó la viabilidad de las células aproximadamente en un 50% a las 9 horas de incubación. De manera interesante, la incubación con los parásitos aumentó la viabilidad de las células en valores cercanos a

los obtenidos cuando las células fueron incubadas solo en medio. Por otra parte, el efecto no fue dependiente del número de parásitos, ya que fue más evidente cuando las células se incubaron con los parásitos en una proporción 5:1 (parásitos:células) que cuando se incubaron en una proporción de 10:1. Los datos obtenidos en relación al incremento de la viabilidad de las moDC incubadas por camptotecina por *Leishmania* nos llevó a analizar el efecto del parásito sobre algunas características moleculares asociadas a la apoptosis tales como la morfología nuclear y la fragmentación del DNA. Se llevó a cabo una tinción con Giemsa de las moDC y se demostró que *Leishmania mexicana* previene la condensación nuclear inducida por camptotecina. La incubación con camptotecina causó que las moDC adquirieran una morfología apoptótica típica en donde el núcleo se observó condensado. Por el contrario, la morfología de las células tratadas con camptotecina e infectadas con *Leishmania mexicana* fue muy similar a la de las moDC incubadas en medio solamente. También, la inducción de la apoptosis con camptotecina causó la fragmentación del DNA, lo cual fue analizado por tinción con TUNEL y análisis electroforetico de los fragmentos de DNA de bajo peso molecular. La coincubación de las moDC con camptotecina y promastigotes de *Leishmania mexicana* disminuyó la fragmentación del DNA y el marcaje enzimático de los fragmentos de DNA con dUTP fluoresceinado. Se analizó también el efecto de *Leishmania mexicana* sobre la translocación de fosfatidilserina (PS), que es uno de los primeros eventos que ocurren durante el proceso de apoptosis. Como se esperaba, la camptotecina indujo una translocación de PS elevada, la cual fue inhibida por los promastigotes de *Leishmania mexicana*. Este efecto fue más evidente a las 12 horas de coincubación con el inductor de apoptosis y los parásitos.

La inducción de la apoptosis por la camptotecina involucra un paso dependiente de la mitocondria, que es controlado por los miembros de la familia de proteínas Bcl-2/Bax. Estas proteínas permeabilizan la membrana interna mitocondrial y esto causa la liberación de proteínas tales como el citocromo c del espacio intermembranal hacia el citosol. Esto provoca la activación secuencial de una familia de proteasas que cortan enzimas reparadoras, proteínas del citoesqueleto y proteínas estructurales del núcleo (Green y Reed, 1998; Martinou y Green, 2001; Wei et al., 2001). Dado el papel central de la activación de las caspasas y en particular de la caspasa 3, se analizó el efecto de *Leishmania mexicana* sobre la activación de la caspasa 3. Se demostró que *Leishmania mexicana* afecta la sobrevivencia de las moDC mediante un mecanismo que implica la

inhibición de la actividad de caspasa 3. Además, tanto la actividad de la caspasa 3 como los niveles de proteína se redujeron en las moDC tratadas con promastigotes de *Leishmania mexicana*.

En este estudio se describió principalmente la inhibición de la apoptosis inducida más que de la espontánea en moDC por *Leishmania*. Los mecanismos moleculares que intervienen en la apoptosis inducida de la célula hospedera no han sido determinados. Existen varios reportes que demuestran que los organismos intracelulares inhiben la apoptosis inducida y no la apoptosis espontánea de la célula hospedera (Gao y Abu Kwaik, 2000; Heussler et al., 2001; Lisi et al., 2005; Nash et al., 1998). Las diferencias entre el proceso apoptótico inducido y el espontáneo sugieren que los diferentes agentes infecciosos podrían usar más de una estrategia para llevar a cabo la extensión de la sobrevivencia de su célula hospedera.

La vía por la cual *Leishmania mexicana* lleva a cabo este efecto antiapoptótico no ha sido determinada. Recientemente se describió en macrófagos derivados de médula ósea la activación de la vía de PI3K/Akt como una vía importante que es modificada por *Leishmania* para asegurar la sobrevivencia de estas células (Ruhland et al., 2007). Ya que los macrófagos y las células dendríticas son las principales células hospederas de este parásito, es posible que *Leishmania* emplee un mecanismo similar de inhibición de la apoptosis, aunque existen diferencias importantes en el papel que estas células juegan en la respuesta inmune contra *Leishmania*. Los macrófagos y las células dendríticas son reconocidos secuencialmente a través de diferentes PRR's durante la evolución de la leishmaniasis cutánea. Así, en el inicio de la fase "silenciosa", los promastigotes de *Leishmania* son fagocitados principalmente por macrófagos residentes y las células dendríticas son críticas en la infección. La infección de células dendríticas lleva a la producción de IL-12 y a la activación de células TH1/Tc1 (Woelbing et al., 2006). Una vez que las células T son activadas, producen IFN- γ , que junto con antígenos de *Leishmania*, activan a los macrófagos para inducir la expresión de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) y la producción del óxido nítrico (NO) que elimina a los parásitos. La sobrevivencia de los parásitos, por lo tanto, depende en parte de su capacidad para bloquear la maquinaria de NF- κ B para detener la producción de moléculas proinflamatorias y microbicidas importantes. En nuestro laboratorio demostramos que LPG de *Leishmania mexicana* tiene la capacidad de detener la

maquinaria de NF- κ B en mayor grado en moDC que en monocitos y esto está relacionado con una inhibición en la producción de IL-12 por los monocitos (Argueta-Donohué et al., 2008). Aunque las células dendríticas producen importantes moléculas microbicidas, no se ha demostrado su capacidad para la eliminación de *Leishmania*. Estas células actúan como un nicho seguro para los parásitos y la inhibición de la apoptosis puede facilitar la dispersión de la infección al incrementar el número de células infectadas (Valdés-Reyes L. et al., 2009). En investigaciones posteriores será necesario clarificar el impacto de la apoptosis en la sobrevivencia y multiplicación del parásito. Además, se deberá establecer el mecanismo relacionado con la inhibición de la apoptosis en células dendríticas y si este mecanismo es similar al descrito en macrófagos.

VIII. CONCLUSIÓN

Las células dendríticas son una población celular que participa de manera importante en la respuesta inmune contra *Leishmania*. En este trabajo demostramos que *Leishmania mexicana* inhibe la apoptosis de células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC) inducida por camptotecina. Esto se demostró mediante el análisis de diferentes parámetros apoptóticos tales como morfología nuclear, fragmentación del DNA y translocación de fosfatidilserina, los cuales fueron afectados por el parásito. Esta inhibición de la apoptosis se asoció con una disminución en la activación de la caspasa 3.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1) Aga E., Katschinski D.M., van Zandbergen G., Laufs H., Hansen B., Müller K, Solbach W. and Laskay T. (2002). **Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major***. J. Immunol. 169: 898-905.
- 2) Akarid K., Arnoult D., Micic-Polianski J., Sif J., Estaquier J. and Ameisen J.C. (2004). ***Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c**. J. Leukoc. Biol. 76: 95-103.
- 3) Ardavín C. (2005). **Dendritic cell heterogeneity: Developmental plasticity and functional diversity**. Sem. Immunol.17: 251-252.
- 4) Argueta-Donohué J., Carrillo N., Valdés-Reyes L., Zentella A., Aguirre-García M., Becker I. and Gutiérrez-Kobeh L. (2008). ***Leishmania mexicana*: Participation of NF- κ B in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG)**. Exp. Parasitol. 120:1 1-9
- 5) Awasthi A, Marthur RK and Saha B. (2004). **Immune response to *Leishmania* infection**. Indian J. Med. Res. 119: 238-258.
- 6) Brandonisio O., Spinelli R. and Pepe M. (2004). **Dendritic cells in *Leishmania* infection**. Microbes and Infection. 6: 1402-1409.
- 7) Carmen J.C. and Sinai A.P. (2007). **Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites**. Molec. Microbiol. 64:4 904-916.
- 8) Cheng E.H., Kirsch D.G., Clem R.J. (1997). **Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases**. Science. 278: 1966–1968.
- 9) Cheng E.H., Wei M.C., Weiler S., Flavell R.A., Mak T.W., Lindsten T. and Korsmeyer S.J. (2001). **Bcl-2, Bcl-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis**. Mol. Cell. 8:705-711.
- 10) Chun H.J., Zheng L. and Ahmad M. (2002). **Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency**. Nature. 419: 395–399.
- 11) Clifton D., Goss R., Sahni S., van Antwerp D., Baggs R., Marder V., Silverman D. and Sporn L. (1998). **NF- κ B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 4646-4651.

