



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“ANÁLISIS DEL EFECTO QUE EJERCE
LIPOFOSFOGLICANO DE *Leishmania mexicana* SOBRE
PROTEÍNA CINASA C α EN MACRÓFAGOS
MURINOS Y SU CORRELACIÓN CON LA
SUSCEPTIBILIDAD A LA LEISHMANIASIS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

JOSÉ SOTERO DELGADO DOMÍNGUEZ

TUTORA PRINCIPAL: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER

COMITÉ TUTOR: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ

DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

MÉXICO, D. F.

MARZO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

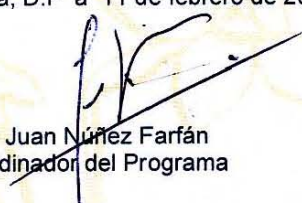
Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de mayo de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **DELGADO DOMINGUEZ JOSE SOTERO** con número de cuenta **96817119** con la tesis titulada: **"ANÁLISIS DEL EFECTO QUE EJERCE LIPOFOSFOGLICANO DE Leishmania mexicana SOBRE PROTEÍNA CINASA C alfa EN MACROFAGOS MURINOS Y SU CORRELACIÓN CON LA SUSCEPTIBILIDAD A LA LEISHMANIASIS"**.

Realizada bajo la dirección del **DRA. INGBORG DOROTEA BECKER FAUSER**:

Presidente:	DRA. MARTHA ROBLES FLORES
Vocal:	DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ
Vocal:	DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Vocal:	DR. CESAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA
Secretario:	DRA. DRA. INGBORG DOROTEA BECKER FAUSER
Suplente:	DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
Suplente:	DR. ROBERTO JOSE RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F a 11 de febrero de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México**.
- Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca doctoral que me fue otorgada.
- Este trabajo fue apoyado por los proyectos: CONACyT 45052-M, CONACyT: 102155, DGAPA: IN221806-3 y DGAPA: IN220109.
- Agradezco a mi Comité Tutorial: Dra. Ingeborg Becker Fauser, Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez y Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández, por su tiempo, aportaciones y ayuda brindada durante la realización de este trabajo.
- Agradezco a los miembros del jurado por la revisión de esta tesis: Dra. Martha Robles Flores, Dra. Gladis del Carmen Fragosó González, Dr. Cesar Raúl González Bonilla y Dr. Edgar Zenteno Galindo.
- Este Trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental en colaboración con el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Becker con respeto y admiración por su apoyo y esfuerzo en mi formación académica.
- A la Dra. Martha Robles por su invaluable colaboración en la realización de esta tesis doctoral.
- A las Dras. Magdalena Aguirre y Laila Gutiérrez por el apoyo que me brindaron durante la realización de esta tesis.
- A Norma, Miriam, Cristina, Adriana, Rocely, Alma, Agni, Augusto, Marco y Sra. Susana por su ayuda en el laboratorio de Inmunoparasitología.
- A Héctor y Cristina por su ayuda en el laboratorio del Departamento de Bioquímica.
- A Ricardo y Daniel por su apoyo en el bioterio.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN -----	I
ABSTRACT-----	II
1. INTRODUCCIÓN-----	1
1.1 Formas clínicas de Leishmaniasis-----	2
1.2 Ciclo biológico-----	6
1.3 Moléculas en la superficie de <i>Leishmania</i> -----	8
1.3.1 Glicoproteína Gp63-----	8
1.3.2 Lipofosfoglicano (LPG)-----	9
1.4 Respuesta inmune hacia <i>Leishmania</i> -----	11
1.4.1 Respuesta inmune adaptativa-----	12
1.4.2 Respuesta inmune innata -----	13
1.5 Células Dendríticas -----	14
1.6 El macrófago-----	14
1.6.1 Funciones-----	14
1.6.2 Mecanismos efectores del macrófago-----	15
1.7 Proteína Cinasa C (PKC)-----	17
1.7.1 Papel de PKC en la leishmaniasis-----	21
2. JUSTIFICACIÓN-----	25
3. HIPÓTESIS-----	26
4. OBJETIVOS-----	26
5 MATERIAL Y MÉTODOS-----	27
5.1 Obtención de Lipofosfoglicano (LPG) de <i>Leishmania mexicana</i> -----	27
5.2 Obtención de macrófagos de médula ósea de ratones-----	28
5.3 Obtención de macrófagos peritoneales de ratones-----	28
5.4 Ensayo de expresión de proteína (PKC α)-----	28
5.5 Purificación parcial de PKC-----	30
5.6 Complejos inmunes de PKC α -----	30
5.7 Ensayos de quimioluminiscencia-----	31
5.8 Sobrevida de parásitos intracelulares-----	32

5.9	Prueba estadística-----	32
6	RESULTADOS -----	33
6.1	Purificación de LPG-----	33
6.2	Obtención de macrófagos de médula ósea-----	35
6.3	Expresión de la proteína (PKC α)-----	36
6.4	Actividad enzimática de PKC α -----	39
6.5	Efecto de LPG y de <i>Leishmania mexicana</i> sobre el estallido oxidativo en macrófagos peritoneales de dos cepas de ratón-----	42
6.6	Correlación entre el efecto del LPG sobre la fosforilación específica por PKC α y el estallido oxidativo en macrófagos de ratones BALB/c y C57BL/6-----	45
6.7	Análisis comparativo de la sobrevivencia intracelular de <i>Leishmania mexicana</i> con el grado de inhibición del estallido oxidativo en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57BL/6-----	46
7	DISCUSIÓN-----	48
8	CONCLUSIONES -----	54
9	REFERENCIAS-----	56
10	ANEXOS-----	63

DEDICATORIA

A DIOS porque meda todo lo que tengo.

A Fernanda y Mariana porque son el motor de mi vida.

A Lucy por recorrer conmigo todo este camino.

A Mis Padres por su infinito amor.

RESUMEN

Leishmania es un parásito protozoario que infecta a los macrófagos y puede sobrevivir en el macrófago por la inhibición del estallido oxidativo ejercido por el lipofosfoglicano (LPG) del parásito. La PKC α es la isoforma requerida por el macrófago para desencadenar el estallido oxidativo, sin embargo, no se sabe si la diferente susceptibilidad a *Leishmania mexicana* en ratones BALB/ c y C57BL/6 podría estar relacionada con PKC α . En este trabajo se analizó el efecto de promastigotes de *Leishmania mexicana* y LPG del parásito sobre la expresión y actividad enzimática de PKC α , en los macrófagos de ambas cepas de ratones. Nuestros datos muestran que la expresión de la PKC α no fue alterada por LPG, ni por el promastigotes de *Leishmania mexicana*. Sin embargo, LPG ejerce efectos opuestos sobre la actividad PKC α en los macrófagos de ambas cepas de ratón: en macrófagos de ratones susceptibles LPG inhibe la actividad de PKC α , mientras que en los macrófagos de ratones resistentes, la actividad enzimática de PKC α se incrementó 2.8 veces. Además, LPG ejerció un efecto de inhibición del estallido oxidativo sólo en macrófagos de ratones susceptibles BALB/c y el grado de inhibición se pudo correlacionar con la sobrevivencia del parásito. Los promastigotes de *Leishmania mexicana*, también inhiben la actividad enzimática de PKC α y el estallido oxidativo en los macrófagos de ratones BALB/c, mientras que en los macrófagos de ratones C57BL/6 se incrementó la actividad enzimática de PKC α y la inhibición del estallido oxidativo que se observó no fue tan severa como en los macrófagos de ratones BALB/c. Nuestros datos indican que el control de la PKC α en el estallido oxidativo por LPG de *Leishmania mexicana*, se relaciona con el éxito que tiene el parásito en infectar a los macrófagos murinos.

ABSTRACT

Leishmania are protozoan parasites that infect macrophages and their survival is partially achieved through inhibition of the cellular oxidative burst by parasite lipophosphoglycan (LPG). PKC α is the predominant PKC isoenzyme required for macrophage oxidative burst, yet it is not known if different susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to *Leishmania mexicana* could be related to PKC α . We analyzed the effect of *Leishmania mexicana* promastigotes and parasite LPG on expression of PKC α and on its activity in macrophages of both mouse strains. Our data show that expression of the isoenzyme was not altered by LPG nor by *Leishmania mexicana* promastigotes. Yet LPG exerted opposing effects on PKC α activity of macrophages between both strains: in susceptible BALB/c cells it inhibited PKC α activity, whereas in the more resistant strain it augmented enzymatic activity 2.8 times. Additionally, LPG inhibited oxidative burst only in susceptible BALB/c macrophages and the degree of inhibition correlated with parasite survival. Promastigotes also inhibited PKC α activity and oxidative burst in macrophages of BALB/c mice, whereas in C57BL/6 they enhanced PKC α activity and oxidative burst inhibition was less severe. Our data indicate that control of PKC α -induced oxidative burst by *Leishmania mexicana* LPG relates with its success to infect murine macrophages.

1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad producida por parásitos protozoarios del género *Leishmania*. El parásito es transmitido por la picadura de moscos hematófagos pilosos del género *Phlebotomus* en el viejo Mundo (sur de Europa, Asia y África) y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (América Latina) [1, 2].

La leishmaniasis es una parasitosis de amplia distribución geográfica y en los últimos años se han podido identificar aproximadamente 30 especies de *Leishmania* que pueden infectar a mamíferos y de éstas, 20 pueden generar leishmaniasis humana [1, 3].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que la leishmaniasis es endémica en 88 países del mundo 22 pertenecen al Continente Americano [1]. Se estima que a nivel mundial ocurren 2 millones de nuevos casos anualmente de los cuales 1.5 millones corresponden a la forma cutánea y 500 000 a la forma visceral. Adicionalmente, se estima una prevalencia anual de 12 millones de personas en todo el mundo.

En la República Mexicana, se han registrado casos en la zona del Pacífico como Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán Jalisco y Nayarit, al norte del país en Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, del lado del Golfo Veracruz, Tabasco, Campeche y Quintana Roo, la península de Yucatán y Chiapas al sureste, además San Luis Potosí, Puebla y Morelos [4]. El primer caso de leishmaniasis fue reportado en 1912 en el estado de Yucatán. De 1946 a 1951 se reportaron en promedio 35 casos anualmente en todo el país y de 1987 a 1997 se han registrado un promedio de 800 casos anuales [5]. De 2000 a 2006 se han registrado un promedio de 600 casos nuevos por año [6].

1.1 Formas Clínicas de leishmaniasis

A) Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)

Se caracteriza por un nódulo único que tiende a ulcerarse. La ulceración es generalmente redonda, de bordes duros, fondo limpio e indoloro. Puede curar espontáneamente en un periodo de seis meses a dos años; sin embargo, en la oreja la infección puede ser crónica, durar años y puede llevar a la mutilación del pabellón auricular. La hipersensibilidad se desarrolla en forma temprana y los pacientes son positivos a la intradermoreacción con *Leishmania* (prueba de Montenegro). Los linfocitos del huésped tienen la capacidad de responder *in vitro* a este antígeno, con la producción de interferón gamma (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2) y en las biopsias habitualmente se encuentran pocos parásitos en el interior del macrófago. En México esta forma clínica se conoce como úlcera de los chicleros, es causada por *Leishmania mexicana* [2, 4, 5] (Figura 1).



Figura 1. Lesión ulcerosa típica de leishmaniasis cutánea localizada

B) Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)

Esta forma se caracteriza por iniciar con un nódulo que no se ulcera, la infección se disemina por vía linfática, dando múltiples nódulos en la cara, extremidades inferiores y superiores, en el tórax y espalda, con excepción del cuero cabelludo, palmas de las manos y plantas de los pies. Esta enfermedad es de difícil tratamiento y generalmente es de desenlace fatal. La respuesta inmune celular se encuentra inhibida mientras que la respuesta humoral está aumentada sin embargo, no es protectora. En estos pacientes la intradermoreacción es negativa. Esta forma clínica tiene una respuesta de tipo Th2, es decir la producción de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) están elevadas. En el análisis histopatológico se pueden observar abundantes parásitos dentro de macrófagos vacuolados. En México es causada por *Leishmania mexicana* [2, 5] y se han registrado casos en los estados de Tabasco, Veracruz y Coahuila (Figura 2).



Figura 2. Lesiones nodulares en leishmaniasis cutánea diseminada.

C) Leishmaniasis Mucocutánea o Espundia (LMC)

Esta forma clínica presenta lesiones muy destructivas de mucosa nasal y orofaríngea, es de difícil tratamiento y puede producir la muerte por inanición y obstrucción de las vías respiratorias. Puede ser ocasionada por *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* y *Leishmania panamensis* [3, 4] (Figura 3).



Figura 3. Lesiones de la mucosa oral típica en leishmaniasis mucocutánea o espundia.

D) Leishmaniasis Cutánea Esporotricóide o Cutánea Predifusa (LPD)

Esta forma clínica se manifiesta con pequeños nódulos subcutáneos subsecuentes que se diseminan por vía linfática y presenta similitud en la manifestación clínica con las lesiones ocasionadas por *Sporothrix shenkii* [7]. La intradermoreacción es negativa y la presencia de parásitos en las biopsias es escasa. Se han reportado casos en el estado de Tabasco (Figura 4).



Figura 4. Lesiones nodulares continuas en leishmaniasis esporotricoides.

E) Leishmaniasis visceral o Kala azar (LV)

Esta forma clínica de leishmaniasis es causada por *Leishmania donovani* y *Leishmania donovani chagasi* en el Nuevo Mundo. Tiene un periodo de incubación de dos meses a un año y afecta principalmente bazo, hígado, mucosas del intestino, médula ósea y otros tejidos linfáticos. Es una enfermedad frecuente en niños, se caracteriza por el oscurecimiento en la piel, particularmente de cara, abdomen, pies y manos es común en la India (Kala azar significa enfermedad negra) [3, 5] (Figura 5).



Figura 5. Hepatoesplenomegalia en leishmaniasis visceral.

1.2 Ciclo biológico

La infección por *Leishmania* inicia cuando un mosquito infectado con el promastigote. El promastigote, que es la fase móvil, mide de 15 a 20 micras de largo por 1.5 a 4 micras de ancho, presenta un núcleo central, flagelo anterior y vive extracelularmente en el tracto digestivo del insecto. El insecto pica al huésped sano e inyecta los promastigotes, los cuales son fagocitados por los macrófagos de la piel. En el interior del macrófago los promastigotes permanecen en el fagolisosoma y con las condiciones ácidas se transforman en amastigotes (forma oval de aproximadamente 5 micras de diámetro, con un núcleo excéntrico, un cinetoplasto y no posee flagelo). Los amastigotes se multiplican por fisión binaria, llevando a la lisis a la célula hospedera y los parásitos son liberados. Estos invaden a otras células fagocíticas donde vuelven a proliferar. Pueden circular por sangre o líquido tisular hasta que nuevamente son ingeridos por el mosquito y los amastigotes se transforman en promastigotes los cuales se multiplican por fisión binaria en el tracto digestivo del mosquito. Los promastigotes maduros migran a la probóscide y al picar el mosquito, éste regurgita al parásito, infectando así a otras células del sistema fagocítico mononuclear, cerrándose el ciclo de vida [8, 9] (Figura 6).