- 12) Conceição-Silva F., Hahne M., Schröter M., Louis J. and Tschopp J. (1998). **The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity.** Eur. J. Immunol. 28: 237-245.
- 13) Deveraux Q. and Reed J. (1999). **IAP family proteins – Suppressors of apoptosis.** Genes Dev. 13: 239-252.
- 14) Doseff A.I. (2004). **Apoptosis: The sculptor of development.** Stem Cells and Develop. 13: 473-483.
- 15) Earnshaw W.C., Martins L.M. and Kaufmann S.H. (1999). **Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis.** Annu. Rev. Biochem. 68: 383-424.
- 16) Eldadah B.A., Yakolev A.G, and Faden A.I. (1996). **A new approach for the electrophoretic detection of apoptosis.** Nucl. Acid Res. 24: 4092-4093.
- 17) Fadeel B. and Orrenius S. (2005). **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease.** J. Internal Med. 259 479-517.
- 18) Freire-de-Lima C.G., Nascimento D.O., Soares M.B., Bozza P.T., Castro-Faria-Neto H.C., de Mello F.G., DosReis G.A. and Lopes M.F. (2000). **Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages.** Nature. 403: 199-203.
- 19) Gao L. and Abu Kwaik Y. (2000). **Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens.** Microbes Infect. 2: 1705-1719.
- 20) Goping I.S., Barry M. and Liston P. (2003). **Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition.** Immunity. 18: 355–365.
- 21) Gorczyca W.J., Gong J. and Darzynkiewicz Z. (1993). **Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays.** Cancer Res. 53: 1945-1951.
- 22) Gordon S. and Taylor P.R. (2005). **Monocyte and macrophage heterogeneity.** Nat. Rev. Immunol. 5: 953-964.
- 23) Green D.R. and Reed J.C. (1998). **Mitochondria and apoptosis.** Science 281: 1309-1312.
- 24) Häcker G., Kirschnek S. and Fischer S.F. (2006). **Apoptosis in infectious disease: how bacteria interfere with the apoptotic apparatus.** Med. Microbiol. Immunol. 195: 11-19.

- 25) Heussler V.T., Küenzi P. and Rottenberg S. (2001). **Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites.** *Int. J. Parasitol.* 31: 1166-1176.
- 26) Heussler V.T., Machado J., Fernandez P.C., Botteron C., Chen C.G., Pearse M.J. and Dobbelaere D.A. (1999). **The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 7312-7317.
- 27) Homburg C.H., de Haas M., von dem Borne A.E., Verhoeven A.J., Reutelingsperger C.P. and Roos D. (1995). **Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*.** *Blood* 85: 532-540.
- 28) Imhof B.A. and Aurrand-Lions M. (2004). **Adhesion mechanism regulating the migration of monocytes.** *Nat. Rev. Immunol.* 4: 432-444.
- 29) Inaba K., Inaba M., Deguchi M., Hagi K., Yasumizu R., Ikehara S., Muramatsu S. and Steinman R.M. (1993). **Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3038-3042.
- 30) Jacobson M.D., Weil M. and Raff M.C. (1997). **Programmed cell death in animal development.** *Cell.* 88: 347-354.
- 31) Jin Z. and El-Deiry W.S. (2005). **Overview of cell death signaling pathways.** *Cancer & Biol. & Therapy.* 4:2 139-163.
- 32) Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T. and van Oers M.H. (1994). **Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis.** *Blood* 84: 1415-1420.
- 33) Krug A., Veeraswamy R., Pekosz A., Kanagawa O., Unanue E.R., Colonna M. and Cella M. (2003). **Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells.** *J. Exp. Med.* 197: 899-906.
- 34) Kumar S. (2007). **Caspase function in programmed death cell.** *Cell Death and Differ.* 14: 32-43.
- 35) León B., López-Bravo M. and Ardavin C. (2005). **Monocyte-derived dendritic cells.** *Semm. in Immunol.* 17: 313-318.
- 36) Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S. and Wang X. (1997). **Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.** *Cell.* 91: 479-489.

- 37) Lisi S., Sisto M., Acquafredda A., Spinelli R., Schiavone M., Mitolo V., Brandonisio O. and Panaro M. (2005). **Infection with *Leishmania infantum* Inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937.** J. Eucaryot. Microbiol. 52: 211-217.
- 38) Liu L.F., Desai S.D., Li T.K., Mao Y., Sun M. and Sim S.P. (1996). **Mechanism of action of camptothecin.** Ann. N. Y. Acad. Sci. 803: 44-49.
- 39) Maiti D., Bhattacharyya A. and Basu J. (2001). **Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylating Bad through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway.** J. Biol. Chem. 276: 329-333.
- 40) Martinou J.C. and Green D.R. (2001). **Breaking the mitochondrial barrier.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2: 63-67.
- 41) McConville M.J. and Handman E. (2007). **The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis.** Int. J. Parasitol. 37: 1047-1051.
- 42) Momoi T. (2004). **Caspases involved in ER-stress mediated cell death.** J. Chem. Neuroanat. 28: 101-105.
- 43) Moore K.J. and Matlashewski G. (1994). **Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis.** J. Immunol. 152: 2930-2937.
- 44) Moretta L., Ferlazzo G., Bottino C., Vitale M., Pende D., Mingari M.C. and Moretta A. (2006). **Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interaction.** Immunological Rev. 214: 219-228.
- 45) Movassagh M. and Foo R.S-Y. (2008). **Simplified apoptotic cascades.** Heart Fail Rev. 13:2 111-119
- 46) Naik S.H., Metcalf D., van Nieuwenhuijze A., Wicks I., Wu L., O’Keeffe M. and Shortman K. (2006). **Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes.** Nat. Immunol. 7: 663–671.
- 47) Nash P.B., Purner M.B., Leon R.P., Clarke P., Duke R.C. and Curiel T.J. (1998). ***Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis.** J. Immunol. 160: 1824-1830.
- 48) Nicholson D., et al. (1995). **Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.** Nature. 37: 37-43.
- 49) Nicholson D.W. (1999). **Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death.** Cell Death Differ. 6: 1028-1042.
- 50) Palucka K. and Banchereau J. (1999). **Dendritic cells a link between innate and adaptive immunity.** J of Clinical Immunol. 19:1 12-25.

- 51) Pancer Z. and Cooper M.D. (2006). **The evolution of adaptive immunity.** *Annu. Rev. Immunol.* 24: 497-518.
- 52) Payne T.M., Molestina R.E. and Sinai A.P. (2003). **Inhibition of caspase activation and a requirement for NF- κ B function in the *Toxoplasma gondii*-blockade of host apoptosis.** *J. Cell Sci.* 116: 4345-4358.
- 53) Pellegrini M., Bath S. and Marsden V.S. (2005). **FADD and caspase-8 are required for cytokine-induced proliferation of hemopoietic progenitor cells.** *Blood.* 106: 1581–1589.
- 54) Perfettini J., Darville T., Dautry-Varsat A., Rank R.G. and Ojcius D.M. (2002). **Inhibition of apoptosis by γ interferon in cells and mice infected with *Chlamydia muridarum* (the mouse pneumonitis strain of *Chlamydia trachomatis*).** *Infect. Immun.* 70: 2559-2565.
- 55) Quah B.J.C. and O'Neill H.C. (2005). **Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity.** *J. Cell. Mol. Med.* 9:3 643-654.
- 56) Rahman M.M. and McFadden G. (2006). **Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens.** *PLOS pathog.* 2:2 66-77.
- 57) Randolph G.J., Beaulieu S., Lebecque S., Steinman R.M. and Muller W.A. (1998). **Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking.** *Science.* 282: 480–483.
- 58) Randolph G.J., Inaba K., Robbiani D.F., Steinman R.M. and Muller W.A. (1999). **Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells *in vivo*.** *Immunity.* 11: 753–761.
- 59) Reid C.D., Stackpoole A., Meager A. and Tikerpae, J. (1992). **Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34⁺ progenitors in human bone marrow.** *J. Immunol.* 149: 2681–2688.
- 60) Rich T., Watson C.J. and Wyllie A. (1999). **Apoptosis: the germs of death.** *Nat. Cell Biol.* 1: 69–71.
- 61) Romani N., Gruner S., Brang D., Kämpgen E., Lenz A., Trockenbacher B., Konwalinka G., Fritsch P.O., Steinman R.M. and Schuler G. (1994). **Proliferating dendritic cell progenitors in human blood.** *J. Exp. Med.* 180: 83-93.
- 62) Roos A., Xu W., Castellano G., Nauta A.J., Garred P., Daha M.R. and van Kooten C. (2004). **A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells.** *Eur. J. Immunol.* 34: 921-929.
- 63) Roulston A., Marcellus R. and Branton P. (1999). **Viruses and apoptosis.** *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 577-628.

- 64) Ruhland A., Leal N. and Kima P.E. (2007). ***Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis.** Cell. Microbiol. 9: 84-96.
- 65) Sacks D. and Noben-Trauth N. (2002). **The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice.** Nature. 2: 845-858.
- 66) Sallusto F. and Lanzavecchia A. (1994). **Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha.** J. Exp. Med. 179: 1109-1118.
- 67) Salvesen G. and Duckett C. (2002). **IAP proteina: Blocking the road to death's door.** Nat. Rev. 3: 401-410.
- 68) Sanders E.J. and Wride M.A. (1996). **Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique.** Histochem J. 28: 275-281.
- 69) Sereno D., Holzmuller P., Mangot I., Cuny G., Ouaisi A. and Lemesre J.L. (2001). **Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes.** Antimicrob. Ag. Chemother. 45:7 2064-2069.
- 70) Shaha C. (2006). **Apoptosis in *Leishmania* species and its relevance to disease pathogenesis.** Indian J. Med. Res. 123: 233-244.
- 71) Shi Y. (2002). **Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis.** Mol. Cell 9: 459-470.
- 72) Steinman R.M. and Banchereau J. (2007). **Taking dendritic cells into medicine.** Nature Rev. 27: 419-426.
- 73) Steinman R.M., Turley S., Mellman I. and Inaba K. (2000). **The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells.** J. Exp. Med. 191: 411-416.
- 74) Sudhandiran G. and Shaha C. (2003). **Antimonial-induced increase in intracellular Ca^{2+} through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes.** J. Biol. Chem. 278:27 25120-25132.
- 75) Thornberry N.A. and Lazebnik Y. (1998). **Caspases: enemies within.** Science 281: 1312-1316.
- 76) Tripathi P., Singh V. and Naik S. (2007). **Immuneresponse to *Leishmania*: paradox rather than paradigm.** FEMS Immunol. Med. Microbiol. 51: 229-242.

- 77) Turley S.J., Inaba K., Garrett W.S., Ebersold M., Unternaehrer J., Steinman R.M. and Mellman I. (2000). **Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells.** *Science*. 288: 522–527.
- 78) Valdés-Reyes L., Argueta J., Morán J., Salaiza N., Hernández J., Berzunza M., Aguirre-García M., Becker I. and Gutiérrez-Kobeh L. (2009). ***Leishmania mexicana*: Inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells.** *Exp. Parasitol.* 121: 199-207.
- 79) Von Stebut E. (2007). **Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity.** *Eur. J. Dermatol.* 17:2 115.122.
- 80) von Stebut, E. and Udey M.C. (2004). **Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*.** *Microbes and Infect.* 6: 1102-1109.
- 81) Wan H. and Dupasquier M. (2005). **Dendritic cells in vivo and in vitro.** *Cell. and Molec. Immunol.* 2:1 28-35.
- 82) Wang Z.B., Liu Y.Q. and Cui Y.F. (2005). **Pathways to caspase activation.** *Cell Biol. Int.* 29: 489–496
- 83) Wei M.C., Zong W.X., Cheng E.H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A.J., MacGregor G.R., Thompson C.B. and Korsmeyer S.J. (2001). **Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and cell death.** *Science* 292: 727-730.
- 84) Woelbing F., Kostka S.L., Moelle K., Belkaid Y., Sunderkoetter C., Verbeek S., Waisman A., Nigg A.P., Knop J., Udey M.C. and von Stebut E. (2006). **Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity.** *J Exp Med.* 203: 177-188.
- 85) Wu L, and Yong-Jun L. (2007). **Development of Dendritic-Cell Lineages.** *Immunity Rev.* 26: 741-750.
- 86) Wu L., Li C.L. and Shortman K. (1996). **Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny.** *J. Exp. Med.* 184: 903–911.
- 87) Yang Q.H., Church-Hajduk R., Ren J., Newton M.L. and Du C. (2003). **Omi/Htra2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis.** *Genes Dev.* 17: 1487-1496.
- 88) Yilmaz O., Jungas T., Verbeke P. and Ojcius D.M. (2004). **Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*.** *Infect. Immun.* 72: 3743-3751.

89) Zermati Y., Garrido C., Amsellem S. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. J. Exp. Med. 193: 247–254.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Leishmania mexicana: Inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells

Leonardo Valdés-Reyes^a, Jesús Argueta^a, Julio Morán^b, Norma Salaiza^a, Joséln Hernández^a, Miriam Berzunza^a, Magdalena Aguirre-García^a, Ingeborg Becker^a, Laila Gutiérrez-Kobeh^{a,*}

^a Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, México, D.F. 06726, Mexico

^b Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 March 2008

Received in revised form 3 October 2008

Accepted 24 October 2008

Available online 18 November 2008

Keywords:

Leishmania mexicana

Apoptosis

Dendritic cells (DC)

Monocyte-derived dendritic cells (moDC)

Camptothecin

ABSTRACT

Macrophages (M ϕ) and dendritic cells (DC) are the major target cell populations of the obligate intracellular parasite *Leishmania*. Inhibition of host cell apoptosis is a method employed by multiple pathogens to ensure their survival in the infected cell. *Leishmania* has been shown to protect M ϕ and neutrophils from both natural and induced apoptosis. As shown in this study, apoptosis in monocyte-derived dendritic cells (moDC) induced by treatment with camptothecin was downregulated by coinubation with *L. mexicana*, as detected by morphological analysis of cell nuclei, TUNEL assay, gel electrophoresis of low molecular weight DNA fragments, and annexin V binding to phosphatidylserine. The observed antiapoptotic effect was found to be associated with a significant reduction of caspase-3 activity in moDC. The capacity of *L. mexicana* to delay apoptosis induction in the infected moDC may have implications for *Leishmania* pathogenesis by favoring the invasion of its host and the persistence of the parasite in the infected cells.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is caused by the infection with protozoa of the genus *Leishmania*. In the mammalian host, *Leishmania* parasites are obligate intracellular pathogens that escape the toxic extracellular milieu by being internalized by phagocytes (Solbach and Laskay, 2000). The primary host cells of the intracellular parasites are macrophages (M ϕ) and dendritic cells (DC). Both M ϕ and DC, the major antigen-presenting cells (APC) in skin, clearly influence the development of cellular immune responses against *Leishmania* (Woelbing et al., 2006).

Intracellular parasites avoid direct destruction by the immune system of the host. The infected cell, however, still has the capacity to counteract the invasive pathogen by initiating its own death, a process which is called apoptosis. Apoptosis is a highly ordered physiological response to cell damage caused by external and internal insults (Hacker, 2000; Kaufmann and Hengartner, 2001). In addition to its role in limiting the growth of infectious agents, apoptosis plays crucial roles in the immune response (Baumann et al., 2002) and development (Vaux and Korsmeyer, 1999). The molecular pathways involved in the initiation, progression and execution of apoptosis have been elucidated in great detail (Kaufmann and Hengartner, 2001). Two major pathways of apoptosis have been described (Danial and Korsmeyer, 2004). These are: (i)

the mitochondrial-dependent pathway, also called the intrinsic pathway, which is triggered by DNA damage or stress and results in the release of cytochrome *c* from the mitochondria (Green and Reed, 1998), and (ii) the extrinsic pathway, which is dependent on the engagement of members of the TNF family of receptors called death receptors (Nagata, 1997). It has been shown that there is cross-talk between these pathways and that mitochondria are most likely involved in both pathways (Li et al., 1998). Regardless of the apoptogenic trigger, stimuli converge on the activation and activity of a group of cysteine proteases, called caspases, that cleave at specific aspartic-acid-containing substrate recognition sites (Budihardjo et al., 1999; Earnshaw et al., 1999). Caspases exist within the cell as inactive zymogens that are activated along a specific amplification cascade by proteolytic cleavage in response to an apoptogenic signal. Accordingly, the release of cytochrome *c* from the mitochondria activates the initiator caspase, caspase-9, which in turn activates the executioner caspase, caspase-3 (Shi, 2002). Given the crucial role of caspases in apoptosis, inhibition of their activation and/or activity is a likely target for microbial intervention.

As M ϕ and DC are the host cells required for *Leishmania* persistence and propagation, the induction or inhibition of apoptosis in these cells may have important implications for the understanding of the parasite pathogenesis. It has been reported previously that *Leishmania donovani* infection of murine bone marrow-derived macrophages (BMDM) represses macrophage apoptosis induced in vitro by deprival of macrophage-colony stimulating factor

* Corresponding author. Fax: +52 55 57610249.

E-mail address: lgutierr@servidor.unam.mx (L. Gutiérrez-Kobeh).

(M-CSF) through the secretion of TNF- α by the infected macrophages which might act in an autocrine manner to confer the anti-apoptotic effect observed (Moore and Matlashewski, 1994). Also, it has been shown that in vitro infection of BMDM with *Leishmania major* protects them from apoptosis induced by deprivation of M-CSF and delays apoptosis caused by treatment with staurosporine, a protein kinase inhibitor that induces cytochrome *c* translocation into the cytosol. The mechanism involved in the prevention of apoptosis was associated with a repression of mitochondrial release of cytochrome *c* and did not involve the nuclear factor- κ B (Akarid et al., 2004). Key components of the survival response, including inhibitors of apoptosis (IAP), include genes regulated by the transcription factor NF- κ B (Ghosh, 1999).

Other cells that are able to internalize *Leishmania* promastigotes are polymorphonuclear neutrophil granulocytes (PMN) and it has been shown that *Leishmania major* inhibits the spontaneous apoptosis of these cells. The observed antiapoptotic effect was found to be associated with a significant reduction of caspase-3 activity in these cells (Aga et al., 2002). This raises the likelihood that *Leishmania* parasites employ a common mechanism to block apoptosis of their infected cell. However, the mechanism(s) by which *Leishmania* parasites achieve this inhibition of apoptosis is not known. Recently, it has been reported that *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signaling to confer host cell resistance to apoptosis. It was shown that Bad, which is a substrate of Akt, becomes phosphorylated during the course of infection with *Leishmania* promastigotes. Phosphorylated Bad mediates cell survival through interactions with 14-3-3 proteins (Ruhland et al., 2007).

Although DC are important host cells for *Leishmania*, the effect of the parasite on the apoptosis of this cell population has not been established. Here, we present findings that show that monocyte-derived dendritic cells (moDC) infection with *Leishmania mexicana* protects moDC against apoptosis induced by treatment with camptothecin which is a known inducer of apoptosis in all nucleated mammalian cells (Morris and Geller, 1996). *L. mexicana* infection prevented the typical features of apoptosis including translocation of phosphatidylserine, nuclear chromatin condensation, nuclear DNA fragmentation, and activation of the effector caspase-3. Our findings imply that enhancement of infected moDC survival is an intrinsic property of the *Leishmania* parasite, which may play a role in its life-cycle and is relevant for its survival and pathogenicity.