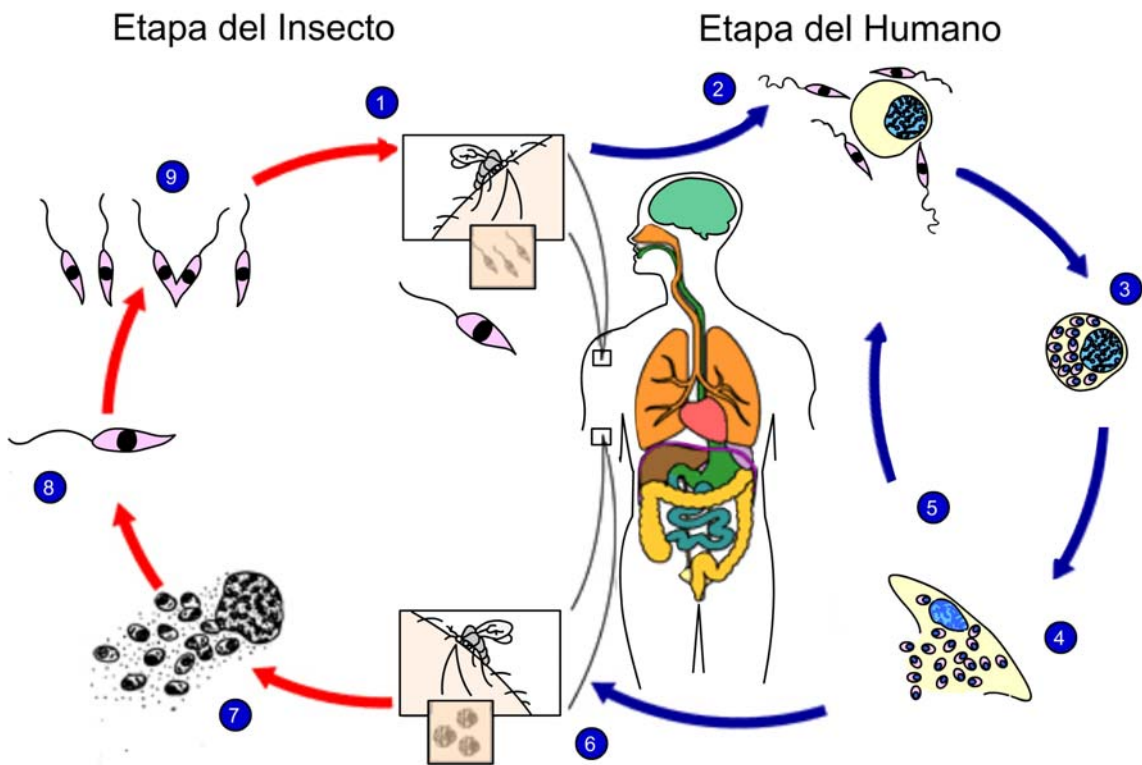


Figura 6. (1) inoculación de promastigote por picadura, (2) fagocitosis del promastigote, (3) diferenciación del promastigote a la fase de amastigote, multiplicación de amastigotes, (4) lisis del macrófago y liberación de amastigotes, (5) fagocitosis de amastigotes liberados, (6) ingestión de amastigotes por el vector, (7-9) desarrollo del promastigote dentro del vector.

Tomado de: <http://www.scielo.org.pe/img/revistas/dp/v14n2/a02fig04g.jpg>

1.3 Moléculas en la superficie de *Leishmania*

La sobrevivencia del amastigote en el fagolisosoma del macrófago depende de los mecanismos de protección que el parásito posee. Existe evidencia de que esta protección está basada en dos moléculas que se encuentran en la pared extracelular del parásito que son una glicoproteína de 63 kDa (gp63) y los lipofosfoglicanos (LPG) [10, 11] .

1.3.1 Glicoproteína gp63

Una de las moléculas importantes que se encuentra en la superficie de *Leishmania* en los dos estadios del ciclo de vida del parásito es la glicoproteína de 63 kDa (gp63). Es una proteína anfifílica de superficie con aproximadamente 500,000 copias por promastigote, constituyendo así el 1% del total de las proteínas presentes del parásito [12, 13].

Función de gp63

A) En la fagocitosis

La gp63 es una metaloenzima dependiente de zinc que tiene una actividad proteolítica a un pH óptimo entre 4 y 5 [14]. Se ha demostrado que esta glicoproteína tiene residuos N-acetilglucosamina, manosa y galactosamina que juegan un papel importante en la interacción parásito-macrófago, debido a que son reconocidos por los receptores manosa-fucosa y con los receptores Mac-1 (CR3) del macrófago [11, 15, 16].

B) Sobrevida intracelular

También se ha demostrado que la actividad proteolítica de la gp63 se ve aumentada en el interior del fagolisosoma, protegiendo al amastigote de la degradación intralisosomal ejercida por enzimas lisosomales, lo cual favorece a la sobrevivencia intracelular del parásito [14].

1.3.2 Lipofosfoglicano (LPG)

El LPG es sintetizado por todas las especies de *Leishmania*. Es el mayor glicoconjugado presente en la superficie del promastigote incluyendo el flagelo. Este glucolípido está formado por cuatro dominios principales:

I) Región de anclaje 1-O-alkil-2-lisofosfatidilinositol.

II) Región central de fosfosacáridos constituida por glucosamina desacetilada, dos manosas, galactosa-6-fosfato, galactopiranososa y galactofuranosa.

III) Región de disacáridos fosforilados, esta región esta constituida por múltiples unidades repetidas de $\text{PO}_4^- \text{6gal}(\beta 1,4)\text{man}(\alpha 1)$.

IV) Región de oligosacáridos, esta región es el casquete terminal de la molécula que puede estar constituido por galactosa o furanosa. [11, 17] Figuras 7 y 8.

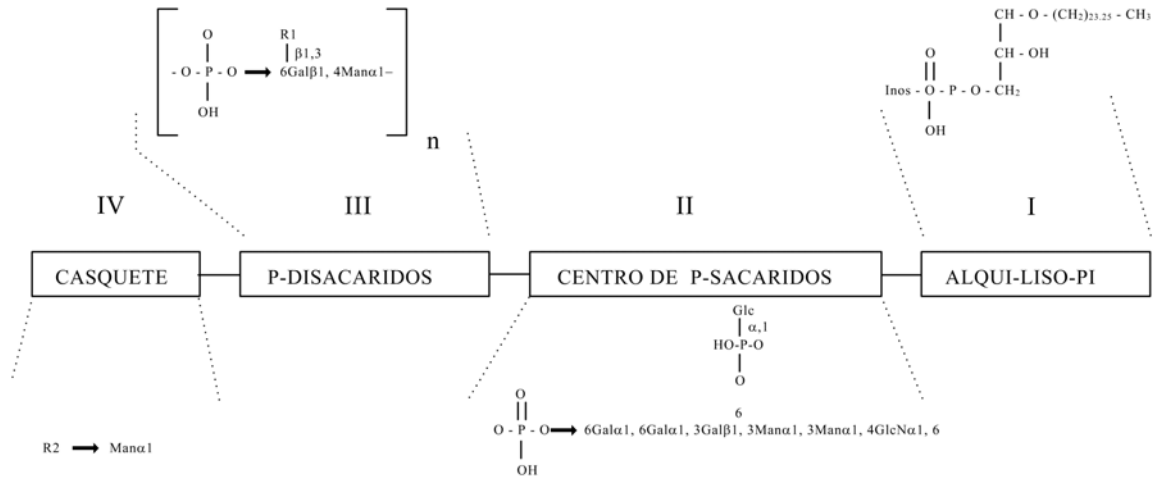


Figura 7 Estructura general de el LPG de *Leishmania*
Tomado de Turco & Descoteaux, 1992.

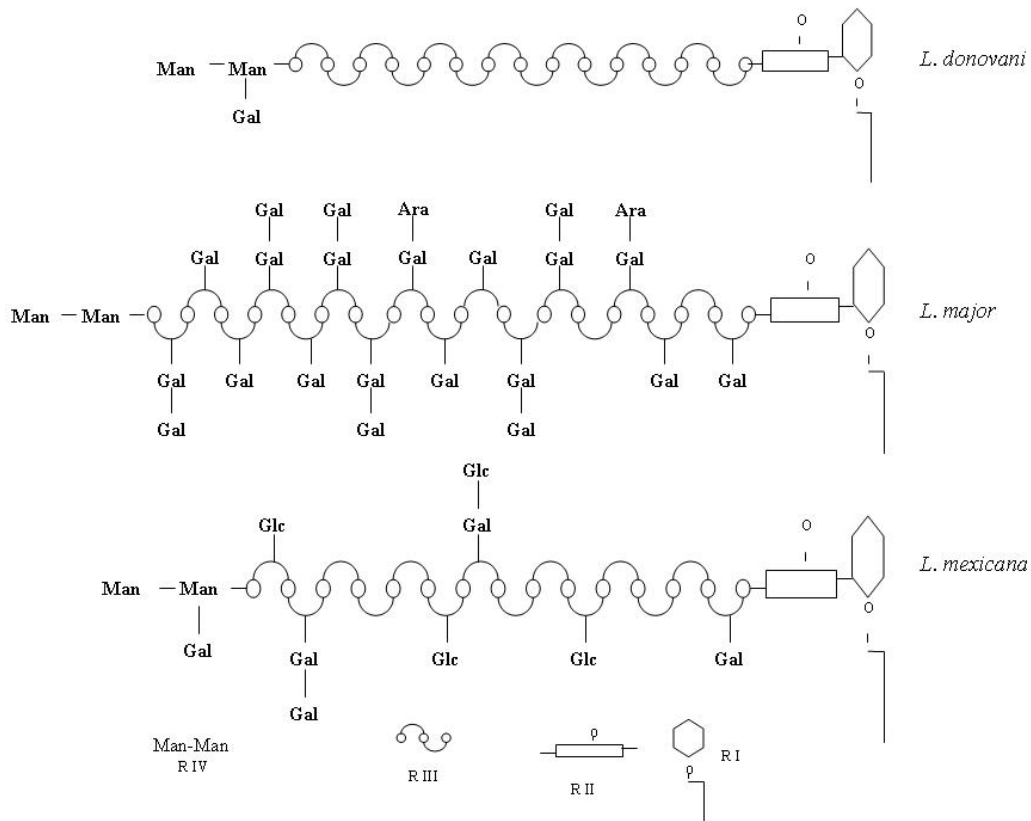


Figura 8. Diferencias en la estructura de LPG en tres especies de *Leishmania*. Se encuentra una gran diversidad en las unidades de repetición sacarídicas (Region III) y los diferentes disacáridos y trisacáridos en el casquete (R IV), en diferentes cepas y especies de *Leishmania*, dando por resultado una gran diversidad antigénica.

Función de LPG:

A) Resistencia al complemento

Entre el tiempo de inoculación y de infección del macrófago, el promastigote extracelular está expuesto a la lisis por la activación del complemento ya sea por la vía clásica o la vía alterna. Al activarse el factor C3 por alguna de estas dos vías y con la acción de la convertasa del C3, dará origen a los factores C3b y C3bi que son fijados por la LPG en la membrana extracelular del parásito. Estos componentes del complemento una vez fijados

por el parásito son reconocidos por los receptores del macrófago, CR1 para el factor C3b y el CR3 para el factor C3bi y de esta forma el parásito es fagocitado por el macrófago. Mediante esta opsonización la *Leishmania* es fagocitada por el macrófago y protegida de la lisis por el complemento [11, 18].

B) Sobrevida intracelular

Una vez que el parásito es internalizado y se encuentra dentro del fagolisosoma, se transforma en amastigote resistiendo a la acción de las enzimas hidrolíticas y los productos tóxicos de oxígeno, teniendo así la capacidad de sobrevida para seguir multiplicándose. Se ha estudiado la acción de LPG sobre cuatro enzimas hidrolíticas de macrófagos de ratón y se ha encontrado que la LPG no afecta la actividad de la fosfatasa ácida, β -glucosidasa y N-acetil- β -glucosidasa, pero sí se ve afectada la actividad de la enzima β -galactosidasa por acción de las cargas negativas de LPG [19]. Estudios *in vitro* han demostrado que *Leishmania* necesita por lo menos el 20% del total de moléculas de LPG intactas para lograr una sobrevida en el interior del fagolisosoma del macrófago. En la actualidad se siguen estudiando los mecanismos por los cuales el LPG confiere protección al parásito ante los mecanismos microbicidas desencadenados por el macrófago [20].

1.4 Respuesta inmune hacia *Leishmania*.

El sistema inmune humano está programado para responder rápidamente ante la invasión de patógenos, además puede desarrollar respuestas altamente específicas que reconozcan posteriormente al agente infeccioso con el que se ha tenido contacto. Estas dos respuestas se conocen como inmunidad adaptativa e inmunidad innata.

1.4.1 Respuesta inmune adaptativa.

Las infecciones por *Leishmania* desencadenan una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T.

-Linfocitos T CD4+:

Se ha demostrado que los linfocitos T CD4+ juegan un papel importante en la evolución de la enfermedad, en base al patrón de interleucinas que secretan. Estas células se pueden diferenciar en CD4+ tipo 1 (Th1) y CD4+ tipo 2 (Th2). Las células de tipo Th1 secretan interleucina 2 (IL-2), e IFN γ . La secreción de estas interleucinas lleva a la activación del macrófago. Las células de tipo Th2 liberan interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), e interleucina 10 (IL-10). La presencia de IL-4 antagoniza la acción de IFN γ frente al macrófago. Aunque se desconoce mucho acerca de los factores responsables de la inducción hacia la respuesta Th1 o Th2, se sabe actualmente que los niveles de IL-12 presentes en etapas tempranas del padecimiento son decisivos para el desenlace de la enfermedad. La capacidad del macrófago de secretar niveles altos de IL-12 se correlaciona con la inducción de la respuesta de tipo Th1.

El papel de estas interleucinas se ha podido analizar en modelos murinos. Los ratones naturalmente susceptibles a *Leishmania* (BALB/c), cursan con una respuesta Th2 lo cual permite una multiplicación incontrolada del parásito y progresión del padecimiento (Figura 9).

En los ratones resistentes a *Leishmania* (C57BL/6) se desencadena una respuesta linfocitaria Th1, originando la liberación de IFN γ y la estimulación subsecuente del macrófago con el control de la enfermedad [21, 22].

Los linfocitos T CD8⁺ son células efectoras importantes en el marco de la infección parasitaria intracelular y se ha visto que los linfocitos T CD8⁺ juegan un papel esencial en la curación de reinfecciones por *L major*. Los mecanismos de protección de los linfocitos T CD8⁺ pueden ser mediados por la producción de IFN γ o bien por su actividad como célula citotóxica, con la propiedad de lisar macrófagos infectados [23, 24].

1.4.2 Respuesta inmune innata

Al penetrar la *Leishmania* al organismo se activan dos tipos de células importantes en la respuesta inmune natural inespecífica: las células NK (asesina natural) y los macrófagos. Los macrófagos juegan un papel central, primero fagocitan al parásito e inducen la respuesta inmune específica mediante la presentación del antígeno en combinación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) con la activación de linfocitos CD4⁺ y con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC I) con activación de linfocitos CD8⁺. Adicionalmente liberan citocinas como IL-2 e IL-12, las cuales a su vez son inductoras de la respuesta inmune específica. El papel de la IL-12 es crucial en la leishmaniasis debido a que activa un grupo de células productoras de IFN γ , el cual es responsable de la activación subsecuente del macrófago y control de la enfermedad [25]. Una de las células activadas por IL-12 es la célula NK. En modelos murinos la interacción temprana entre *Leishmania* y células NK es decisiva para la evolución del padecimiento, ya que la depleción de células NK durante las dos primeras semanas de la infección lleva a una exacerbación del padecimiento. El efecto protector ejercido por las células NK radica tanto en su actividad citotóxica como en la producción de IFN γ [26].

1.5 Células Dendríticas

Las células dendríticas tienen la habilidad de transportar antígenos desde el sitio del primer encuentro con la *Leishmania* en la piel hasta los ganglios linfáticos para su presentación a las células T. Se ha descrito que las células dendríticas pueden producir IL-12, contrario a lo que sucede con el macrófago infectado en donde *Leishmania* puede inhibir la producción de IL-12. El LPG de *Leishmania* puede modular e inhibir la migración de las células, pero la expresión de moléculas del MHC II y las moléculas coestimuladoras B7 no se ven afectadas [27].

1.6 El macrófago

Los macrófagos son células del sistema fagocítico mononuclear, dentro del cual se incluyen macrófagos del tejido, monocitos y promonocitos de sangre periférica.

Los macrófagos son células grandes de aproximadamente 25 a 50 micras de diámetro y de superficie irregular. Tienen un núcleo en forma arriñonada. Presentan un citoesqueleto conformado por microtúbulos y microfilamentos que rodean al núcleo y se reparten por todo el citosol. En la cara interna de la membrana celular se encuentran filamentos de actina que intervienen en la formación de pseudópodos, en la movilidad celular y en los procesos de endocitosis. El citoplasma presenta un complejo de Golgi bien desarrollado, un número variable de vacuolas y vesículas pinocitarias, mitocondrias grandes y lisosomas asociadas a membranas [28].