2. Materials and methods

2.1. Purification of monocyte-derived dendritic cells (moDC)

Dendritic cells were differentiated from CD14⁺ monocytes as described previously (Romani et al., 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Peripheral blood monocytes were obtained from buffy coats from healthy donors kindly supplied by the blood bank of the Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Monocytes were purified using Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO, USA) density gradient centrifugation at 300 g for 20 min at 20 °C. Cells were suspended in pyrogen-free and sterile RPMI-1640 medium (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated certified endotoxin tested-fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 10 mM Hepes buffer, 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, and 24 mM NaHCO₃ (R-10), incubated with CD14 MACS microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) for 15 min, and then purified by magnetic sorting. CD14⁺ monocytes were washed and left overnight in teflon beakers in R-10 medium. Afterwards, 1 \times 10⁶ monocytes were cultured in R-10 medium supplemented with 50 μ M 2-mercaptoethanol, 1000 U/ml GM-CSF, and 500 U/ml IL-4 (BD PharMingen, San Jose, CA). On days 2 and 4 half of the medium was removed from the

wells and replaced by fresh medium. On day 7 non-adherent cells were removed and used for the experiments. By flow cytometry, cells were generally 85–90% CD1a⁺ and had the phenotype CD1a⁺CD86⁺MHCII⁺.

2.2. Culture of *Leishmania mexicana*

Leishmania mexicana mexicana (MHOM/MX/92/UADY/ 68) promastigotes were grown in RPMI-1640 medium (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, USA) supplemented with 5% heat-inactivated FBS at 28 °C. Parasites were subcultured every 4 to 5 days and grown to a density of 1 \times 10⁶/ml. Promastigotes were harvested from stationary-phase cultures, centrifuged at 350 g for 10 min, washed three times in PBS, and finally counted after immobilization with glycerol.

2.3. moDC treatment

Cell cultures were subjected to different treatments: (1) infection with *L. mexicana* promastigotes (5:1 and 10:1 parasite:cell ratio); (2) treatment with the pro-apoptotic agent camptothecin (5 μ g/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA); (3) infection with *L. mexicana* promastigotes (5:1 and 10:1 parasite:cell ratio) and treatment with 5 μ g/ml camptothecin. moDC were coincubated with the parasites at 28 °C in a volume of 1 ml R-10 medium for 1 h to permit infection. Afterwards coincubations were performed at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for variable periods of time, after which time, noningested promastigotes were washed away, and infected moDC were used for the experiments. Untreated moDC were used as control.

2.4. Assessment of cell viability

Aliquots of treated cells were stained with 0.2% trypan blue, incubated for 10 min at room temperature, and counted a minimum of 100 cells. Absolute numbers of living cells were assessed by counting non-adherent-collected moDC and excluding trypan blue-stained cells.

2.5. Giemsa assay

Nuclear morphology was assessed on Giemsa-stained 1 \times 10⁶ cells fixed in absolute ethanol. Cell morphology was examined under oil immersion light microscopy and a minimum of 200 cells/slide were examined and graded as apoptotic/nonapoptotic.

2.6. TUNEL assay for chromatin fragmentation

The TUNEL assay (In Situ Cell Death Detection kit; Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Germany) was used to detect apoptotic cell death by enzymatic labeling of DNA strand breaks with fluorescein-dUTP and TdT (Gorczyca et al., 1993). Briefly, slides with 1 \times 10⁶ cells were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS (pH 7.4) for 60 min at room temperature, washed with PBS, and incubated for 10 min with 3% H₂O₂/methanol to block nonspecific peroxidase activity. Cells were washed again with PBS and then suspended in permeabilization solution (0.1% Triton X-100/0.1% sodium citrate) for 2 min on ice. Cells were washed again, resuspended in 50 μ l TUNEL-reaction mixture or in 50 μ l label solution alone (negative control) for 60 min, and incubated in a humidified dark chamber at 37 °C, followed by washing with PBS. Cells were then resuspended in 50 μ l Converter-POD [Anti-fluorescein antibody, Fab fragment from sheep, conjugated with horseradish peroxidase (POD)]. Peroxidase activity was revealed with diaminobenzidine and samples were analyzed under light microscopy.

2.7. DNA fragmentation assay

Degradation of moDC DNA was used as an index of apoptosis (Eldadah et al., 1996). DNA fragmentation was assessed by the isolation of genomic DNA from an equal number of moDC submitted to the different treatments described in the “moDC treatment” section. Briefly, 3×10^6 moDC from each treatment were washed with PBS and resuspended in 200 μ l PBS. Genomic DNA was isolated using the DNeasy[®] Blood and Tissue Kit (Qiagen GmbH Hilden, Germany). After elution from the DNeasy[®] columns, contaminating RNA was digested by incubation with 1 μ g RNase A (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min at 37 °C. DNA was then electrophoretically separated in a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

2.8. Annexin V-PI flow cytometry

The binding of annexin V-fluorescein isothiocyanate (Ann-V) (Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Germany) was used as a measurement of apoptotic moDC together with propidium iodide (PI) staining. In viable cells, phosphatidylserine (PS) is strictly confined to the inner leaflet of the plasma membrane that faces the cytosol. The surface expression of this phospholipid is an early feature of apoptosis and occurs before the loss of membrane integrity (Homburg et al., 1995). Thus, early apoptotic cells bind Ann-V, a calcium-dependent phospholipids-binding protein with high affinity for externalized PS. Furthermore, living cells exclude PI, allowing specific detection and quantification of apoptosis by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis (Koopman et al., 1994). After treating cells as described previously, non-adherent cells were pooled, pelleted by centrifugation, washed with cold PBS, and resuspended in binding buffer (10 mM Hepes–NaOH [pH 7.4], 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) to a concentration of 1×10^6 /ml. Next, 100 μ l of this cell suspension were transferred to a 5-ml tube and incubated with 5 μ l of Ann-V and 5 μ l of PI for 15 min at 25 °C in the dark. Finally, 400 μ l of binding buffer were added, and samples were analyzed by flow cytometry within 1 h on a FACSort with CellQuest software (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Samples were gated on the basis of forward versus side scatter for size, and the results are presented as the percentage of cells that were viable (Ann-V⁻ PI⁻), early apoptotic (Ann-V⁺ PI⁻), or nonviable (Ann-V⁺ PI⁺ or Ann-V⁻ PI⁺).

2.9. Caspase-3 activation analysis

Active caspase-3 consists of 17- and 11-kDa subunits that are derived from a 32-kDa proenzyme (pro-caspase-3) by cleavage at multiple aspartic acid sites (Shi, 2002). The enzymatic activity of caspase-3 was evaluated using a fluorometric assay. This assay is based on the recognition of specific amino acid sequences by caspase-3 and the proteolytic cleavage of MOCAC-DEVDAPK (Dnp)-NH₂ by caspase-3 into the fluorophore methyl-coumarin. After 3–18 h coincubation of moDC with *L. mexicana* promastigotes and/or camptothecin, cells were harvested, washed twice with cold PBS and homogenized in a standard buffer [100 mM Hepes; 10% (w/v) sucrose; 0.1% (w/v) CHAPS; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 mM NaF; 2 μ g/ml aprotinin; 1 μ g/ml pepstatin; and 5 μ g/ml leupeptin]. The amount of total proteins extracted was quantified by Bradford's method and equal amounts (80 μ g/ml) of proteins from the total cell lysate were used in the assay. Protein lysates were transferred to a flat-bottomed microtitre plate and the reaction buffer plus the caspase-3 substrate MOCAC-DEV-DAPK(Dnp)-NH₂ (25 μ M) were added. After 4 h of incubation at 37 °C, the caspase-3 activity was detected by measurement of the free methyl coumarin released by cleavage of the substrate with a luminescence spectrometer (Fluoroskan Ascent FL, Thermo

Labsystems, Helsinki, Finland). Results are expressed as DEVD cleaved as change in fluorescence intensity/h/mg protein.

2.10. Caspase-3 Western blot

Treated moDC were pooled, pelleted, washed once with cold PBS, and pelleted by centrifugation at 13,000 g for 10 s. Subsequently, the cell pellet was resuspended in 40 μ l of RIPA buffer [1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% dodecyl sulfate (SDS) in PBS supplemented with 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 20 μ g of phenylmethylsulphonyl fluoride/ml, 10 μ g of aprotinin/ml, 2 μ g of pepstatin A/ml, and 2 μ g of leupeptin/ml] (all obtained from Sigma, St. Louis, MO, USA) by being vortexed, and left at 4 °C for 20 min. The lysates were then centrifuged at 11,200 g for 10 min at 4 °C, and the supernatant (whole-cell protein extract) was stored at –70 °C until Western blot was performed. Equal amounts of whole-cell protein extracts were added to 5 μ l of 2 \times loading buffer, samples were boiled for 3 min and then resolved by SDS–PAGE in 15% gels at 120 V for 1.5 h at room temperature. Proteins were subsequently transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at room temperature and 20 V for 90 min, rinsed in distilled H₂O, and then blocked with Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) supplemented with 5% low-fat milk for 30 min at room temperature. The membranes were probed overnight with shaking at 4 °C with a polyclonal goat anti-human caspase-3 antibody (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) in TBST-milk. The membranes were washed six times in TBST (10 min each time) and incubated with a goat anti-rabbit IgG (H + L) (1:15,000, Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA). The membranes were then washed again with distilled water and TBST (four washes; 10 min each), and bands were visualized by chemiluminescence detection (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) using Kodak Biomax MR film. Densitometric analysis was performed with the program Image-J, NIH Image version 0.93e.

3. Results

3.1. *Leishmania mexicana* increases moDC viability

We first analyzed the effect of *L. mexicana* promastigotes in the viability of moDC treated with camptothecin. It has previously been shown that *Leishmania* promastigotes prevent apoptosis by inducers of the mitochondrial pathway (Akarid et al., 2004). We elected to induce apoptosis in these studies with camptothecin, inhibitor of DNA topoisomerase I, which is a known inducer of the mitochondrial pathway (Liu et al., 1996). moDC (2×10^6) were coincubated with *L. mexicana* promastigotes at a parasite:cell ratio of 5:1 and 10:1 for 1 h at 28 °C. Afterwards, 5 μ g/ml of camptothecin were added and cells were incubated for 9–72 h at 37 °C. As shown in Fig. 1, camptothecin diminished cell viability to almost 50% starting at 9 h in culture and the majority of cells were death after 72 h in culture. Coincubation of moDC with *L. mexicana* promastigotes at a parasite:cell ratio of 5:1 and 10:1 increased significantly moDC viability in cells treated with camptothecin, and in a lesser extent in cells cultured in media alone.

3.2. Morphological analysis of moDC with Giemsa staining

Human moDC were used to analyse the effects of *L. mexicana* in the apoptosis of one of its host cells. To determine the effect of *L. mexicana* in the apoptosis of moDC, moDC were incubated with *L. mexicana* promastigotes, treated with camptothecin and incubated for 12 h. Their morphologies were examined using Giemsa staining. As shown in Fig. 2A, uninfected moDC show intact nuclei. Treatment with camptothecin caused apoptotic morphological

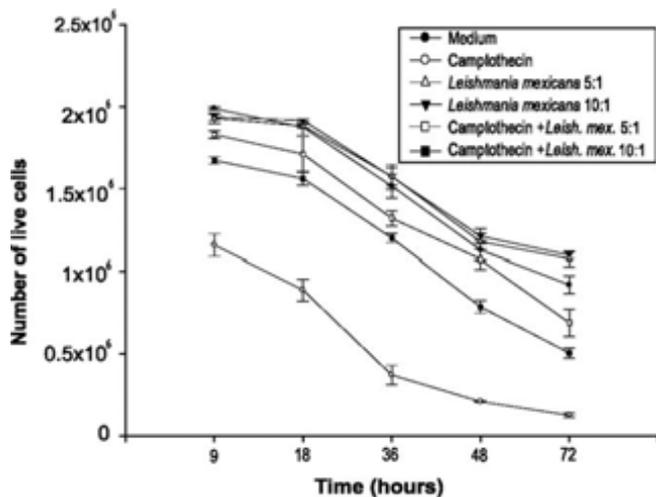


Fig. 1. Time course of viability of camptothecin-treated moDC infected with *L. mexicana*. moDC were infected with promastigotes of *L. mexicana* and treated with 5 μ g/ml of camptothecin. Untreated cells were used as controls. Cells were incubated for different times and viability was assessed by trypan blue exclusion. Data are mean of three independent experiments.

changes such as loss of nuclear structure (Fig. 2B). However, when incubated with *L. mexicana* promastigotes, the apoptotic process was markedly diminished (Fig. 2C).

3.3. TUNEL staining

In addition to the analysis of apoptotic nuclear morphology, the inhibitory effect of *L. mexicana* on moDC apoptosis was investigated by the TUNEL assay. Changes in nuclear organization are caused by the activation of specific nucleases during apoptosis, resulting in DNA fragmentation (Gorczyca et al., 1993). The presence of free DNA ends thus generated is detectable using the poly dT-terminal transferase (TUNEL) assay (Sanders and Wride, 1996). After incubation with camptothecin for 12 h, most of moDC showed an intensive TUNEL staining (Fig. 3B). The majority of moDC that were coincubated with *L. mexicana* promastigotes remained TUNEL negative (Fig. 3C), similar to moDC that were incubated in media alone (Fig. 3A). Taken together, these results show that *L. mexicana* infection inhibits the appearance and progression of multiple stigmata classically associated with apoptosis.

3.4. DNA fragmentation assay

Electrophoresis of extracted low molecular weight from moDC incubated with camptothecin for 12 h showed DNA fragmentation indicative of endonuclease activation. Infection of moDC with *L. mexicana* promastigotes prevented DNA fragmentation after treatment of moDC with camptothecin. The analysis of internucleosomal DNA degradation revealed an inhibition of apoptosis in moDC, as shown by the reduction of low molecular weight chromatin fragments in cells infected with the parasites as compared with moDC incubated with camptothecin alone (Fig. 4). Interestingly, the inhibitory effect of *L. mexicana* on the fragmentation of DNA of moDC was not dose-dependent since it was more evident in cells coincubated with a parasite:cell ratio of 5:1 as compared to 10:1 (Fig. 4).

3.5. *L. mexicana* inhibits extracellular exposure of PS induction by camptothecin

An earlier marker of cell apoptosis is the appearance of PS on the outer membrane, a process that is called membrane flip. PS

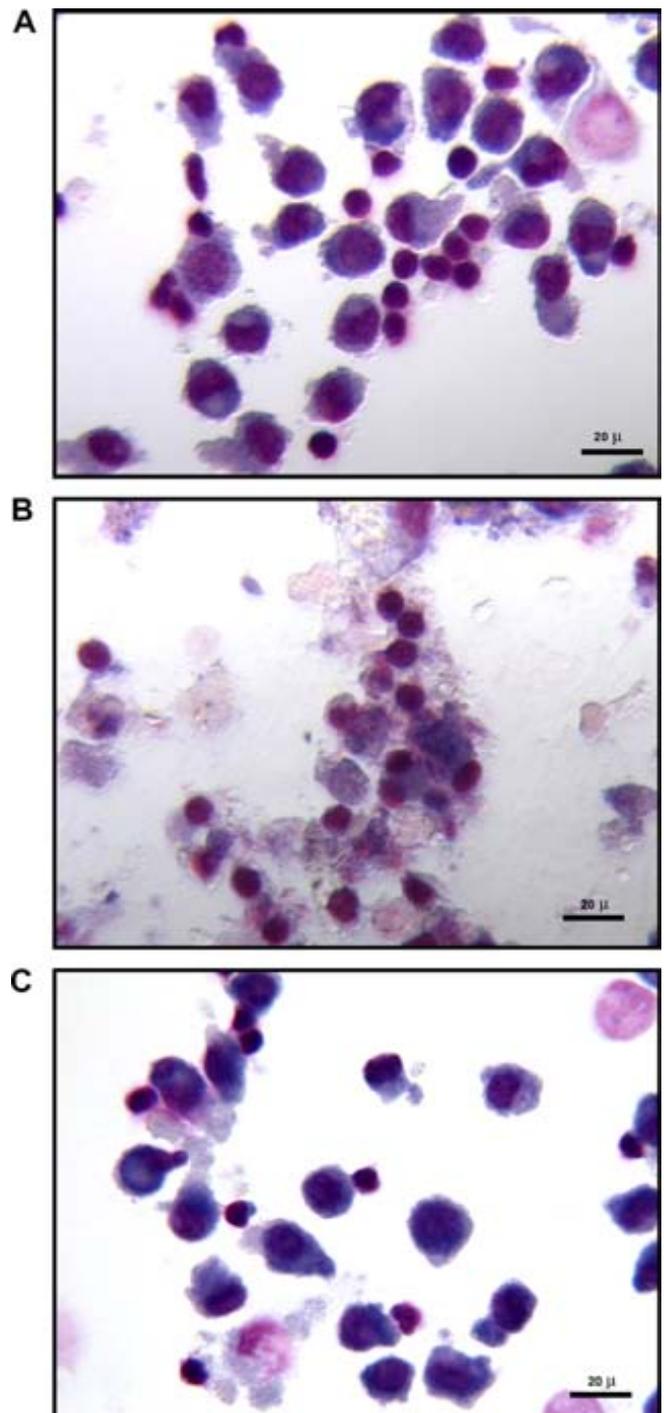


Fig. 2. *Leishmania mexicana* inhibits apoptosis in dendritic cells. Preparations of moDC were stained with Giemsa and apoptotic cells (arrow) were seen morphologically ($\times 400$). The micrographs show moDC treated as follows: (A) moDC treated with medium only for 12 h. (B) moDC treated with camptothecin (5 μ g/ml), (C) moDC co-cultured with promastigotes of *L. mexicana* and treated with camptothecin.

can be detected by staining with Ann-V. *L. mexicana* inhibition of camptothecin-induced apoptosis in moDC was studied by assessing the surface expression of PS using Ann-V in conjunction with PI and FACS analysis. A time course and FACS analysis representative of three individual experiments are depicted in Fig. 5. As shown in Fig. 5A, the inhibitory effect that *L. mexicana* had on the translocation of PS in camptothecin-treated moDC was best observed at 12 h of incubation with the apoptogenic trigger and par-