1.6.1 Funciones

Los macrófagos intervienen en todas las fases de la respuesta inmune. Primeramente constituyen un mecanismo protector de acción rápida, que puede actuar antes de que se

haya producido la amplificación mediada por las células T. Intervienen en las primeras fases de la activación de las células T, procesando y presentando los antígenos. Finalmente, tras ser activados por células T participan en la fase efectora, se comportan como células inflamatorias, antitumorales y antimicrobianas [29].

En forma general las funciones del macrófago se pueden resumir de la siguiente manera:

1. - Célula fagocítica
2. - Célula secretora de factores que pueden activar a otros componentes del sistema inmune.
3. - Célula presentadora de antígenos a través de moléculas de clase I y II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).
4. - Célula efectora con eliminación de microorganismos intracelulares.

1.6.2 Mecanismos efectores del macrófago

Entre los mecanismos efectores más importantes del macrófago se encuentra la generación de intermediarios reactivos de oxígeno y de óxido nítrico durante el estallido oxidativo.

La perturbación de la membrana del macrófago durante la fagocitosis induce al incremento de consumo de oxígeno, llamándose a este proceso estallido oxidativo. Durante este proceso la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) generará compuestos de oxígeno como son el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete (1O_2) y radicales hidroxilo ($\cdot OH$) que son compuestos altamente microbicidas.

La NADPH oxidasa puede ser activada por diferentes partículas y agentes solubles; una vez activada la NADPH oxidasa, el citocromo b_{558} cataliza la transferencia de electrones

generándose el O_2^- , el cual con ayuda de la superóxido dismutasa (SOD) dará origen al H_2O_2 . Este sustrato podrá ser reducido por tres mecanismos:

1.- Por la acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSH) el H_2O_2 se convertirá en $H_2O + O_2$ (mecanismo de detoxificación).

2.- Por la acción de la mieloperoxidasa (MPO) el H_2O_2 se reducirá en ácido hipocloroso (HOCl) y como mecanismo de regulación el $HOCl + H_2O_2$ dará origen al $^1O_2 + H_2O$.

3.- Por ultimo el H_2O_2 se catalizará por Fe^{2+} con generación de ^-OH .

Todas estas moléculas serán generadas en las vacuolas fagocíticas con una gran actividad tóxica sobre los microorganismos [30, 31] (Figura 10).

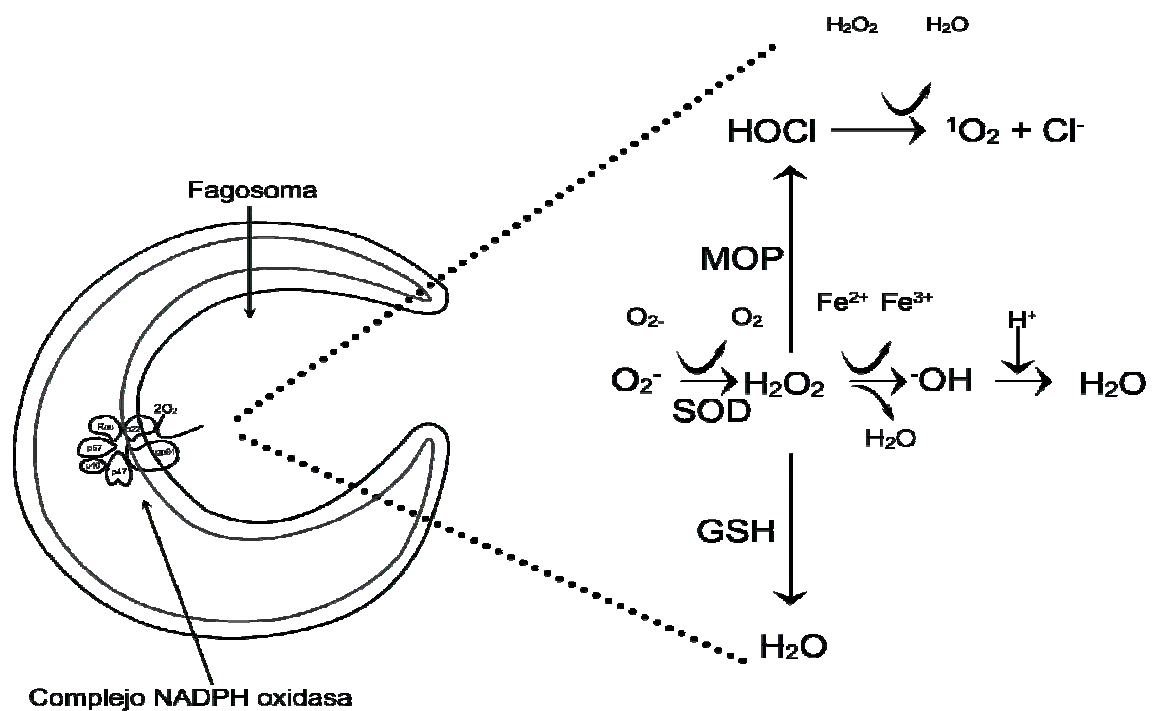


Figura 10. El estallido oxidativo inicia con el consumo de oxígeno generando así metabolitos tóxicos de oxígeno.

1.7 Proteína Cinasa C (PKC)

Se ha demostrado que también el acetato de forbol miristato (PMA) induce el estallido oxidativo mediante la activación de la proteína cinasa C (PKC). Esto ocurre cuando el PMA induce la traslocación de la PKC desde el citosol hasta la membrana intracelular del macrófago, donde es fosforilada (activada) y de esta forma es capaz de estimular a la NADPH oxidasa generando así todos los componentes tóxicos de oxígeno [32-34].

En los años 70s Fischer y colaboradores describieron a una proteína de origen animal capaz de fosforilar a otras proteínas blanco en los residuos serina/treonina. Esta proteína es conocida como Proteína Cinasa C (PKC) [34].

En la actualidad se han reportado 11 isoformas de PKC las cuales se clasifican en tres grupos por su estructura y la regulación por cofactores:

I) Convencional (PKC c): este grupo requiere de fosfatidilserina, diacilglicerol y Ca^{2+} para su activación y son PKC α , $\beta 1$, $\beta 2$ y γ .

II) Nuevas (PKC n): para su activación también requieren fosfatidilserina, diacilglicerol pero no de Ca^{2+} . A este grupo lo conforman la PKC δ , ϵ , η , θ y μ .

III) Atípicas (PKC a): su regulación aún no es del todo establecida pero se ha demostrado que requieren de fosfatidilserina para su activación, y son la PKC ξ y λ . [34] (Figura 11)

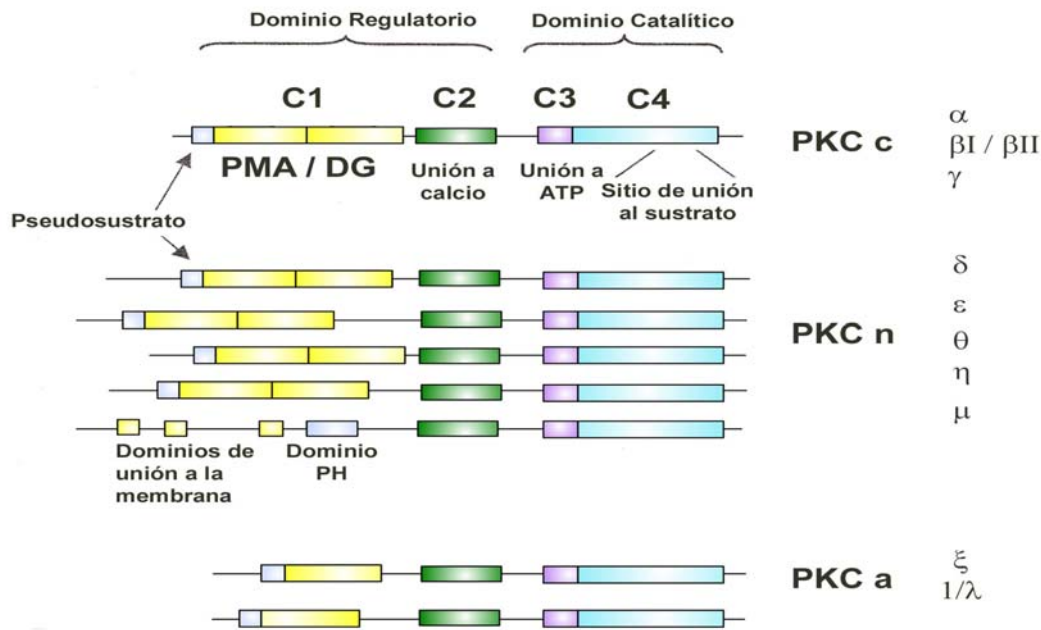


Figura 11. Estructura de las isoformas de PKC

La PKC juega un papel importante en la célula a nivel de transducción de señales. La activación de PKC inicia cuando la fosfolipasa C (PLC) de la membrana celular hidroliza al fosfatidil-4,5-bisfosfato (PIP₂) dando lugar a dos segundos mensajeros que son 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) [35].

El DAG activa directamente a la proteína cinasa siendo esta activación más estable con la ayuda de los fosfolípidos ácidos como la fosfatidilserina (PS), el IP₃ es capaz de inducir la apertura de canales de calcio en la membrana celular y del retículo endoplásmico provocando la liberación de calcio en el citosol [36].

El incremento de calcio, la interacción de DAG así como de la PS mantendrán a la PKC activa para poder fosforilar a la proteína blanco.

PKC tiene una región amino terminal de regulación (de aproximadamente 20-40 kDa). El dominio regulatorio posee dos regiones muy conservadas C1 y C2 además cuenta con una región auto-inhibitoria llamada también región del pseudo-sustrato.

La región C1 está presente en todas las isoformas de PKC, es una estructura globular de dos hojas β plegadas de aproximadamente 8 kDa, es una secuencia rica en cisteínas en la cual se encuentran dos átomos de zinc (dedos de zinc), en este *motif* de dedos de zinc es donde se une el DAG y los ésteres de forbol, la unión a la cinasa se lleva a cabo por la formación de puentes de hidrógeno y los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína [37].

La región C2, de aproximadamente 12 kDa, se encuentra en las PKC c (α , β 1, β 2 y γ) es la región de unión al calcio. En las PKC n (δ , ϵ , η , θ y μ) esta región es llamada por algunos autores como región ligera-C2 la cual no presenta los grupos funcionales que están involucradas en la unión al calcio [38].

La región del pseudosustrato está presente en todas las isoformas y es la región responsable de mantener inactiva a la cinasa cuando no están presentes los activadores como el DAG, PS y calcio, se ha propuesto que la PKC en ausencia de los activadores se encuentra plegada donde la región del pseudosustrato se encuentra unido en el dominio catalítico a nivel de la región de unión al sustrato y de esta forma se evitan la fosforilación inespecífica de proteínas.

El dominio carboxilo terminal o dominio catalítico está presente en todas las isoformas y consta de dos regiones muy conservadas C3 y C4 formadas de α hélices de aproximadamente 45 kDa.

La región C3 es el lugar de unión para el ATP, la región C4 es importante en el reconocimiento de la proteína blanco que será fosforilada por la transferencia de un grupo fosfato obtenido del ATP [39] (Figura 11).

La PKC presenta diferentes patrones de expresión en tejidos y distribución celular lo que sugiere que puede tener distintas funciones (Tabla 2).

	Isoforma	Activadores	Expresión en tejido
PKC c	α	Ca ²⁺ , DAG, PS, LisoPC	Universal
	β I	Ca ²⁺ , DAG, PS, LisoPC	Algunos tejidos
	β II	Ca ²⁺ , DAG, PS, LisoPC	Muchos tejidos
	γ	Ca ²⁺ , DAG, PS, LisoPC	Cerebro
PKC n	δ	DAG, PS	Universal
	ϵ	DAG, PS, PIP ₃	Cerebro y otros
	η	DAG, PS, Colesterol sulfato	Piel, Corazón, Hígado
	θ	DAG, PS	Músculo, células T, Macrófagos
	μ	DAG, PS	Hígado, Macrófagos
PKC a	ζ	PS	Universal
	λ	?	Muchos tejidos

Tabla 2: Isoformas de PKC expresadas en tejido de mamíferos (DAG: diacilglicerol, PS: fosfatidilserina, LisoPC: lisofosfatidilcolina)

Se sabe que una célula determinada generalmente expresa diversas isoformas de PKC, muchas de estas isoformas se encuentran localizadas en estructuras celulares específicas en una forma inactiva [35].

Estudios bioquímicos e inmunoquímicos indican que la actividad biológica de las PKCs está fuertemente regulada por su localización. La activación de alguna de estas isoformas se

ha comprobado que puede ser regulada por el receptor que se une a un ligando específico como hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y citocinas.

El estímulo que puede recibir una célula puede ser un activador específico de PKC, dependiendo primero del tejido donde se encuentre la célula y segundo de cofactores y proteínas de anclaje que interaccionen con la PKC que pueden estar presentes única y exclusivamente en ese tejido o célula. Por ejemplo, en fibroblastos el estímulo con α -trombina ocasiona una rápida translocación de la PKC α a la membrana celular desde el citosol, mientras que PKC ε y PKC ζ no responden al estímulo y cuando se estimulan células pituitarias con tirotrópina, la PKC α , PKC β y PKC δ no responden ante el estímulo pero PKC ε si responde y ejerce una regulación negativa [40].

La PKC juega un papel muy importante en el control de un gran número de procesos celulares de la respuesta inmune, los cuales incluyen secreción, función de receptores de membrana, diferenciación celular y promoción de tumores.

Se ha aceptado que PKC es central en la transducción de señales importantes en la respuesta inmune adaptativa de mamíferos. La función de PKC en la defensa del hospedero se ha establecido desde los organismos más primitivos. La vía de señalización DAG-PKC se ha conservado a través de la evolución desde levaduras hasta el hombre.

1.7.1 Papel de PKC en la leishmaniasis:

Cuando el parásito de *Leishmania* infecta a las células fagocíticas mononucleares del hospedero mamífero puede causar un amplio espectro de manifestaciones clínicas. El parásito *Leishmania* tiene la capacidad de causar disfunción en los macrófagos lo cual puede contribuir a la infección crónica.

Uno de los mecanismos más importantes que ha desarrollado *Leishmania* para poder tener éxito en la supervivencia intracelular es la inhibición de PKC. Uno de los primeros trabajos donde se demostró que LPG es una molécula que afecta las funciones del macrófago fue realizada por Turco y colaboradores [33]. Este grupo de investigadores demostró que el LPG no inhibía significativamente la unión de PKC α a la membrana celular, pero sí disminuía su actividad enzimática en un 70%. Este grupo postuló que LPG causaba un cambio estequiométrico en la PKC, afectando la afinidad al diacilglicerol (DAG), que es el activador fisiológico de la mayoría de las isoformas de PKC [41]. Estudios posteriores revelaron que el fragmento 1-*O*-alquilglicerol de LPG era la región que causaba una inhibición significativa en la actividad enzimática de PKC purificada. Estos resultados sugirieron que LPG interactúa con el dominio regulatorio de PKC, que es el sitio de unión al DAG, al calcio y fosfolípidos [33]. También se ha demostrado que la molécula intacta de LPG se puede insertar en la bicapa-lipídica de la membrana celular (incrementando la temperatura de transición de la bicapa lipídica) afectando el rearrreglo de las proteínas de la membrana celular e inhibiendo su fusión [42]. En otro estudio se estableció que durante la infección con promastigotes de *Leishmania*, el LPG se puede transferir al macrófago, pudiéndose localizar en forma intacta en las vesículas y en la superficie del macrófago en el primer día post-infección, aunque no se identificó a los cinco días después de la infección. Durante los primeros días de infección se ha podido identificar que los carbohidratos no ramificados (C₂₄ o C₂₆) de la molécula de LPG son los responsables de suprimir la actividad de PKC [33, 43]. Estudios más recientes han descrito el papel que tiene PKC α en la reorganización de la F-actina durante la fagocitosis y en la maduración del fagosoma en el macrófago. Se ha demostrado que LPG de *L. major* inhibe la capacidad enzimática de PKC

α para fosforilar a una proteína que pertenece a la familia de F-actina llamada Sustrato de Cinasa C Ricas en Alanina Mirestilada (MARKS), provocando que la F-actina se acumule en la periferia del fagosoma volviéndolo rígido evitando su fusión con el lisosoma (maduración), lo que es muy importante para que el parásito se multiplique y se establezca la infección [44]. Estudios en macrófagos murinos han demostrado que *L. major* puede inducir la translocación de la PKC α y PKC β desde el citosol hasta la membrana celular, concluyéndose con esto que la PKC β también puede estar involucrada en la reorganización del citoesqueleto como se había reportado para PKC α [45]. Otros estudios hechos en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c infectados con *L. donovani* demuestran que la LPG tiene la capacidad de disminuir la actividad enzimática de las PKC dependientes de calcio mientras que las isoformas independientes de calcio se ven aumentadas en su actividad enzimática. En este mismo estudio los autores demuestran como *Leishmania* inhibe la fosforilación de cuatro proteínas de 67, 54, 47 y 36 kDa e interesantemente estas proteínas no se ven afectadas en su fosforilación cuando los macrófagos son infectados con una cepa de *L. donovani* deficiente en LPG (cepa R2D2). Las proteínas de 67 y 47 kDa podrían ser componentes del complejo NADPH oxidasa y la inhibición de la fosforilación de estas dos proteínas es el resultado de la inhibición de la capacidad enzimática de PKC por LPG. Estos datos explicarían como el parásito puede regular algunos de los mecanismos de la respuesta inmune del hospedero en la leishmaniasis visceral [46].