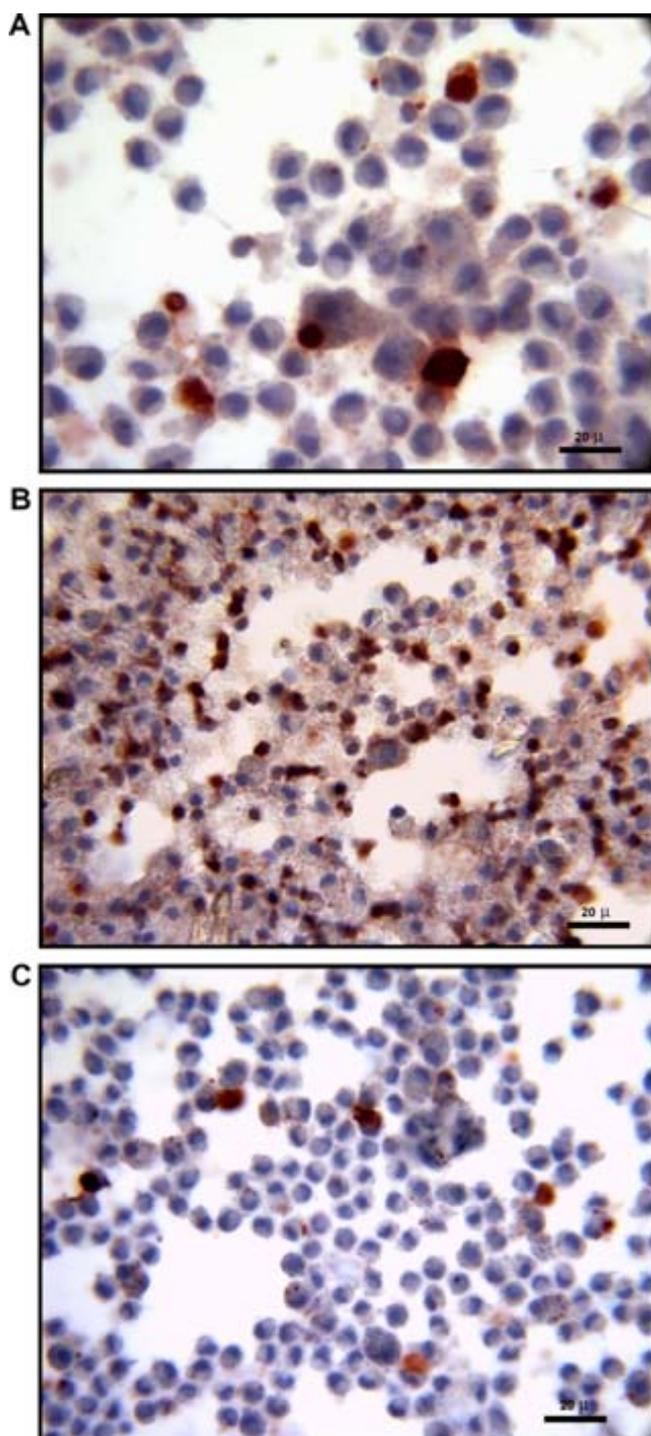


Fig. 3. moDC apoptosis detected by TUNEL assay. moDC were cultured at 1×10^6 /ml in RPMI 1640 medium containing 10% FCS for 12 h. Cells fixed in slides were subjected to TUNEL staining, as described in Section 2. (A) Cells cultured in medium alone remain TUNEL negative. (B) Induction of apoptosis with camptothecin shows intensive TUNEL staining. (C) The majority of moDC incubated in the presence of camptothecin and *L. mexicana* promastigotes show very low TUNEL staining.

asites. At this time point as shown in Fig. 5B 95.1% of uninfected moDC were viable ($\text{Ann-V}^- \text{PI}^-$), while only 0.3% were apoptotic ($\text{Ann-V}^+ \text{PI}^-$). In contrast, as shown in Fig. 5C, only 26.5% of moDC treated with camptothecin, inducer of the mitochondrial pathway, were viable ($\text{Ann-V}^- \text{PI}^-$), and 45.5% were apoptotic ($\text{Ann-V}^+ \text{PI}^-$). Interestingly, only 1.3% of *Leishmania*-infected moDC treated with camptothecin were apoptotic moDC ($\text{Ann-V}^+ \text{PI}^-$) (Fig. 5E). Fig. 5F

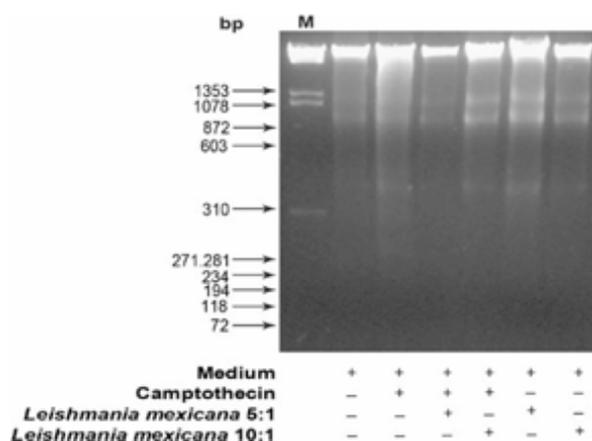


Fig. 4. Inhibition of camptothecin-induced moDC DNA fragmentation by promastigotes of *L. mexicana*. moDC were treated as follows: media alone, camptothecin, *L. mexicana* 1:5 + camptothecin, *L. mexicana* 1:10 + camptothecin, *L. mexicana* 1:5, *L. mexicana* 1:10. DNA from these cells was extracted and analyzed by 2% gel electrophoresis. Molecular weight standard was run in lane 1.

displays the mean percentage of camptothecin-treated and *L. mexicana*-infected moDC undergoing apoptosis ($\text{Ann-V}^+ \text{PI}^-$) from three separate experiments. In comparison with uninfected camptothecin-treated moDC, the infection with *L. mexicana* displayed a decrease in apoptosis similar to that detected in moDC cultured in media alone ($47.6\% \pm 10.7\%$ versus $1.4\% \pm 0.2\%$) (Fig. 5F). Necrotic cells were distinguished from apoptotic by the intranuclear staining of DNA with PI. Ann-V staining revealed low PS expression in moDC after incubation in vitro for 12 h. There was some labeling with PI which probably is an indication of late apoptosis. The coincubation with camptothecin, a potent inducer of apoptosis, resulted in a marked increase in Ann-V binding (Fig. 5C). Coincubation of camptothecin-induced apoptotic moDC with *L. mexicana* resulted in a marked decrease in Ann-V binding and also in PI binding (Fig. 5E).

3.6. *L. mexicana* inhibits proteolytic cleavage of caspase-3

The morphological and cellular changes associated with apoptosis are due to the activation of the caspase cascade, most notably that of the executioner, caspase-3 (Earnshaw et al., 1999; Thornberry and Lazebnik, 1998). We examined whether infection of moDC with *L. mexicana* protected these cells following the induction of apoptosis with camptothecin. We measured the enzymatic activity of caspase-3 directly in cell extracts using the fluorescent substrate MOCac-DEVDAPK(Dnp)-NH₂, giving rise of a fluorescent product after cleavage by the enzyme. Cellular extracts were incubated with the substrate and the release of free methyl coumarin was measured fluorometrically. A strong caspase-3 enzymatic activity was observed in moDC after incubation with camptothecin for 3–18 h (Fig. 6A).

An inhibition of caspase-3 activity was observed in moDC incubated with *L. mexicana* promastigotes and camptothecin for 12–18 h, the effect being more evident at 12 h of incubation. The reduction in the caspase-3 activity at this time point was 80.21% (Fig. 6A).

Surprisingly, when the cells were incubated with parasites and camptothecin for 3, 6 and 9 h, *L. mexicana* did not have an inhibitory effect on the activity of caspase-3. On the contrary, the activity was even higher than the one observed with camptothecin alone (Fig. 6A). In order to confirm the data from the fluorogenic assay, we studied the activation of caspase-3 in an immunoblot assay. As shown in Fig. 6B and D camptothecin treatment induced caspase-

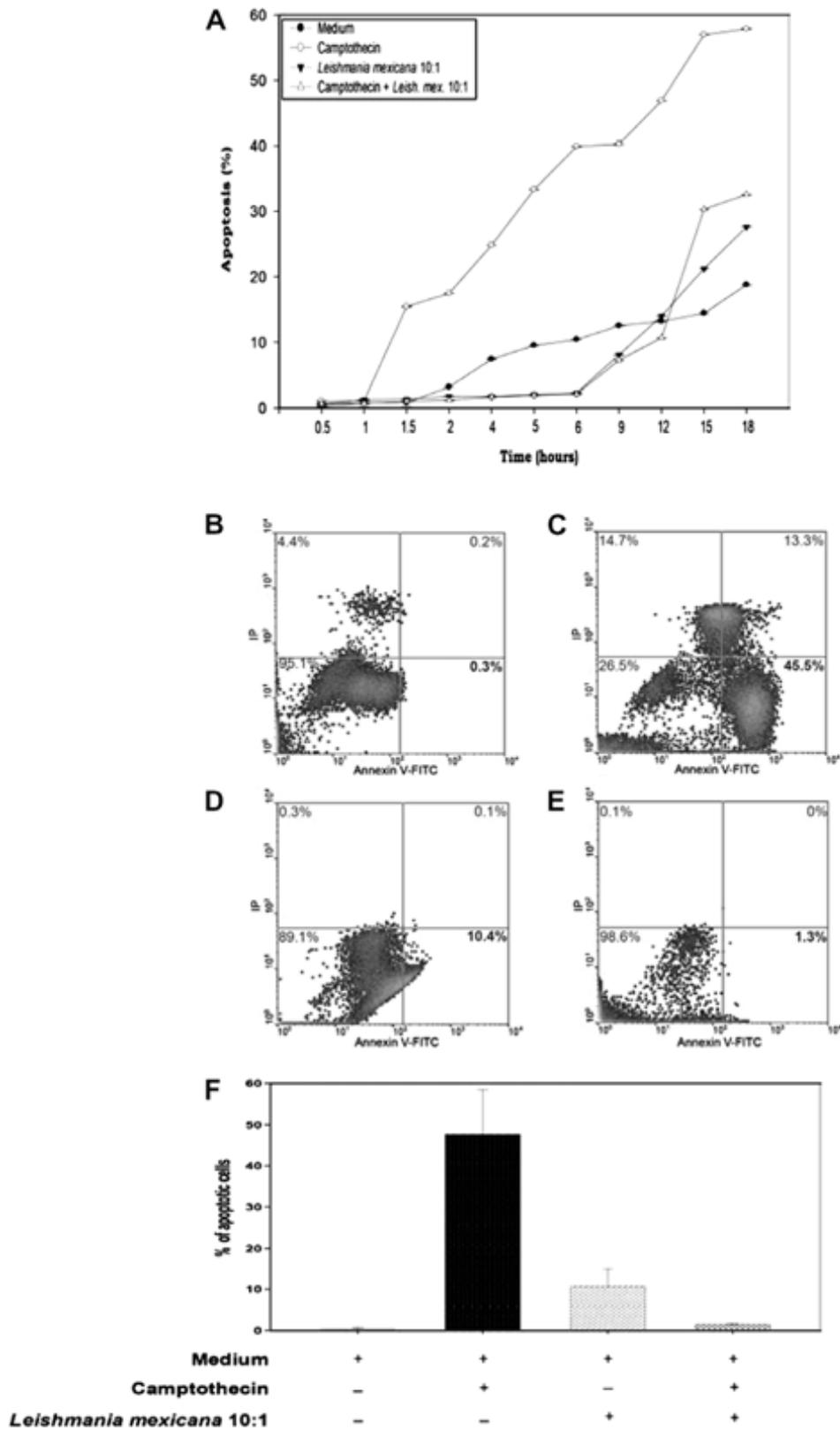


Fig. 5. *Leishmania mexicana* inhibits moDC apoptosis, as measured by annexin-V binding to externalized phosphatidylserine. moDC were infected with *L. mexicana* at a ratio of 10:1 parasite:moDC for 18 h. (A) Time course of PS exposure in camptothecin-treated moDC and infected with *L. mexicana*. (B–E) One FACS analysis representative of three individual experiments. Viable cells (Annexin-V⁻ PI⁻); nonviable, including late apoptotic or necrotic cells (Annexin-V⁺ PI⁺ or Annexin-V⁻ PI⁺); and apoptotic cells (Annexin-V⁺ PI⁻) were detected by the binding to externalized phosphatidylserine in conjunction with PI, a dye excluded from viable cells. (B) 95.1% of uninfected moDC were viable (Annexin-V⁻ PI⁻), while only 0.3% were apoptotic (Annexin-V⁺ PI⁻). (C) 45.5% of moDC cells treated with 5 μg/ml of camptothecin (positive control for apoptosis) were apoptotic (Annexin-V⁺ PI⁻), and 13.3% were nonviable (Annexin-V⁺ PI⁺). (D) 10.4% of moDC infected with *L. mexicana* at a ratio of 10:1 parasites:moDC for 18 h were apoptotic (Annexin-V⁺ PI⁻) and 0.1% of moDC were nonviable (Annexin-V⁺ PI⁺). (E) 1.3% of moDC treated with 5 μg/ml of camptothecin and infected with *L. mexicana* at a ratio of 10:1 parasites:moDC for 18 h were apoptotic (Annexin-V⁺ PI⁻) and 0% of moDC were nonviable (Annexin-V⁺ PI⁺). (F) Mean percentage of camptothecin-treated and *L. mexicana*-infected moDC undergoing apoptosis (Annexin-V⁺ PI⁻) from three separate experiments.

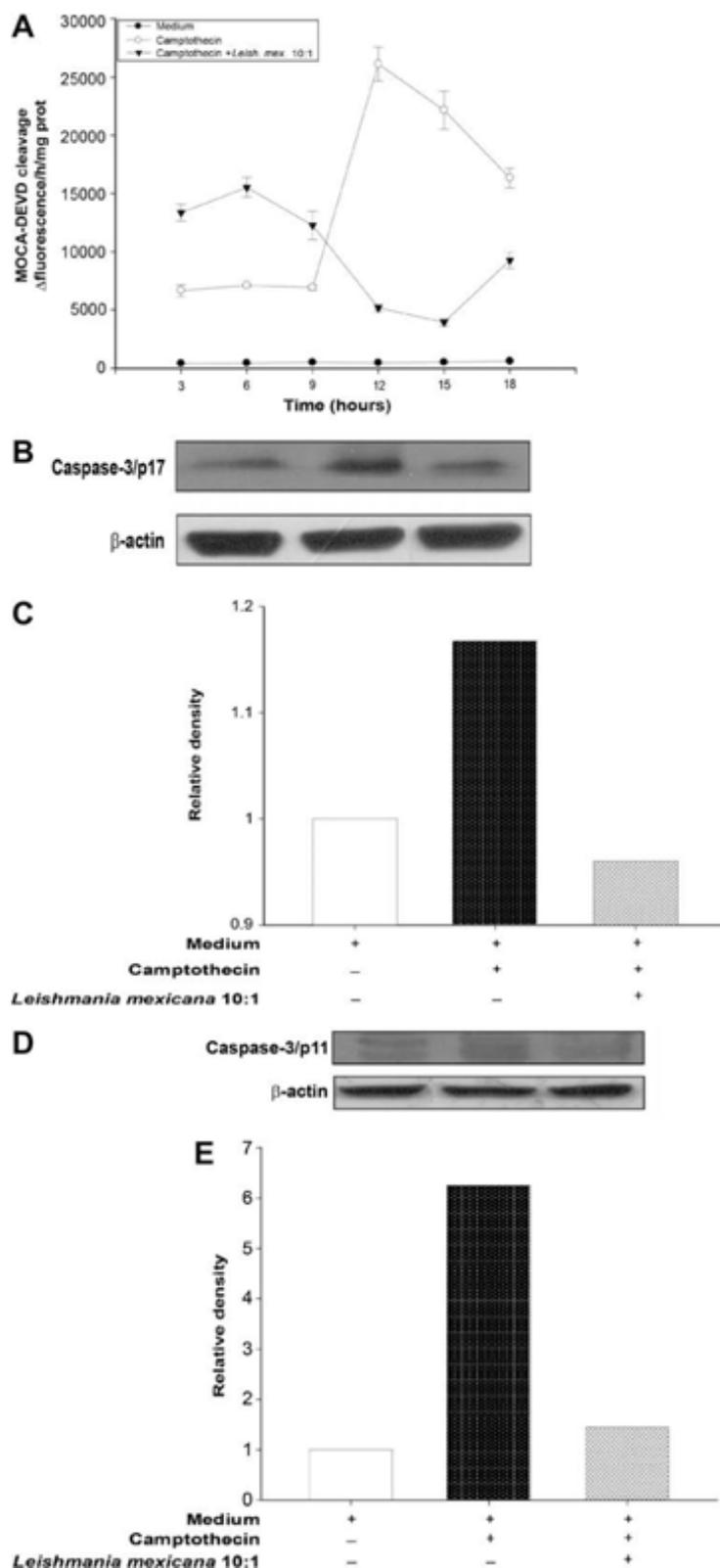


Fig. 6. Effect of *L. mexicana* on caspase-3 activation induced by camptothecin in moDC. moDC were cultured in vitro in culture medium alone, camptothecin alone and in the presence of *L. mexicana* promastigotes at a parasite:ratio of 10:1. (A) Time course of caspase-3 activity measured as DEVD-AMC cleavage. Values are a mean \pm SE of at least six independent experiments. (B) 17-kDa caspase-3 fragmentation measured by immunoblot after 12 h of incubation with *L. mexicana* promastigotes in the presence or absence of camptothecin. (C) Densitometric analysis of the 17-kDa band (caspase-3) and β -actin (loading control) of the immunoblot. (D) 11-kDa caspase-3 fragmentation measured by immunoblot after 12 h of incubation with *L. mexicana* promastigotes in the presence or absence of camptothecin. (E) Densitometric analysis of the 11-kDa band (caspase-3) and β -actin (loading control) of the immunoblot. Densitometric analysis was performed with the program Image-J, NIH Image version 0.93e.

3 processing with a decrease of the inactive form (32 kDa) and an appearance of the 17 and 11 kDa-active fragments in uninfected moDC. By contrast, *L. mexicana*-infected cells treated under identical conditions generated the active fragments in a lesser extent as determined by the densitometric analysis (Fig. 6C and E).