Otra molécula que se encuentran en la superficie de *Leishmania* es el glicosilinositol fosfolípido (GIPL). Esta molécula es 10 veces más abundante que LPG, pero de menor tamaño y su interacción con la célula hospedera aun no se conoce bien. Al igual que LPG, los GIPL forman parte de la familia de los glicosil-fosfatil-inositoles (GPIs) y también se ha

comprobado que los GIPLs pueden inhibir a la PKC compitiendo con el sitio de unión al DAG en el dominio regulatorio. La participación de los GIPLs en la inhibición de las vías de señalización a través de PKC se demostró en macrófagos de la línea celular J774A.1. Estos macrófagos se incubaron con esferas sintéticas recubiertas con GIPLs purificados de *L. donovani*. Se encontró que había una inhibición de la expresión del gen *c-fos* en un 60 % con un 50 % de inhibición en la actividad enzimática de PKC [47]. (Figura 12).

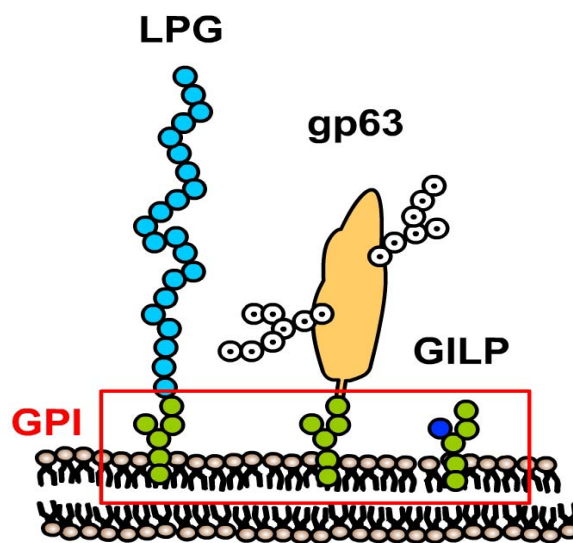


Figura 12. Moléculas en la superficie de *Leishmania* que inhiben PKC

2. JUSTIFICACIÓN

En México *Leishmania mexicana* puede producir manifestaciones clínicas variadas desde una forma clínica relativamente benigna, como es la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), hasta la forma clínica más severa de difícil tratamiento, como es la leishmaniasis cutánea diseminada (LCD). Las causas de la variabilidad de los cuadros clínicos se está estudiando exhaustivamente. En la actualidad se emplean modelos experimentales de leishmaniasis cutánea en cepas de ratones genéticamente susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) a la leishmaniasis por muchos grupos de investigación, para entender los mecanismos de la respuesta inmune implicados en la resistencia y susceptibilidad a la infección [48-50].

Cuando los parásitos de *Leishmania* infectan a las células fagocíticas mononucleares del hospedero mamífero pueden alterar funciones esenciales en los macrófagos y de esta manera contribuir a la infección crónica [51]. Uno de los mecanismos más importantes que ha desarrollado *Leishmania* para tener éxito en la supervivencia intracelular es la inhibición del estallido oxidativo ejercido por LPG sobre la actividad enzimática de PKC α [33, 41, 52-55]. Recientemente se demostró que PKC α es la isoforma requerida por el macrófago para la producción del anión superóxido (O_2^-), que es uno de los metabolitos tóxicos de oxígeno importantes en el estallido oxidativo [56]. Sin embargo, aun no se ha estudiado si hay distinta inhibición de PKC α entre ratones susceptibles y resistentes. En este trabajo examinamos si existe una diferencia en el efecto que ejerce LPG de *Leishmania mexicana* sobre la expresión y actividad de PKC α entre macrófagos de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) a la leishmaniasis y si esto se puede correlacionar con la susceptibilidad a la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

La susceptibilidad a la leishmaniasis se correlaciona con el efecto que ejerce LPG sobre la expresión y actividad de PKC α .

4. OBJETIVOS

El objetivo central de este trabajo es analizar el efecto que ejerce LPG de *Leishmania mexicana* sobre la expresión y actividad enzimática de la isoforma de PKC α en macrófagos de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6).

Para ello se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Purificar LPG de promastigotes de *Leishmania mexicana* por cromatografía de interacción hidrofóbica.
- 2.- Determinar si hay diferencias en la expresión de la isoforma de PKC α en macrófagos derivados de médula ósea de ratones susceptibles y resistentes a la leishmaniasis.
- 3.- Analizar si hay cambios en la expresión de la isoforma de PKC α cuando los macrófagos son estimulados con *Leishmania mexicana* y LPG.
- 4.- Analizar si LPG modula la actividad enzimática de la isoforma de PKC α en los macrófagos de ratones BALB/c y C57BL/6.
- 5.- Analizar si LPG de *L. mexicana* modula la participación PKC α en el estallido oxidativo cuando es inducido con PMA en macrófagos de ratones BALB/c y C57BL/6.
- 6.- Analizar si PKC α participa en la sobrevivencia de *Leishmania mexicana* en macrófagos de ratones BALB/c y C57BL/6.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de los estudios abajo descritos, se utilizaron ratones machos de 10 semanas de edad de las cepas BALB/c y C57BL/6 obtenidos del bioterio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina UNAM. La cepa de *Leishmania mexicana* utilizada fue MNY/62/M379.

5.1 Obtención de Lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana*

Los parásitos de *Leishmania mexicana* fueron cultivados en medio RPMI 1640 (Gibco BRL) complementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) de complementado. Los promastigotes metacíclicos fueron cosechados en la fase estacionaria del cultivo. Se obtuvieron 1×10^9 parásitos por centrifugación a $3,200 \times g$ por 10 min a $4^{\circ}C$ y fueron lavados tres veces con PBS pH 7.4 frío. El paquete celular fue deslipidado con 80 ml de cloroformo-metanol-agua (4:8:3 v/v) por 30 min; el material insoluble se resuspendió en agua saturada con 1-butanol y liofilizado (2x50 ml). La LPG se purificó por HPLC en una columna de octil-Sepharose (Pharmacia) mediante un gradiente lineal del 5 al 70 % de 1-propanol y acetato de amonio 0.1 M. Las fracciones que fueron desprendidas por el gradiente (fracción 15-30) se colectaron y se liofilizaron, posteriormente se resuspendieron en 20 ml de acetato de amonio y se pasaron por una segunda columna de octil-Sepharose bajo las mismas condiciones. Nuevamente se colectaron las fracciones desprendidas por el gradiente (fracción 15 a 30), se concentraron a 3 ml y se dializaron 4 veces contra 5 litros de PBS pH 7.4. La pureza del LPG fue analizada en un gel SDS al 10 % con tinción de plata para carbohidratos. Por último, se determinó la concentración de carbohidratos en LPG purificado por el método de Antrona. Como control de calidad, se analizó la LPG para

la presencia de lipopolisacárido (LPS) mediante la prueba de aglutinación de amebocitos de *Limulus*. Mediante tinción de plata para proteínas se analizaron posibles contaminantes protéicos [57].

5.2 Obtención de macrófagos de médula ósea de ratones

Se sacrificaron ratones (BALB/c o C57BL/6) por dislocación cervical y se bañaron con etanol. Se extrajo la médula ósea de los huesos largos (tibia y peroné). Se cultivó la médula ósea en cajas de Petri (Falcon) de 10 cm de diámetro que contenían 50 % de medio DMEM (Gibco BDRL), 30 % del sobrenadante de cultivo de la línea celular L-929, 20 % de SFB y 10 μ l/ml de L-glutamina-200 mM de Gibco. Los cultivos se mantuvieron a 37⁰C con CO₂ al 5 % por 7 días. Los macrófagos fueron desprendidos de las cajas de cultivo con policías en PBS frío. Se contaron los macrófagos en una cámara de Neubauer y se dejaron reposar 5x10⁶ macrófagos para cada condición durante 24 h. La pureza de las células fue evaluada por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-F4/80 (Becton Dickinson)[58].

5.3 Obtención de macrófagos peritoneales de ratones

Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos por lavados peritoneales con 10 ml de PBS pH 7.4 frío. La suspensión celular fue centrifugada a 800 x g por 10 min a 4⁰C, el paquete celular fue resuspendido en RPMI 1640 complementado con 10 % de SFB.

5.4 Ensayo de expresión de proteína (PKC α)

Se infectaron 5x10⁶ macrófagos de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6 (que estuvieron en reposo) con 50x10⁶ promastigotes de *Leishmania mexicana* por 2 h a

temperatura ambiente. Los macrófagos fueron lavados con PBS para eliminar los parásitos que no fueron fagocitados y se incubaron a 37⁰C con CO₂ al 5 % por 24 h. Otro grupo de 5x10⁶ macrófagos fue estimulado con LPG a una concentración de 10 µg/ml por cada millón de células e incubado a 37⁰C con CO₂ al 5 % por 24 h. Un grupo de macrófagos que se usó como control solo fue incubado a 37⁰C con CO₂ al 5 % por 24 h. Los macrófagos fueron lavados 3 veces con PBS pH 7.4 y resuspendidos en 1 ml de buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100, 50 mM 2-mercaptoetanol y 0.1 mg/ml de inhibidor de tripsina). La suspensión de macrófagos fue congelada a -70⁰C por 10 min y sonicada por 10 min, repitiéndose este proceso tres veces. Los macrófagos lisados fueron centrifugados a 20,000 x g a 4⁰C por 20 min, del sobrenadante se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford [59]. Las muestras se ajustaron a la misma concentración de proteínas (40 µg por carril) y fueron separadas en un gel SDS/PAGE al 10 % [60].

Los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa en un equipo transblot semi-seco durante 90 min (0.3 mA/cm²). La membrana se bloqueó durante 1 h con TBST (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl and 0.05% Tween 20) con 5 % de leche descremada (m/v) en agitación constante a temperatura ambiente y se lavó 5 veces con TBST. Se colocó el anticuerpo de interés (anti-PKC α) (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:1000 en TBST toda la noche a 4⁰C. La membrana se lavó 10 veces con TBST y se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Bio Rad Laboratories) a una dilución 1:5000 en TBS por 2 h a temperatura ambiente. [61]. Las proteínas que fueron reconocidas por el anticuerpo se sometieron a un análisis densitométrico y se determinó la expresión total de la PKC α.

5.5 Purificación parcial de PKC

Los macrófagos obtenidos del cultivo fueron lavados tres veces con PBS pH 7.4 y resuspendidos en 1 ml de buffer de lisis (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 50 mM 2-mercaptoetanol y 0.1 mg/ml de inhibidor de tripsina). La suspensión de macrófagos fue congelada a -70°C por 10 min y sonicada por 10 min, repitiéndose este proceso tres veces. El sobrenadante se colocó en una columna de DEAE-celulosa (Whatman) equilibrada con buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5 y 50 mM 2-mercaptoetanol) a 4°C . La PKC fue eluída con buffer (0.08 M NaCl, 2 mM EDTA, 0.1 mg/ml de inhibidor de tripsina). El eluído fue concentrado en Amicon (membrana YM-30). De la PKC parcialmente purificada y concentrada se cuantificaron proteínas por el método de Bradford [62].

5.6 Complejos inmunes de PKC α

Se incubaron alícuotas de 1 ml de la PKC parcialmente purificada (500 $\mu\text{g/ml}$) con inhibidores de fosfatasas (10 mM β -glicerolfosfato, 1 mM Na_2VO_4 , 11 mM NaF, 10 mM pirofosfato de sodio y 0.2 mg fosfoserina) en ausencia de 2-mercaptoetanol toda la noche a 4°C con $1\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo isoforma-específico de PKC, en agitación constante. El inmunoprecipitado se dejó en agitación constante con 25 μl de proteína A Sepharose (30 % m/v) durante 2 h a 4°C . Los complejos inmunes fueron lavados 5 veces con buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.6 M NaCl, 1 % triton X-100 y 0.5 % GPAL) y una vez con buffer de cinasas (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 0.5 mM CaCl_2 y 50 mM mercaptoetanol) que contenía inhibidores de fosfatasas (10 mM β -glicerolfosfato, 1 mM Na_2VO_4 , 11 mM NaF, 10 mM pirofosfato de sodio y 0.2 mg fosfoserina). La actividad de

la cinasa se inició cuando los complejos inmunes se pusieron en contacto con los diferentes estímulos: a) PMA 1×10^{-6} M (control positivo), b) LPG 10 μ g, c) PMA 1×10^{-6} M más LPG 10 μ g y d) Bisindolylmaleimida 1 (BIM-1) inhibidor específico para PKC (control negativo). La actividad de la cinasa obtenida de macrófagos infectados o no infectados con *Leishmania mexicana* en ambas cepas de ratones también fue analizada. Cada una de estas condiciones se resuspendieron en 50 μ l de la mezcla de reacción (buffer de cinasas con 20 μ g/ml fosfatidilserina, 0.8 μ g/ml 1,2-dioleina, 10 μ M (γ - 32 P) ATP (600Ci/mmol) (DuPont-NEN) y 200 μ g/ml del sustrato histona H1-IIIS (Sigma)). La reacción se incubó durante 20 min a 30⁰C y fue detenida con 30 μ l de buffer muestra para geles SDS/PAGE. Las muestras fueron analizadas en geles SDS/PAGE al 12 % (m/v) y por autoradiografía. Los datos fueron cuantificados por análisis densitométrico. El cociente de la autoradiografía 32 P/proteína teñida representa la fosforilación específica total [63].

5.7 Ensayos de quimioluminiscencia

El estallido oxidativo con la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) fue analizado mediante la quimioluminiscencia en presencia de 60 μ M de luminol (Sigma) utilizando un luminómetro (Labsystem, Finlandia) con temperatura controlada a 25⁰C. El estallido oxidativo fue inducido con 5×10^{-4} M de PMA y fue monitoreado cada 40 segundos durante 30 min. Los ensayos se realizaron con 1×10^6 macrófagos en presencia y ausencia de parásitos utilizando una relación de 10×10^6 promastigotes, 10 μ g de LPG y 2.3 nM Gö6976, un inhibidor específico para PKC α [64] y suspendidos en 40 μ l de RPMI 1640 en presencia de 210 μ l de luminol y 60 μ l de PMA. Las células utilizadas fueron

macrófagos peritoneales de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) a la leishmaniasis [65].

5.8 Sobrevida de parásitos intracelulares

Macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57BL/6 fueron infectados con promastigotes de *Leishmania mexicana* en fase estacionaria en una relación 1:10 y cultivados en RPMI a 25°C por 2 h. Los parásitos no fagocitados fueron removidos con lavados de PBS a temperatura ambiente. Las células infectadas fueron posteriormente incubadas en medio de cultivo en presencia o ausencia del inhibidor Gö6976 (2.3 nM) a 37°C con CO₂ al 5% por 24 h. Las células adherentes fueron estimuladas con 5 x10⁻⁴ M de PMA por 30 min. Los macrófagos fueron lavados 3 veces con PBS para eliminar el PMA. Las células fueron incubadas a 25°C por 24 h y el total de promastigotes extracelulares fueron contados. La sobrevida de los parásitos en los macrófagos no estimulados se utilizó como control. El porcentaje de sobrevida de los parásitos en células estimuladas (PMA o Gö6976) se calculó con respecto a los macrófagos no estimulados (control).

5.9 Prueba estadística

Los resultados fueron expresados con su promedio y error estándar y analizándose con la prueba estadística de U de Mann-Whitney, el valor de $P < 0.05$ es considerado estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Purificación de LPG

El LPG se purificó con dos columnas de octil-Sepharose, en la primera columna de octil-Sepharose se obtuvieron dos picos: en el primer pico se eluyeron todas aquellas moléculas que no tienen afinidad por la columna, como pueden ser proteínas o carbohidratos (Figura 13). Las fracciones correspondientes al segundo pico fueron desprendidas por el gradiente de 1-propanol y posteriormente se pasaron por una segunda columna de octil-Sepharose. Este método permitió la eliminación de moléculas que no tienen afinidad por la columna, favoreciendo un enriquecimiento del LPG (Figura 13). El LPG se obtuvo juntando las fracciones 18 a la 28 de la segunda columna de octal-Sepharose, en las cuales se encontró mayor concentración de carbohidratos. Las pruebas de control de calidad fueron negativas, tanto para proteínas como para endotoxina, con valores inferiores a 0.25 EU/ml (unidades de endotoxina por mililitro).

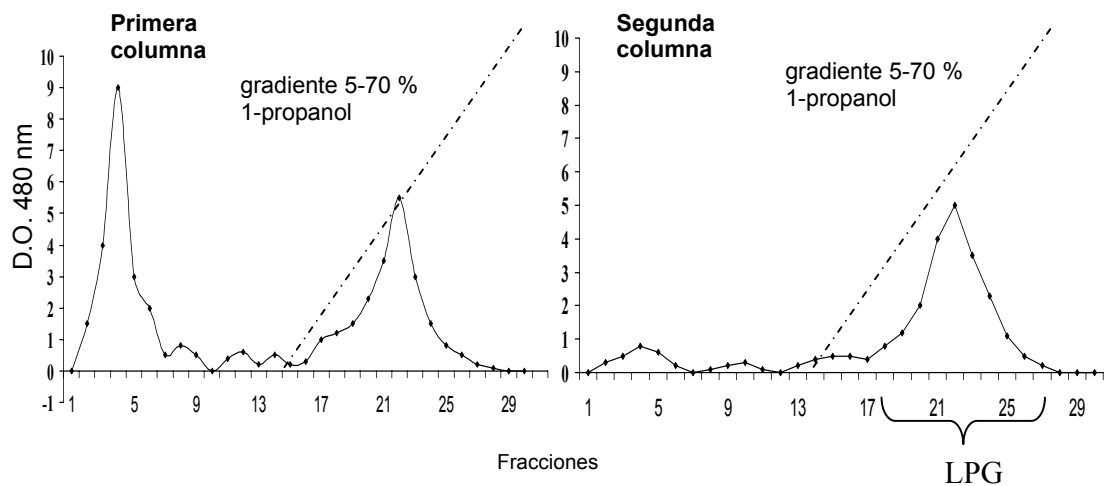


Figura 13. Purificación de LPG de *Leishmania mexicana* por cromatografía en columna de octil-Sepharose. En la primera columna, las fracciones del segundo pico 15 -29 fueron eluidas con el gradiente de 1-propanol y concentradas. Las fracciones concentradas se aplicaron a una segunda columna, las fracciones de la 18-28 fueron concentradas y se determinó la concentración de carbohidratos por método de Antrona.

a) Identificación de LPG por tinción de plata para carbohidratos:

Una vez que se purificó el LPG se esterilizó por filtración (0.22 micras) y se cuantificó por el método de Antrona. Se analizó en un gel SDS-PAGE al 12 % donde se cargaron 10 μ g de LPS como control positivo y 10 μ g de la LPG purificada. El LPG se pudo identificar con una tinción de plata para carbohidratos, con un peso molecular entre 25 hasta los 75 kDa, como se ha reportado [57] (Figura 14).

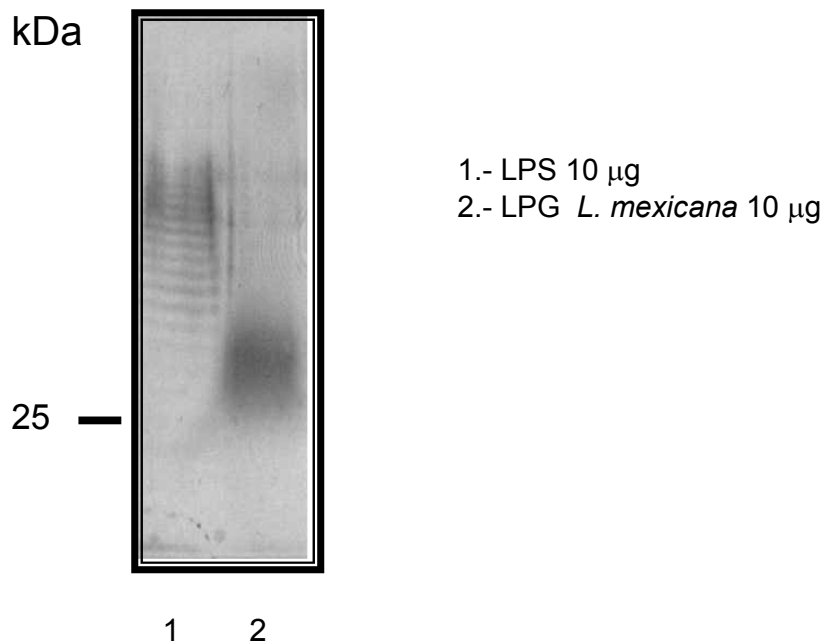


Figura 14. Análisis de la LPG en SDS PAGE con tinción de plata para carbohidratos: carril 1 LPS 10 µg (control positivo), carril 2 LPG (10 µg) obtenida de la segunda cromatografía de octil -Sepharose.

6.2 Obtención de macrófagos de médula ósea:

Para este trabajo se obtuvieron macrófagos de médula ósea de ratones susceptibles y resistentes a la leishmaniasis.

Se determinó la expresión del marcador de superficie F4/80 por citometría de flujo encontrándose este marcador en el 94 y 95 % de los macrófagos para BALB/c y C57BL/6 respectivamente. Esta pureza permitió establecer que la PKC utilizada en los experimentos provenía únicamente de los macrófagos (Figura 15).

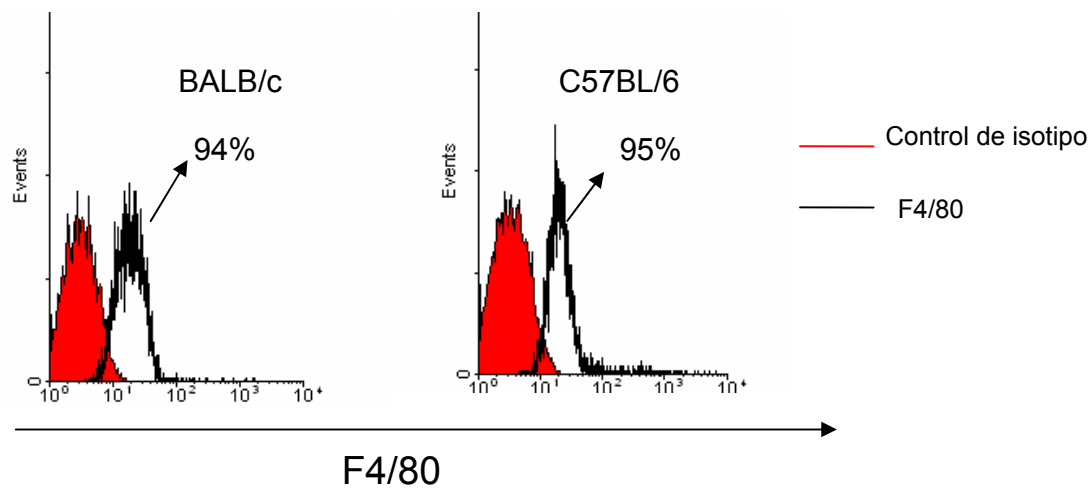


Figura 15. Determinación de la pureza por citometría de flujo de los macrófagos obtenidos de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6. Los macrófagos obtenidos de médula ósea en ambas cepas de ratones tuvieron una pureza mayor al 90 %.

6.3 Expresión de la proteína (PKC α)

Cuando se determinó si hay diferencias en la expresión de las isoformas de PKC α en macrófagos derivados de médula ósea de ratones susceptibles y resistentes a la leishmaniasis en condiciones básicas y estimulados con LPG y *Leishmania mexicana* encontramos lo siguiente:

a) Se identificó a la PKC α con un peso molecular de 80 kDa y utilizando a la actina como control de carga. Para eliminar el error de diferencias en la carga de proteína, se dividió el valor obtenido en la densitometría de la banda de proteína de PKC entre el valor obtenido de la banda de actina. El análisis estadístico de U de Mann-Whitney reveló que el estímulo con LPG o con el parásito de *Leishmania* no modificaban la expresión de PKC α , en

macrófagos de ratones BALB/c, comparadas con la expresión de PKC α en estado basal (Figura 16).

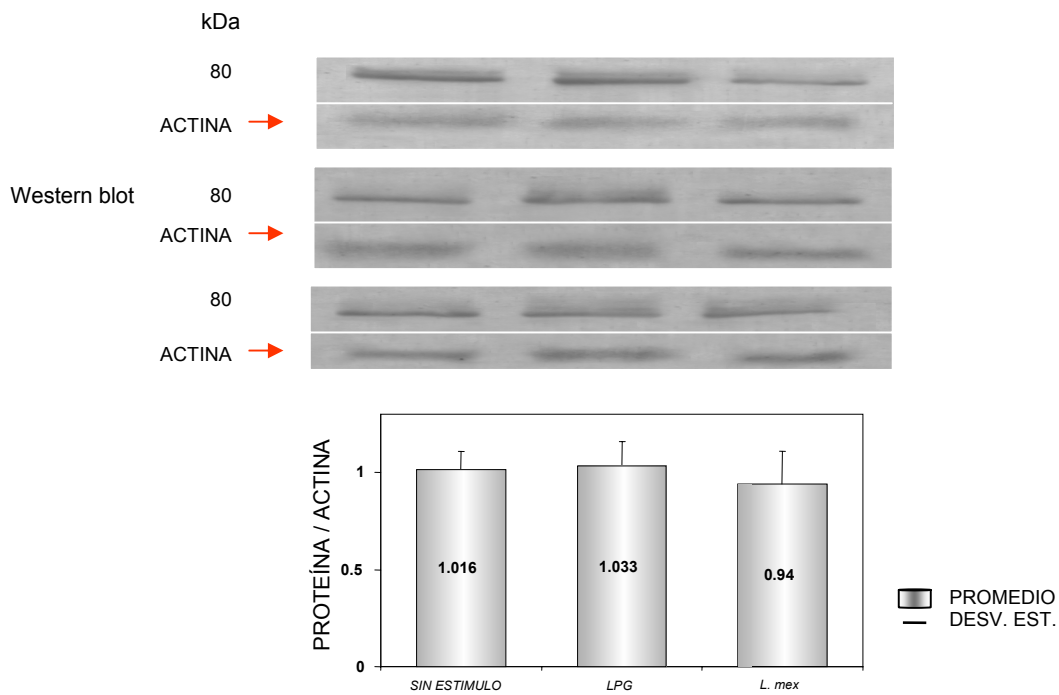


Figura 16. Análisis de la expresión por Western blot de PKC α en macrófagos de médula ósea de ratones BALB/c. PKC α es detectada con un peso de 80 kDa, el análisis densitométrico es determinado en condiciones basales, estimulado con LPG (10 μ g) o infectado con *Leishmania mexicana* 10:1 (parásitos: macrófagos). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

b) El análisis de la expresión de la isoforma de PKC α en los macrófagos derivados de médula ósea de los ratones C57BL/6 resistentes a la leishmaniasis estimulados con LPG y el parásito *Leishmania* reveló que la expresión de la isoforma de PKC α es igual tanto en condiciones basales como con los diferentes estímulos (Figura 17).

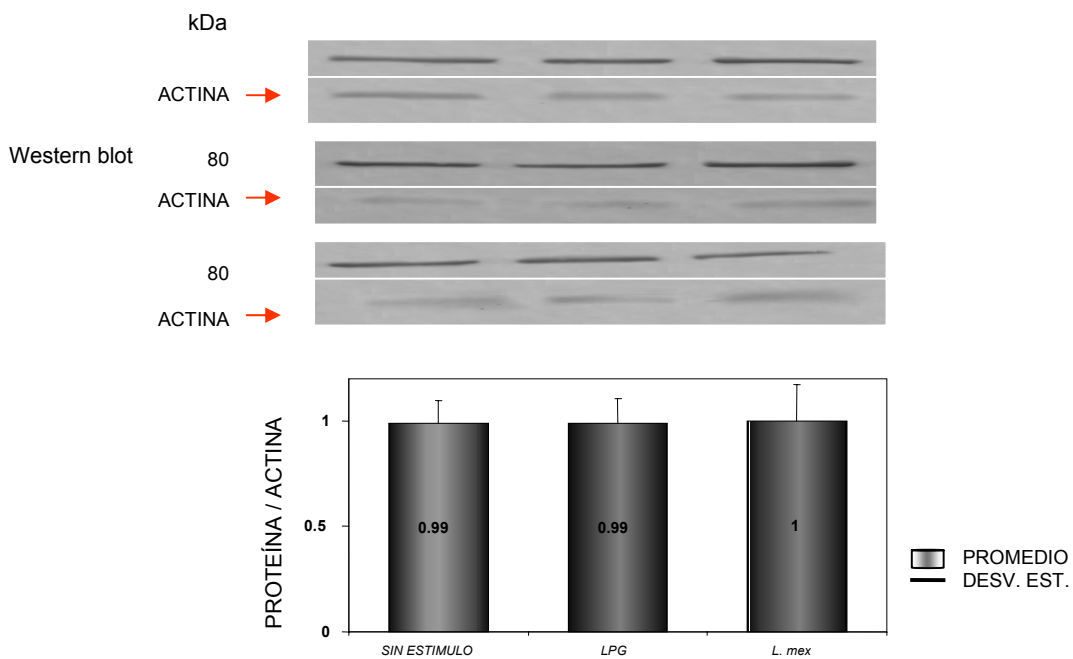


Figura 17. Análisis de la expresión por Western blot de PKC α en macrófagos de médula ósea de ratones C57BL/6. PKC α es detectada con un peso de 80 kDa, el análisis densitométrico es determinado en condiciones basales, estimulado con LPG (10 μ g) o infectado con *Leishmania mexicana* 10:1 (parsitos: macrófagos). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Este análisis reveló que no hubo cambios en la expresión de la PKC α en macrófagos de ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6, tanto en condiciones basales como con el estímulo de 10 μ g/ml de LPG o con *Leishmania mexicana*.

6.4 Actividad enzimática de PKC α

A.- El análisis de la actividad enzimática de la isoforma de PKC α en los macrófagos de ratones BALB/c y C57BL/6 estimulados con LPG revelaron que en ratones BALB/c:

1- El control positivo con PMA aumentó 1.82 veces la capacidad de PKC α para fosforilar a la histona H1 III comparada con el control en estado basal ($P < 0.0369$).

2- El estímulo de LPG disminuyó la actividad enzimática de PKC α , encontrándose un decremento en la fosforilación específica de la histona H1 III de aproximadamente 2.85 veces ($P < 0.0369$).

3- El estímulo de PMA más LPG también disminuyen la actividad de PKC α , observándose una inhibición no tan severa en la fosforilación específica de la histona H1 III, de aproximadamente 1.92 veces ($P < 0.0369$).

4- El efecto de inhibición que tuvo el compuesto BIM-1 sobre la actividad de PKC α es tan contundente que nos indica que la molécula que fosforila al sustrato es la PKC (Figura 18 A).

B.- Para los macrófagos de los ratones resistentes a la leishmaniasis C57BL/6 se encontró que:

1- El control positivo con PMA incrementó la capacidad de PKC α para fosforilar a la histona H1 III en 1.9 veces comparada con el control en estado basal ($P < 0.0369$).