4. Discussion

The major observation reported in the present study is that *L. mexicana* inhibited apoptosis in moDC. Coincubation of moDC with *L. mexicana* promastigotes in vitro led to an inhibition of apoptosis induced by camptothecin, as assessed by morphological analysis of moDC, detection of the apoptosis-associated DNA fragmentation, as well as Ann-V binding. We showed that the *Leishmania*-mediated delay of DC apoptosis is associated with a marked decrease in caspase-3 activity.

Parasites have evolved a plethora of strategies to ensure their survival. The inhibition of apoptosis appears to be a common theme in the biology of obligate intracellular bacteria, protozoa and viruses. Their complete dependence on the metabolic potential of the host cell for propagation is likely to have contributed to evolution of elaborate strategies to block cell suicide as a way to ensure the continued supply of nutrients.

In the studies described here, we confirm previous observations that had shown that infection with the promastigote form of *Leishmania* effectively inhibits apoptosis. Although the contribution of apoptosis in the immune response against *Leishmania* has not been analyzed, it could represent a novel immune evasion mechanism of the parasite. Various reports have demonstrated that *Leishmania* infected M ϕ and PMN resist diverse apoptotic stimuli (Aga et al., 2002; Akarid et al., 2004; Lisi et al., 2005; Moore and Matlashewski, 1994). The observed antiapoptotic effect was found to be associated with a significant reduction of caspase-3 activity. This raises the likelihood that *Leishmania* employ a common mechanism to block apoptosis of their infected cell. We extend these observations and show that promastigotes of *L. mexicana* induce resistance to apoptosis in moDC. Dendritic cells are important host cells for *Leishmania* and the effect of the parasite in the apoptosis of these cells has not been investigated. We commenced analyzing the effect of the parasite on the viability of moDC treated with the apoptosis inducer, camptothecin. We followed the effect of the parasite during a time course from 9 to 72 h. Camptothecin diminished the viability of the cells to almost 50% starting at 9 h of infection with the parasites. Interestingly, the effect of the parasites was more evident at a cell:parasite ratio of 1:5 than 1:10 which could suggest the participation of a molecule, whose effect is optimal at a lower concentration. It has been reported that *Leishmania* inhibits the host-cell apoptotic machinery through the major surface component of the parasite, LPG (Moore and Matlashewski, 1994). The finding that *L. mexicana* increased the viability of DC treated with camptothecin, led us to analyze the effect of the parasite in some molecular features of apoptosis such as nuclear morphology and DNA fragmentation. We also explored the effect of *L. mexicana* in the translocation of PS, which is one of the first events to occur during the apoptotic process. As expected, camptothecin-induced a strong translocation of PS which was inhibited by *L. mexicana* promastigotes. The induction of apoptosis by camptothecin requires a mitochondria-dependent step, controlled by members of the Bcl-2/Bax protein family, leading to mitochondrial outer membrane permeabilization and the release in the cytosol of mitochondrial intermembrane space proteins such as cytochrome c, which will ultimately result in the sequential activation of caspases (Green and Reed, 1998; Martinou and Green, 2001; Wei et al., 2001). For this reason we explored the effect of *L. mexicana* in the activation of caspase-3. We show that *L. mexicana* affects the survival of moDC via a mechanism involving the inhibition of cas-

pase-3 activation. In fact, both caspase-3 activity and protein level were significantly reduced in moDC infected with *L. mexicana* promastigotes. Surprisingly, *L. mexicana* did not have an inhibitory effect in the activation of caspase-3 after 3, 6 and 9 h of incubation and the activity was even higher than the observed with camptothecin alone. The inhibitory effect of *Leishmania* on the different apoptotic features tested was best observed after 12 h of incubation which suggests that the action of the parasite needs this time period to be effective. The elucidation of the mechanism that could be operating in the inhibition of apoptosis of DC by *Leishmania* will certainly give an explanation about the differences in the effect among distinct time points.

In this study, we described the inhibition of induced rather than spontaneous apoptosis of moDC by *Leishmania*. It has been shown that some intracellular organisms confer resistance to apoptosis to their host cell when apoptosis is induced by a wide variety of agents (Gao and Abu Kwaik, 2000; Heussler et al., 2001). Although the importance of this phenomenon is mostly speculative, the fact that a wide range of organisms confer this property to their mammalian host cell suggests some evolutionary importance. Elucidation of the mechanism by which intracellular organisms achieve this phenomenon is the subject of several recent reports (Maiti et al., 2001; Payne et al., 2003; Yilmaz et al., 2004). The differences between the spontaneous and induced apoptotic processes suggest that the various infectious agents may use more than one mechanism to achieve the extended survival of their host cell.

The way by which *L. mexicana* exerts this antiapoptotic effect is not known. For M ϕ it has been recently described that the activation of the PI3K/Akt is an important pathway that is engaged by *Leishmania* parasites to ensure the prolonged survival of their host cell (Ruhland et al., 2007). Survival of the parasites, therefore, depends at least in part on their ability to switch off the NF- κ B machinery which will block the production of important proinflammatory and microbicidal molecules. Although DC produce microbicidal molecules, it has not been shown their capacity in the elimination of *Leishmania*. These cells act as a safe niche for the parasite and apoptosis inhibition can facilitate the spread of infection by increasing the number of infected cells. Further research is needed to clarify the impact of apoptosis in parasite survival and multiplication. Also, it should be established the mechanisms involved in the inhibition of apoptosis in DC and if these mechanisms are similar to the ones described for M ϕ .

Acknowledgments

We thank Rocely Cervantes, José Delgado Domínguez, Alma Escalona, Marco Gudiño, Adriana Ruiz for technical assistance and Lucía Alvarez Trejo for secretarial support.

This work was supported by Grants IN220207 from DGAPA-UNAM and 45048-M from CONAcY T.L. Valdés-Reyes was recipient of a CONAcYT fellowship and is indebted to Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Aga, E., Katschinski, D.M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Muller, K., Solbach, W., Laskay, T., 2002. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of Immunology* 169, 898–905.
- Akarid, K., Arnoult, D., Micic-Polianski, J., Sif, J., Estaquier, J., Ameisen, J.C., 2004. *Leishmania major* - mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Leukocyte Biology* 76, 95–103.
- Baumann, S., Krueger, A., Kirchhoff, S., Krammer, P.H., 2002. Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Current Molecular Medicine* 2, 257–272.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X., 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell Development Biology* 15, 269–290.

- Daniel, N.N., Korsmeyer, S.J., 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205–219.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H., 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 68, 383–424.
- Eldadah, B.A., Yakovlev, A.G., Faden, A.I., 1996. A new approach for the electrophoretic detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research* 24, 4092–4093.
- Gao, L., Abu Kwaik, Y., 2000. Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. *Microbes and Infection* 2, 1705–1719.
- Ghosh, S., 1999. Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF- κ B. *Immunology Research* 19, 183–189.
- Gorczyca, W., Gong, J., Darzynkiewicz, Z., 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Research* 53, 1945–1951.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309–1312.
- Hacker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research* 301, 5–17.
- Heussler, V.T., Kuenzi, P., Rottenberg, S., 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International Journal of Parasitology* 31, 1166–1176.
- Homburg, C.H., de Haas, M., von dem Borne, A.E., Verhoeven, A.J., Reutelingsperger, C.P., Roos, D., 1995. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 85, 532–540.
- Kaufmann, S.H., Hengartner, M.O., 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology* 11, 526–534.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., van Oers, M.H., 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415–1420.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J., 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491–501.
- Lisi, S., Sisto, M., Acquafredda, A., Spinelli, R., Schiavone, M., Mitolo, V., Brandonisio, O., Panaro, M., 2005. Infection with *Leishmania infantum* inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 52, 211–217.
- Liu, L.F., Duann, P., Lin, C.T., D'Arpa, P., Wu, J., 1996. Mechanism of action of camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 803, 44–49.
- Maiti, D., Bhattacharyya, A., Basu, J., 2001. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylating Bad through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Journal of Biological Chemistry* 276, 329–333.
- Martinou, J.C., Green, D.R., 2001. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 63–67.
- Moore, K.J., Matlashewski, G., 1994. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *Journal of Immunology* 152, 2930–2937.
- Morris, E.J., Geller, H.M., 1996. Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *Journal of Cell Biology* 134, 757–770.
- Nagata, S., 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355–365.
- Payne, T.M., Molestina, R.E., Sinai, A.P., 2003. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF- κ B function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *Journal of Cell Science* 116, 4345–4358.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.M., Schuler, G., 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *The Journal of Experimental Medicine* 180, 83–93.
- Ruhland, A., Leal, N., Kima, P.E., 2007. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cellular Microbiology* 9, 84–96.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine* 179, 1109–1118.
- Sanders, E.J., Wride, M.A., 1996. Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique. *Histochemical Journal* 28, 275–281.
- Shi, Y., 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* 9, 459–470.
- Solbach, W., Laskay, T., 2000. The host response to *Leishmania* infection. *Advances in Immunology* 74, 275–317.
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312–1316.
- Vaux, D.L., Korsmeyer, S.J., 1999. Cell death in development. *Cell* 96, 245–254.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727–730.
- Woelbing, F., Kostka, S.L., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., Waisman, A., Nigg, A.P., Knop, J., Udey, M.C., von Stebut, E., 2006. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc gamma receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 177–188.
- Yilmaz, O., Jungas, T., Verbeke, P., Ojcius, D.M., 2004. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* 72, 3743–3751.