2- El estímulo de LPG aumentó la actividad de PKC α , encontrándose un incremento en la fosforilación específica de la histona H1 III de aproximadamente 3 veces, con relación al valor basal ($P < 0.0369$).

3- El estímulo de PMA más LPG también aumentó la actividad de PKC α para fosforilar a la histona H1 III, observándose un incremento de 2.8 veces con relación al basal ($P < 0.0369$).

4- El efecto de inhibición que tubo el compuesto BIM-1 sobre la actividad de PKC α es el mismo que se observó en los ratones BALB/c (Figura 18 A).

C.- Cuando se analizó el efecto del parásito completo sobre la actividad de PKC α obtenida de macrófagos infectados con *Leishmania mexicana* en ambas cepas de ratón se encontró que:

1- La actividad enzimática de PKC α obtenida de macrófagos ratones de BALB/c disminuyo 1.85 veces en relación con la actividad de los macrófagos no infectados ($P < 0.036$) (Figura 18B).

2- En los macrófagos de ratones C57BL/6 infectados con *Leishmania mexicana*, la actividad de PKC α se incrementó 2 veces en relación al control de macrófagos no infectados ($P < 0.033$) (Figura 18B).

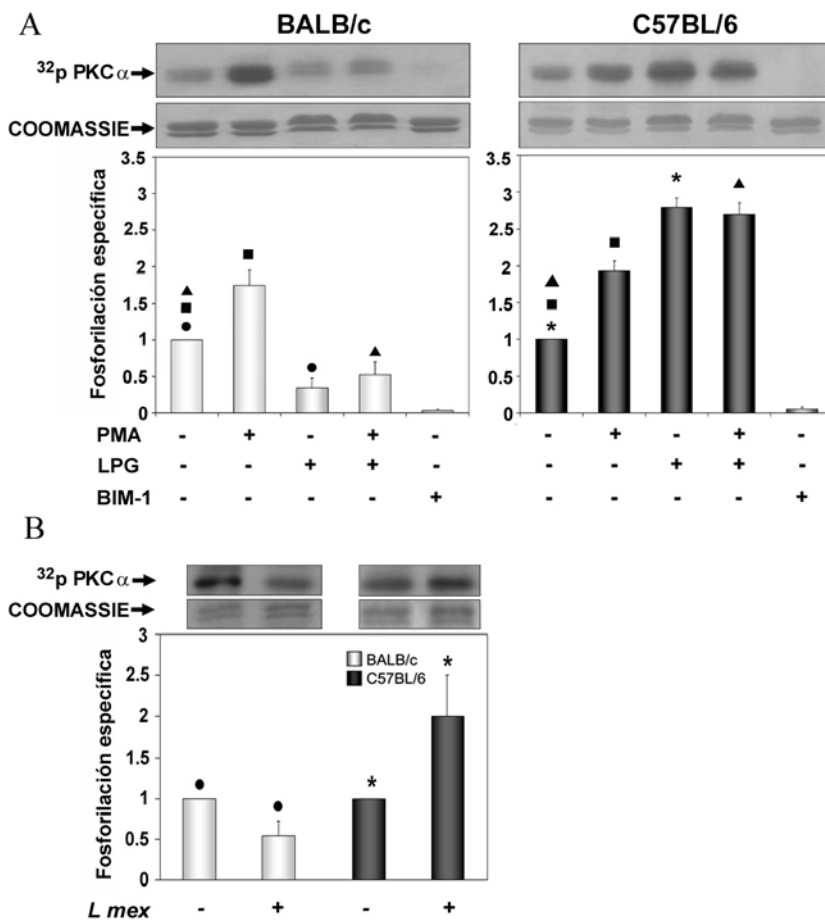


Figura 18. Análisis de la actividad enzimática de PKC α . El cociente de la autorradiografía ^{32}P /proteína teñida (Coomassie) representa la fosforilación específica total de la histona H1 III por la PKC α obtenida por inmunoprecipitación de macrófagos de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6 y estimulados con PMA ($1 \times 10^{-6}\text{M}$), LPG ($10\mu\text{g}$), PMA ($1 \times 10^{-6}\text{M}$) más LPG ($10\mu\text{g}$) y con BIM-1. A) Se observa una inhibición significativa por LPG en la fosforilación específica de la histona H1 III por la PKC α obtenida de macrófagos de ratones BALB/c ($P < 0.0369$). En contraste, PKC α de ratones C57BL/6 mostró un incremento en la actividad enzimática al ser estimulada con LPG ($P < 0.0369$). PMA es usado como control positivo y BIM-1 es el control negativo. B) se observa un efecto de inhibición sobre la fosforilación específica de la histona H1 III, cuando la PKC α es obtenida de macrófagos de ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana* (P

< 0.036). Para la PKC α obtenida de macrófagos de ratones C57BL/6 infectados con *Leishmania mexicana*, se observa un incremento en la fosforilación específica de la histona H1 III ($P < 0.033$).

6.5 Efecto de LPG y de *Leishmania mexicana* sobre el estallido oxidativo en macrófagos peritoneales de dos cepas de ratón

La diferencia en el efecto de LPG sobre la actividad de PKC α entre ratones BALB/c y C57BL/6 nos llevó a analizar si la inhibición de esta enzima tenía un efecto sobre el estallido oxidativo en ratones BALB/c. Se ha reportado que LPG de *Leishmania major* interactúa con el dominio de regulación de PKC, el cual es el sitio de unión para el diacilglicerol, lo cual afecta el papel de la PKC en la inducción del estallido oxidativo [33].

Primero se analizó el efecto de LPG sobre el estallido oxidativo inducido con PMA en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57BL/6 con o sin inhibidor específico de PKC α (Gö6976).

A.- En macrófagos de ratones BALB/c se encontró que LPG inhibió el estallido respiratorio 11.33 %, con respecto al control ($P < 0.0369$). Cuando los macrófagos fueron tratados con el inhibidor de PKC α (Gö6976), se observó que LPG provocó una mayor inhibición del estallido oxidativo de 18.3 % ($P < 0.0369$) (Figura 19A).

B.- En contraste, en los macrófagos de ratones C57BL/6, LPG mostró un aumento del 13.7 % en el estallido oxidativo ($P < 0.016$) en relación a su grupo control. Por otra parte se observó que el tratamiento de los macrófagos de ratones C57BL/6 con el inhibidor Gö6976 llevó a una disminución del estallido oxidativo en un 10.18 % cuando fueron incubados con LPG, comparado con su grupo control (Figura 19A).

C.- Se puede observar que la magnitud del estallido oxidativo inducido por PMA en presencia del inhibidor de PKC α (Gö6976), solo ó combinado con LPG, es igual en ambas cepas de ratón ($P < 0.0369$) (Figura 19A).

Para determinar la participación de *Leishmania mexicana* en la inhibición de PKC α , se analizó el efecto de *Leishmania mexicana* sobre el estallido oxidativo inducido con PMA en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57BL/6, con o sin inhibidor específico de PKC α (Gö6976.). En este análisis se encontró que *Leishmania mexicana* disminuyó significativamente el estallido oxidativo en un 46.4 % ($P < 0.037$) en los macrófagos de ratones BALB/c respecto al control, mientras que en los macrófagos de ratones C57BL/6 *Leishmania mexicana* disminuyó el estallido oxidativo en un 19.4 % ($P < 0.00013$) (Figura 19B). Por otra parte, se observó que *Leishmania mexicana* disminuyó el estallido oxidativo en un 46 % ($P < 0.0369$) y 48.4 % ($P < 0.00013$) en los macrófagos de ratones BALB/c y C57BL/6, respectivamente, cuando estos macrófagos estuvieron con el tratamiento del inhibidor de PKC α (Gö6976) (Figura 19B).

Estos resultados muestran un efecto opuesto en el estallido oxidativo ejercido por LPG de *Leishmania mexicana* en ambas cepas de ratón: mientras que en ratones BALB/c ejerce una inhibición significativa, en ratones C57BL/6 incrementa significativamente el estallido oxidativo.

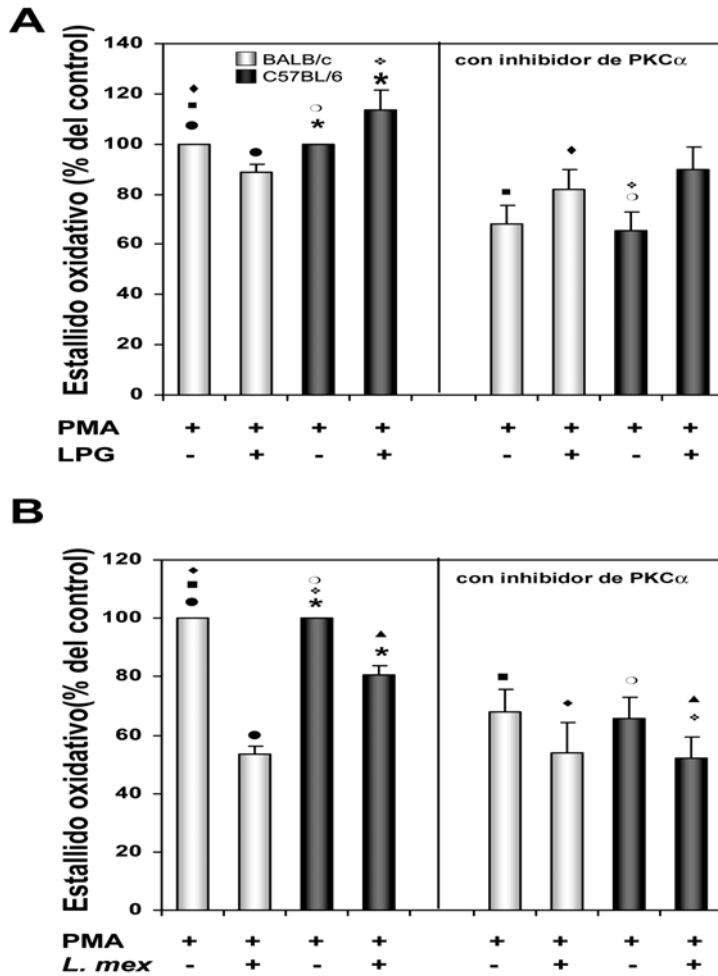


Figura 19. Análisis del efecto de LPG y de *Leishmania mexicana* sobre el estallido oxidativo en macrófagos peritoneales de ratón BALB/c y C57BL/6 en presencia o ausencia del inhibidor específico de PKC α (Gö6976). (A) El estallido oxidativo es inducido con PMA (5×10^{-4} M) en presencia de LPG, observándose una inhibición del estallido oxidativo ($P < 0.0369$) en macrófagos de ratones BALB/c, mientras que en los macrófagos de ratones C57BL/6 LPG estimula el estallido oxidativo ($P < 0.016$). En presencia del inhibidor Gö6976 no se observaron diferencias entre ambas cepas de ratón. (B) En presencia del parásito de *Leishmania mexicana* se observó inhibición del estallido oxidativo de ambas cepas de ratón siendo mayor en macrófagos de ratones BALB/c, mientras que presencia del inhibidor Gö6976 no se observó diferencia entre ambas cepas de ratón. Los datos representan el promedio \pm error estándar de 6 experimentos independientes, los símbolos significan diferencia significativa.

6.6 Correlación entre el efecto del LPG sobre la fosforilación específica por PKC α y el estallido oxidativo en macrófagos de ratones BALB/c y C57BL/6

El análisis del efecto de LPG sobre la actividad de PKC α y sobre el estallido oxidativo muestra que existe una correlación directa entre ambos eventos tanto en los ratones BALB/c así como en ratones C57BL/6. En los macrófagos de ratones BALB/c, LPG inhibe la capacidad de fosforilación de PKC α y ejerce una inhibición significativa del estallido oxidativo, mientras que en los macrófagos de los ratones C57BL/6 se muestra un efecto opuesto, LPG estimula la capacidad de PKC α para fosforilar a la histona H1III e incrementa significativamente el estallido oxidativo (Figura 20).

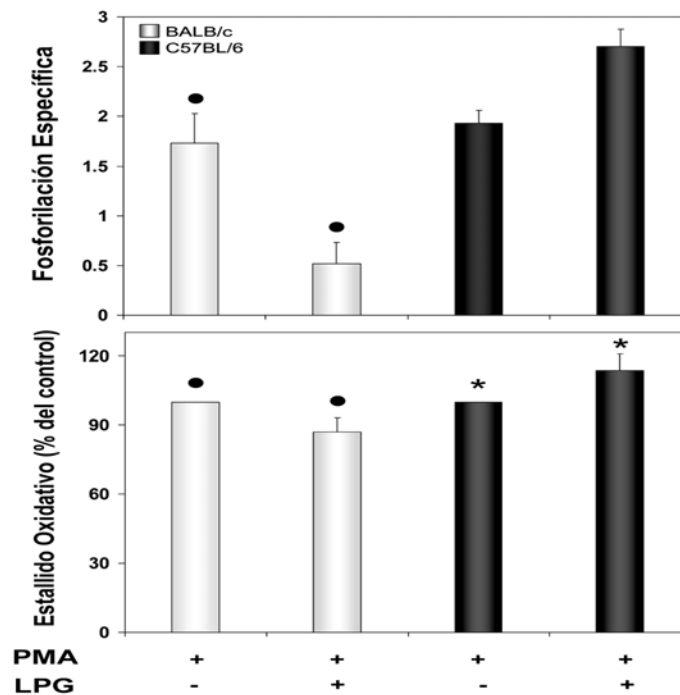


Figura 20. Correlación del efecto inducido por LPG en la fosforilación específica de la histona H1-IIIIE por PKC α y el estallido oxidativo en macrófagos de ratones BALB/c y C57BL/6. En los macrófagos de ratones BALB/c LPG inhibe la actividad enzimática de la PKC α estimulada con PMA ($P < 0.049$) al igual que el estallido oxidativo con PMA ($P < 0.036$). Mientras que en macrófagos de ratones C57BL/6, LPG aumenta la

actividad enzimática de la PKC α estimulada con PMA, al igual que en el estallido oxidativo cuando también es estimulado con PMA ($P < 0.016$). Los datos representan el promedio \pm error estándar de 3 experimentos independientes.

6.7 Análisis comparativo de la sobrevida intracelular de *Leishmania mexicana* con el grado de inhibición del estallido oxidativo en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57BL/6

Se analizó la efectividad leishmanicida del estallido oxidativo en macrófagos peritoneales de ambas cepas de ratones. Como se muestra en la Figura 21, encontramos que la estimulación del estallido oxidativo con PMA en los macrófagos de ratón BALB/c únicamente llevó a un 25 % de muerte de los parásitos intracelulares con una sobrevida del 75% (69,130 parásitos) en relación a la sobrevida encontrada en los macrófagos infectados que no fueron estimulados con PMA (91,016 parásitos que fueron tomados como control al 100%) ($P < 0.0021$). Por otro lado, el estallido oxidativo inducido por PMA en macrófagos de ratones C57BL/6 eliminó un 86 % de los parásitos intracelulares: una sobrevida solo del 14% (10,479 parásitos) en relación a la sobrevida encontrada en los macrófagos infectados que no fueron estimulados con PMA (75,020 parásitos que fueron tomados como control al 100%) ($P < 0.00015$).

Interesantemente, cuando el estallido oxidativo es inducido en presencia del inhibidor de PKC α (Gö6976), se observó que la sobrevida de *Leishmania* en ambas cepas de ratón fue similar 39% en BALB/c y 36% en C57BL/6, con respecto al control no estimulado con PMA.

En resumen, la intensa inhibición del estallido oxidativo en macrófagos de ratones BALB/c permitió una sobrevivencia significativamente mayor de *Leishmania* intracelular que la encontrada en ratones C57BL/6 ($P < 0.00015$), donde la inhibición del estallido fue menor.

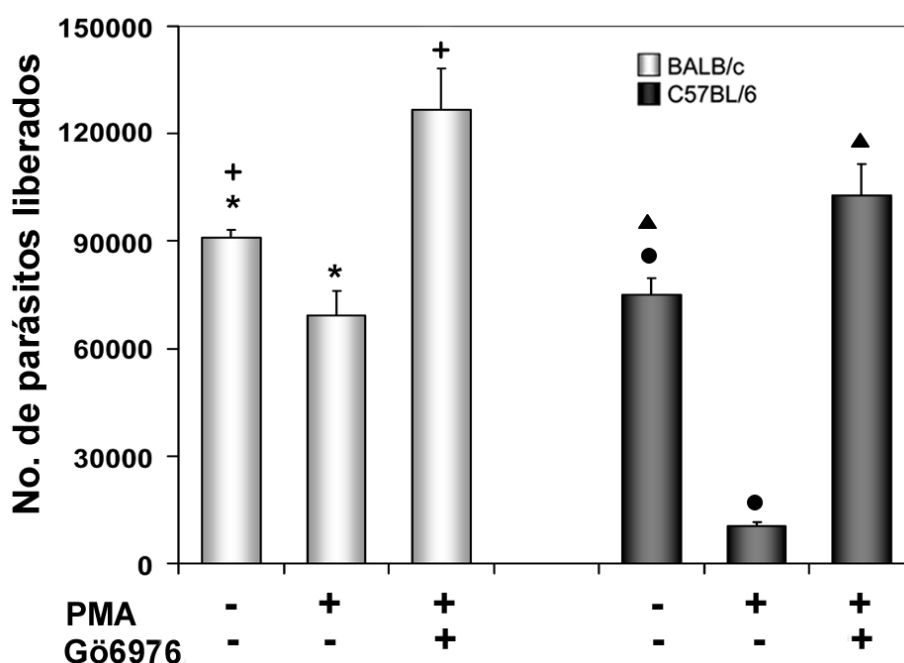


Figura 21. Correlación entre la sobrevivencia de *Leishmania mexicana* y el estallido oxidativo en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57BL/6 estimulados con PMA, en presencia o ausencia del inhibidor de PKC α (Gö6976). El panel izquierdo muestra la sobrevivencia del parásito en macrófagos de ratones BALB/c (75% de parásitos liberados) comparado con una baja sobrevivencia de parásitos en macrófagos de ratones C57BL/6 (14% de parásitos liberados) ($P < 0.00015$). El panel derecho muestra la sobrevivencia del parásito en presencia del inhibidor de PKC α . En ambas cepas de ratón la sobrevivencia es similar (39%) arriba del control en macrófagos de ratones en BALB/c y 36% arriba del control en macrófagos de ratones C57BL/6. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de 6 experimentos independientes.

7. DISCUSIÓN

El LPG es un glicosilinositolfosfolípido compuesto por regiones repetidas de disacáridos fosforilados adjunta a una región central de fosfosacáridos anclados por GPI, a través de la cual los promastigotes interactúan con el insecto vector y la célula hospedera del mamífero [66]. Hoy en día se usan dos métodos para extracción del LPG, el primero descrito por Orlandi y colaboradores [67] donde se usa el solvente E (H₂O, etanol, dietil eter, amoniaco concentrado y una cromatografía en columna de Sefadex 150-G) y el otro usado por McConville y colaboradores [57] (cromatografía de interacción hidrofóbica en columna de octil-Sepharose). Para el presente estudio se desarrolló una modificación en el método de McConville consistente en una recromatografía en una nueva columna de octil-Sepharose. El método desarrollado en este trabajo demostró tener dos ventajas, en primer lugar por el enriquecimiento del LPG así como por la eliminación de contaminantes (proteína, glicolípidos y carbohidratos) que no fueron eluidos por completo en la primera columna. Se sabe que uno de los primeros mecanismos de defensa del macrófago hacia las infecciones por *Leishmania* es la generación de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y la principal fuente generadora de estos metabolitos en el macrófago es la NADPH oxidasa, una enzima que cataliza la transferencia de electrones a partir del oxígeno molecular dando lugar a la producción de superóxido y de peróxido de hidrógeno. Se ha demostrado que los parásitos *Leishmania donovani* evitan la activación del estallido oxidativo por la inhibición de la actividad de PKC en los macrófagos [58, 68]. El LPG es esencial para infectar a los macrófagos a través de diversos mecanismos. Se ha demostrado que el LPG altera la organización de los lípidos en los microdominios en la membrana del fagosoma después de la fagocitosis, alterando la biogénesis del fagolisosoma. Además, el

LPG participa en la evasión de otros mecanismos inmunes como son: la acción de los metabolitos tóxicos de oxígeno, la modulación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la regulación en la activación de PKC, la cual es necesaria para el ensamblaje de la NADPH oxidasa, ya sea por la inducción de cambios estequiométricos en la PKC que afecta su afinidad al DAG y reduce así su actividad y/o alterando la propiedades físicas de la bicapa lipídica lo que dificulta la translocación de la PKC hacia la membrana, reduciendo así su actividad y evitando el consumo de oxígeno, resultando esto favorable para supervivencia y proliferación de *Leishmania* en el interior de los macrófagos [41, 58, 68-71].

Se ha encontrado que la PKC α es la isoforma que participa directamente en la generación de O_2^- y además, regula otras funciones de los macrófagos como la fagocitosis mediada a través de receptores Fc γ y la transducción de señales que conducen a la activación de ERK1/2 [56, 72, 73]. La PKC α está asociada con el fagosoma y una proteína de la familia de actina que es la Cinasa C Ricas en Alanina Mirestilada (MARKS) involucrada en la motilidad de la membrana. La fosforilación de MARKS dependiente de PKC α es necesaria para la unión del fagosoma-lisosoma. En la línea celular J774 se ha demostrado que la inhibición de la PKC α por LPG de *Leishmania donovani* conduce a la inhibición de la despolimerización de la F-actina evitando la formación del fagolisosoma, lo que permite la multiplicación del parásito y que se establezca la infección [33-35].

En este trabajo se analizó el efecto que ejerce LPG de *Leishmania mexicana* sobre la expresión y actividad enzimática de PKC α en macrófagos de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) y si este efecto se puede correlacionar con la susceptibilidad a la leishmaniasis.

Cuando analizamos por Western blot la expresión total de PKC α en macrófagos de médula ósea de ambas cepas de ratón, no encontramos diferencia entre los macrófagos de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6), cuando éstos fueron estimulados con LPG y el promastigote de *Leishmania mexicana*. Esto nos sugiere que la posible susceptibilidad o resistencia a la leishmaniasis no se podría correlacionar con un cambio en la expresión de PKC α inducido por LPG o *Leishmania mexicana* en alguna de estas dos cepas de ratón. Es importante señalar que tanto LPG como *Leishmania* juegan un papel muy importante en la redistribución parcial de PKC desde el citosol hacia la membrana celular como lo han señalado estudios hechos en líneas celulares y en macrófagos murinos [41, 45, 74].

Encontramos que LPG de *Leishmania mexicana* ejerce efectos opuestos sobre la actividad de PKC α en los macrófagos de las dos cepas de ratones utilizadas en este estudio: en los macrófagos de la cepa susceptible BALB/c LPG ejerce un efecto de inhibición en la actividad de PKC α , mientras que en los macrófagos de ratones resistentes C57BL/6 LPG ejerce un efecto de activación sobre PKC α .

La modulación que ejerce LPG sobre la actividad enzimática de PKC α está directamente correlacionada con la magnitud del estallido oxidativo y con la sobrevivencia intracelular del parásito. La inhibición en la actividad de PKC α de los macrófagos de ratones BALB/c está asociada con la reducción del estallido oxidativo, lo cual permite la sobrevivencia del parásito. En contraste, en macrófagos de ratones C57BL/6, LPG aumenta la actividad enzimática de PKC α , generando un buen estallido oxidativo y como consecuencia limita la sobrevivencia del parásito. Estos datos concuerdan con el estudio reportado por Ellermann-Eriksen y colaboradores, donde demostraron que en macrófagos de ratones resistentes (C57BL/6), la infección por el virus del herpes simple puede ser controlada por una buena generación del

estallido oxidativo, mientras que por lo contrario, en macrófagos de ratones BALB/c no se generó un buen estallido oxidativo, favoreciendo de esta manera la proliferación del virus [75]. Aunque aún no se ha demostrado que la actividad de PKC α puede variar entre diferentes cepas de ratones, se ha reportado que en la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, la bacteria puede inhibir selectivamente la expresión de PKC α en el macrófago, mientras que por lo contrario la cepa no patógena de *Mycobacterium smegmatis* incrementa la expresión y fosforilación de PKC α [76]. Otro estudio demuestra que la actividad enzimática de PKC γ puede tener respuestas opuestas en diferentes cepas de ratón, lo cual concuerda con nuestros datos [77].

Queda mucho por explorar acerca de la forma en que el fondo genético del hospedero es afectado por el LPG de *Leishmania*. Se sabe que la resistencia a la infección por patógenos intracelulares como *Mycobacterium*, *Salmonella* y *Leishmania* esta controlada genéticamente por el locus *Bcg*, *Ity* o *Lsh*, respectivamente [78]. Este gen se localiza en el cromosoma 1 del ratón y codifica la resistencia natural asociada a la proteína de macrófagos-1 (Nramp-1). Esta resistencia se ha descrito como la capacidad que tienen los Nramp 1 en transportar cationes divalentes (Fe^{2+}) al interior del endosoma-lisosoma mantenido un pH ácido. También favorece la expresión de la iNOS que es capaz de generar oxido nítrico, siendo estos mecanismos cruciales para determinar la resistencia a la leishmaniasis *in vivo* [79, 80].

En conjunto, nuestros datos muestran que las infecciones por *Leishmania mexicana* en macrófagos de ratones BALB/c conduce a la inhibición PKC α (Fig. 18B) y que la molécula responsable de esta inhibición es LPG de *Leishmania mexicana* (Fig. 18A). La inhibición de la PKC α conduce a la reducción del estallido oxidativo (Fig. 19A), lo que

permite la supervivencia del parásito (Fig. 21). En los macrófagos de ratones C57BL/6 se observa lo contrario. Las células infectadas con *Leishmania mexicana* muestran activación de PKC α (Fig. 18B), siendo esto confirmado cuando se incubó LPG con PKC α purificada (Fig. 18A). LPG activa a la PKC α lo que conduce a un mayor estallido oxidativo (Fig. 19A) y reduce la supervivencia del parásito (Fig. 21). Cabe destacar, que en contraste con el efecto que ejerce LPG, el parásito completo de *Leishmania mexicana* inhibe el estallido oxidativo en macrófagos de ratón C57BL/6, aunque en menor grado que la observada para los macrófagos de ratón BALB/c. Este efecto de inhibición en el estallido oxidativo ejercido por *Leishmania mexicana* podría relacionarse con una variedad de moléculas presentes en el parásito como la gp 63.

La importancia de PKC α en el control de parásitos se ve reforzada por el hecho de que el inhibidor específico de PKC α (Gö6976) disminuyó significativamente el estallido oxidativo en los macrófagos de ambas cepas de ratones, lo que permitió una mayor sobrevivencia del parásito en los macrófagos no sólo en ratones BALB/c, sino también en los macrófagos de la cepa C57BL/6, donde originalmente se observó que se podía limitar la sobrevivencia del parásito. Estos datos demuestran la importancia en la modulación de la PKC α por LPG de *Leishmania mexicana* en la regulación de la sobrevivencia del parásito dentro de los macrófagos.

Los diferentes efectos que ejerce LPG sobre PKC α de ambas cepas de ratones complementa el reporte sobre la inhibición de PKC aisladas de cerebro de rata por LPG de *Leishmania donovani*, donde se demostró que LPG es un inhibidor competitivo de la dioleína por el sitio de regulación C1 de la PKC [33].

En años más recientes se ha propuesto que en el dominio regulador de PKC α hay un sitio de unión de baja afinidad (C1A) y un sitio de unión de alta afinidad (C1B), y la activación de la PKC α por un activador que se une al sitio de baja afinidad promueve la unión alostérica de otro activador al segundo sitio de unión de alta afinidad, resultando en un mayor nivel de actividad [81, 82].

Asimismo, basándose en este modelo de activación de la PKC α , es tentador especular que LPG se une en el sitio de baja afinidad en la PKC α purificada de macrófagos de ratones C57BL/6, lo que permite la unión del PMA al sitio de alta afinidad, favoreciendo el incremento en la actividad enzimática. En cambio, el efecto contrario podría estar ocurriendo en la PKC α purificada de macrófagos de ratones BALB/c, donde LPG podría unirse al sitios de alta afinidad, evitando así la activación óptima del PMA lo que conduce a una activación reducida de la enzima. Estas posibles diferencias en la afinidad de LPG o PMA por el sitio de regulación (C1A o C1B) de la PKC α puede en parte explicar la diferencia de actividad encontrada en la PKC α aislada de macrófagos de ratones BALB/c y C57BL/6.

Será interesante analizar si existen diferencias en la actividad enzimática de PKC α presente en los macrófagos de pacientes con mayor susceptibilidad a la leishmaniasis y si estas alteraciones en la molécula pudieran ser responsables de una mayor susceptibilidad a la leishmaniasis progresiva observada en pacientes con leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

8. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos en este trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1- Tanto el LPG como el promastigote de *Leishmania mexicana* no modifican la presencia de la proteína de PKC α en los macrófagos de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6).
- 2- El efecto que ejerce LPG sobre la actividad enzimática de PKC α está directamente correlacionado con la magnitud del estallido oxidativo y la sobrevida intracelular del parásito.
- 3- La inhibición ejercida por LPG en la actividad enzimática de PKC α en los macrófagos de ratones BALB/c está asociada con la reducción del estallido oxidativo y por consiguiente el parásito de *Leishmania mexicana* tiene éxito en la sobrevida en el interior del macrófago.
- 4- En contraste, en macrófagos de ratones C57BL/6, LPG aumenta la actividad enzimática de PKC α , generando un buen estallido oxidativo y como consecuencia limita la sobrevida del parásito.
- 5- La susceptibilidad a *Leishmania mexicana* en el modelo murino muy posiblemente está relacionada con el efecto de inhibición que ejerce LPG sobre la actividad enzimática de PKC α .
- 6- Nuestros datos comparativos usando dos diferentes cepas de ratones contribuyen con información adicional sobre el papel que podría estar jugando LPG de *Leishmania mexicana* en la infectividad del parásito, demostrando que el fondo

genético del huésped determina el grado en el que LPG podría modular el estallido oxidativo, que es uno de los mecanismos leishmanicidas más importantes las células del huésped.

9. REFERENCIAS

1. Leishmaniasis. <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>. In.
2. Velasco C. O. La magnitud de una infección endémica, las leishmaniasis en la seroepidemiología en México. Publicación Técnica No 9. INDRE. Secretaria de Salud México; 1991.
3. International *Leishmania* Network. PAHO and the Brazilian Research Council. <http://www.bdf.fat.org.br/leishnet>.
4. Velasco C. O, Guzmán B. C, Rivas S. B. Las leishmaniasis. Con especial referencia a México. Publicación Técnica del INDRE. Secretaria de Salud México; 1994.
5. Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud. Epidemiología, Diagnóstico, Tratamiento y Control de la Leishmaniasis en América Latina. Taller Interamericano sobre la leishmaniasis en las Américas. In. Nicaragua; 1994.
6. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/sinave/index.htm>. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica.
7. Gaafar A, Fadl A, el Kadar AY, el Hassan MM, Kemp M, Ismail AI, Morgos SA, el Hassan AM. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* of different zymodemes in the Sudan and Saudi Arabia: a comparative study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 552-554.
8. Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 453-483.
9. Muskus CE, Marin Villa M. [Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica* 2002; 22: 167-177.
10. Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol* 2002; 28: 187-248.
11. Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455: 341-352.
12. Etges R, Bouvier J, Bordier C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem* 1986; 261: 9098-9101.
13. Cuevas IC, Cazzulo JJ, Sanchez DO. gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. *Infect Immun* 2003; 71: 5739-5749.

14. Ip HS, Orn A, Russell DG, Cross GA. *Leishmania mexicana mexicana* gp63 is a site-specific neutral endopeptidase. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 40: 163-172.
15. McGwire BS, O'Connell WA, Chang KP, Engman DM. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *J Biol Chem* 2002; 277: 8802-8809.
16. Olafson RW, Thomas JR, Ferguson MA, Dwek RA, Chaudhuri M, Chang KP, Rademacher TW. Structures of the N-linked oligosaccharides of Gp63, the major surface glycoprotein, from *Leishmania mexicana amazonensis*. *J Biol Chem* 1990; 265: 12240-12247.
17. Turco SJ, Sacks DL. Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 45: 91-99.
18. Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. The role of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9536-9541.
19. Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 1992; 46: 65-94.
20. McNeely TB, Turco SJ. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol* 1990; 144: 2745-2750.
21. Bogdan C, Gessner A, Solbach W, Rollinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 517-525.
22. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 845-858.
23. Muller I, Kropf P, Louis JA, Milon G. Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infect Immun* 1994; 62: 2575-2581.
24. Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 2004; 119: 238-258.
25. Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 2004; 5: 996-1002.
26. Laskay T, Rollinghoff M, Solbach W. Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2237-2241.

27. Moll H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today* 1993; 14: 383-387.
28. Auger MJ. The natural immune system. The macrophage. Oxford: IRL Press at Oxford University Press; 1992.
29. Speert D. The Natural immune system. The macrophage. Oxford: IRL Press at Oxford University Press; 1992.
30. Locksley RM, Klebanoff SJ. Oxygen-dependent microbicidal systems of phagocytes and host defense against intracellular protozoa. *J Cell Biochem* 1983; 22: 173-185.
31. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 2006.
32. Lundqvist H, Follin P, Khalfan L, Dahlgren C. Phorbol myristate acetate-induced NADPH oxidase activity in human neutrophils: only half the story has been told. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 270-279.
33. McNeely TB, Turco SJ. Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148: 653-657.
34. Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 1995; 270: 28495-28498.
35. Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986; 233: 305-312.
36. Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, Kawahara Y, Mori T, Nishizuka Y. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J Biol Chem* 1979; 254: 3692-3695.
37. Mosior M, Newton AC. Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids. *Biochemistry* 1996; 35: 1612-1623.
38. Grobler JA, Essen LO, Williams RL, Hurley JH. C2 domain conformational changes in phospholipase C-delta 1. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 788-795.
39. Kuo JF, Shoji M, Kiss Z, Girard PR, Deli E, Oishi K, Vogler WR. Protein kinase C in cell growth and differentiation. *Adv Exp Med Biol* 1989; 255: 8-20.
40. Dekker LV, Palmer RH, Parker PJ. The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Curr Opin Struct Biol* 1995; 5: 396-402.

41. Giorgione JR, Turco SJ, Epanand RM. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 11634-11639.
42. Miao L, Stafford A, Nir S, Turco SJ, Flanagan TD, Epanand RM. Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. Biochemistry 1995; 34: 4676-4683.
43. Rosen G, Pahlsson P, Londner MV, Westerman ME, Nilsson B. Structural analysis of glycosyl-phosphatidylinositol antigens of *Leishmania major*. J Biol Chem 1989; 264: 10457-10463.
44. Holm A, Tejle K, Magnusson KE, Descoteaux A, Rasmusson B. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC alpha and defective phagosome maturation. Cell Microbiol 2001; 3: 439-447.
45. Pingel S, Wang ZE, Locksley RM. Distribution of protein kinase C isoforms after infection of macrophages with *Leishmania major*. Infect Immun 1998; 66: 1795-1799.
46. Bhattacharyya S, Ghosh S, Sen P, Roy S, Majumdar S. Selective impairment of protein kinase C isotypes in murine macrophage by *Leishmania donovani*. Mol Cell Biochem 2001; 216: 47-57.
47. Chawla M, Vishwakarma RA. Alkylacylglycerolipid domain of GPI molecules of *Leishmania* is responsible for inhibition of PKC-mediated c-fos expression. J Lipid Res 2003; 44: 594-600.
48. Sacks DL, Melby PC. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. Curr Protoc Immunol 2001; Chapter 19: Unit 19 12.
49. Rosas LE, Keiser T, Barbi J, Satoskar AA, Septer A, Kaczmarek J, Lezama-Davila CM, Satoskar AR. Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. Int Immunol 2005; 17: 1347-1357.
50. Aguilar Torrentera F, Lambot MA, Laman JD, Van Meurs M, Kiss R, Noel JC, Carlier Y. Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. Am J Trop Med Hyg 2002; 66: 273-279.
51. Schwartz E, Hatz C, Blum J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. Lancet Infect Dis 2006; 6: 342-349.

52. Brandonisio O, Panaro MA, Marzio R, Marangi A, Faliero SM, Jirillo E. Impairment of the human phagocyte oxidative responses caused by *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG): in vitro studies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994; 8: 57-62.
53. Murray HW. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Immunol* 1982; 129: 351-357.
54. Murray HW, Cartelli DM. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J Clin Invest* 1983; 72: 32-44.
55. Haidaris CG, Bonventre PF. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania donovani* tissue forms by activated macrophages. *J Immunol* 1982; 129: 850-855.
56. Li Q, Subbulakshmi V, Fields AP, Murray NR, Cathcart MK. Protein kinase calpha regulates human monocyte O-2 production and low density lipoprotein lipid oxidation. *J Biol Chem* 1999; 274: 3764-3771.
57. McConville MJ, Bacic A, Mitchell GF, Handman E. Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 8941-8945.
58. Descoteaux A, Matlashewski G, Turco SJ. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol* 1992; 149: 3008-3015.
59. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
60. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
61. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
62. Robles-Flores M, Alcantara-Hernandez R, Garcia-Sainz JA. Differences in phorbol ester-induced decrease of the activity of protein kinase C isozymes in rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1094: 77-84.
63. Rendon-Huerta E, Mendoza-Hernandez G, Robles-Flores M. Characterization of calreticulin as a protein interacting with protein kinase C. *Biochem J* 1999; 344 Pt 2: 469-475.

64. Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marme D, Schachtele C. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem* 1993; 268: 9194-9197.
65. Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, Moll H, Gillitzer R, Perez-Torres A, Perez-Montfort R, Delgado D, Velasco-Castrejon O, Crippa M, Becker I. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Int Health* 1999; 4: 801-811.
66. Davies CR, Cooper AM, Peacock C, Lane RP, Blackwell JM. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* 1990; 101 Pt 3: 337-343.
67. Orlandi PA, Jr., Turco SJ. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 1987; 262: 10384-10391.
68. Dermine JF, Goyette G, Houde M, Turco SJ, Desjardins M. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol* 2005; 7: 1263-1270.
69. Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* 1997; 185: 2061-2068.
70. Lodge R, Descoteaux A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol* 2005; 114: 256-265.
71. Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 2002; 3: 1041-1047.
72. Breton A, Descoteaux A. Protein kinase C- α participates in Fc γ R-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 472-476.
73. St-Denis A, Chano F, Tremblay P, St-Pierre Y, Descoteaux A. Protein kinase C- α modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 1998; 273: 32787-32792.
74. Bhattacharyya S, Ghosh S, Jhonson PL, Bhattacharya SK, Majumdar S. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. *Infect Immun* 2001; 69: 1499-1507.
75. Ellermann-Eriksen S, Sommerlund M, Mogensen SC. Differential sensitivity of macrophages from herpes simplex virus-resistant and -susceptible mice to respiratory burst priming by interferon- α /beta. *J Gen Virol* 1989; 70 (Pt 8): 2139-2147.

76. Chaurasiya SK, Srivastava KK. Differential regulation of protein kinase C isoforms of macrophages by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Mol Cell Biochem* 2008; 318: 167-174.
77. Bowers BJ, Christensen SC, Pauley JR, Paylor R, Yuva L, Dunbar SE, Wehner JM. Protein and molecular characterization of hippocampal protein kinase C in C57BL/6 and DBA/2 mice. *J Neurochem* 1995; 64: 2737-2746.
78. Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 1993; 73: 469-485.
79. Blackwell JM, Goswami T, Evans CA, Sibthorpe D, Papo N, White JK, Searle S, Miller EN, Peacock CS, Mohammed H, Ibrahim M. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. *Cell Microbiol* 2001; 3: 773-784.
80. Moisan J, Thuraisingam T, Henault J, De Sanctis J, Radzioch D. Role of SLC11A1 (formerly NRAMP1) in regulation of signal transduction induced by Toll-like receptor 7 ligands. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47: 138-147.
81. Slater SJ, Ho C, Kelly MB, Larkin JD, Taddeo FJ, Yeager MD, Stubbs CD. Protein kinase Calpha contains two activator binding sites that bind phorbol esters and diacylglycerols with opposite affinities. *J Biol Chem* 1996; 271: 4627-4631.
82. Slater SJ, Seiz JL, Cook AC, Buzas CJ, Malinowski SA, Kershner JL, Stagliano BA, Stubbs CD. Regulation of PKC alpha activity by C1-C2 domain interactions. *J Biol Chem* 2002; 277: 15277-15285.

ANEXOS

Date: Thu, 21 Jan 2010 12:15:04 -0500 (EST)
From: emmamissen@msn.com
Reply-To: emmamissen@msn.com
Subject: Parasite Immunology PIM-2009-0017.R3
To: becker@servidor.unam.mx,becker_ingeborg@yahoo.com

Dear Dr Becker

PIM-2009-0017.R3 *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan (LPG) differentially regulates PKC δ -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice

Thank you for submitting this paper to Parasite Immunology.

I am pleased to say that your paper has now been accepted for publication.

Online Open is a pay-to-publish service from Wiley-Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via the Wiley InterScience website. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of \$3000 to be met by or on behalf of the author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via the Wiley InterScience service.

If you wish your paper to be OnlineOpen you are required to complete both the Copyright Transfer Agreement form and the payment form below:

<http://media.wiley.com/assets/1540/86/ctaaglobal.pdf>

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/OOF_PIM.pdf

If you do not wish your paper to be OnlineOpen, you are required to complete only the Copyright Transfer Agreement.

Papers cannot be published until the completed Copyright Transfer Agreement has been received. Once completed the form(s) should be returned by email if at all possible.

Alternatively, they could be faxed to:

+44 (0)1865 714 591 (clearly marked "For the attention of Emma Missen c/o Michael Willis)

If you are unable to do either of the above, please post the form(s) to:

Mrs Emma Missen
Parasite Immunology
6 Ardleigh Gardens
Hutton
Brentwood
Essex CM13 1QR
UK

Leishmania mexicana lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice

J. DELGADO-DOMÍNGUEZ,¹ H. GONZÁLEZ-AGUILAR,² M. AGUIRRE-GARCÍA,¹ L. GUTIÉRREZ-KOBEH,¹ M. BERZUNZA-CRUZ,¹ A. RUIZ-REMIGIO,¹ M. ROBLES-FLORES² & I. BECKER¹

¹Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Colonia Doctores, México D.F., México, ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

SUMMARY

Leishmania are protozoan parasites that infect macrophages and their survival is partially achieved through inhibition of the cellular oxidative burst by parasite lipophosphoglycan (LPG). PKC α is the predominant PKC isoenzyme required for macrophage oxidative burst, yet it is not known if differential susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to *Leishmania mexicana* could be related to PKC α . We analysed the effect of *L. mexicana* promastigotes and parasite LPG on expression of PKC α and on its activity in macrophages of both mouse strains. Our data show that expression of the isoenzyme was not altered either by LPG or by *L. mexicana* promastigotes. Yet LPG exerted opposing effects on PKC α activity of macrophages between both strains: in susceptible BALB/c cells, it inhibited PKC α activity, whereas in the more resistant strain it augmented enzymatic activity 2–8 times. In addition, LPG inhibited oxidative burst only in susceptible BALB/c macrophages and the degree of inhibition correlated with parasite survival. Promastigotes also inhibited PKC α activity and oxidative burst in macrophages of BALB/c mice, whereas in C57BL/6, they enhanced PKC α activity and oxidative burst inhibition was less severe. Our data indicate that control of PKC α -induced oxidative burst by *L. mexicana* LPG relates with its success to infect murine macrophages.

Keywords *Leishmania mexicana*, LPG, oxidative burst, PKC-alpha

INTRODUCTION

Leishmania parasites are the causal agents of leishmaniasis, which is transmitted to mammals, including human beings, by phlebotomine sand flies. Depending upon host immune response and parasite species, leishmaniasis is characterized by a wide spectrum of clinical manifestations. In Mexico, *Leishmania mexicana* is the causative agent of two forms of cutaneous leishmaniasis: localized cutaneous leishmaniasis (LCL), characterized by ulcerative skin lesions that develop at the site of the bite of the sand fly, and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), which consists of multiple nonulcerative nodules that spread throughout the skin, leading to severe mutilation because of the invasion of naso- and oropharyngeal mucosae. In murine models infected with *L. mexicana*, it has been shown that BALB/c mice are significantly more susceptible and develop larger dermal lesions as compared with C57BL/6 mice (1–3). In murine and human macrophages, it has been established that the respiratory burst of the cell with generation of reactive oxygen intermediates (ROI), such as H₂O₂ and O₂⁻, is largely responsible for parasite control, as these molecules have been reported to be fatal for *Leishmania* promastigotes (4–8). Another toxic molecule for the parasite is nitric oxide (NO), which is generated by macrophages stimulated by cytokines, such as TNF- α and IFN- γ (9,10).

Respiratory burst activity and NO production are regulated by phosphorylation events mediated by protein kinase C (PKC), a family of serine/threonine kinases comprising at least 13 different members (11). The mammalian PKC superfamily is subdivided into three subfamilies on the basis of their structural differences and related

Correspondence: Ingeborg Becker, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Dr. Balmis 148, Colonia Doctores, 06726, México D.F., México (e-mail: becker@servidor.unam.mx).
Disclosures: None of the authors has potential conflicts of interest.
Received: 22 February 2009
Accepted for publication: 21 January 2010

cofactor requirements: cPKC (classical PKC) isoforms (α , β I, β II and γ), which respond both to Ca^{2+} and diacylglycerol (DAG); novel PKC (nPKC) isoforms (δ , ϵ , θ and η), which are insensitive to Ca^{2+} , but dependent on DAG and atypical PKCs (aPKCs, ν/λ , ζ), which are nonresponsive to the co-factors, but may be activated by other lipids and by protein–protein interactions. Macrophages and monocytic cells express the Ca^{2+} -dependent and DAG-dependent isoenzymes α , β I, and β II, the Ca^{2+} -independent isoenzymes δ and ϵ and the atypical isoenzyme ζ (12,13). Among the isoenzymes that are related to macrophage defence functions are PKC α , which has been shown to be the predominant isoenzyme required for the O_2^- production (14), whereas PKC β is related to cell chemotaxis (15,16). It has been shown that PKC β can be regulated by C-C chemokines (17). It has been reported that *Leishmania donovani* parasites, as well as *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG), which is the most abundant glycoconjugate on the parasite surface, can impair signal transduction mediated by PKC in macrophages, thereby increasing intracellular survival of the parasites (18–21). Until now, a comparative study encompassing the expression and activity of different PKC isotypes in leishmaniasis has not been explored. Thus, it is not clear if the susceptibility observed in BALB/c and the higher degree of resistance in C57BL/6 mice are possibly related to PKC α activity and to what degree the promastigotes and LPG of *L. mexicana* modulate the activity of this isoenzyme contributing to define the disease outcome. In the present work, we analysed the effect of *L. mexicana* promastigotes and of purified LPG on PKC α activity of peritoneal macrophages obtained from susceptible BALB/c and more the resistant mouse strain C57BL/6 and correlated the results with the oxidative burst and parasite survival measured in macrophages of both mouse strains.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male C57BL/6 and BALB/c mice were purchased from Harlan Laboratory (Mexico City, Mexico) and raised at the animal facility of the Departamento de Medicina Experimental following the national guidelines for animal care. The animals were handled according to the guidelines established by the ethical committee of the Medical School of the UNAM.

Parasites

Leishmania: Promastigotes of *L. mexicana* strain MHO-M/92/UADY68 promastigotes were grown in RPMI-1640

medium (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, USA), supplemented with 5% heat-inactivated FBS at 28°C.

Lipophosphoglycan purification

Lipophosphoglycan was purified from *L. mexicana* as previously described (22). Briefly, parasites were subcultured every 4–5 days and grown to a density of 2×10^7 /mL. Promastigotes were harvested from stationary-phase cultures, centrifuged at $3200 \times g$ for 10 min, washed three times in PBS, and finally counted after immobilization with glutaraldehyde (0.1%). The supernatant was removed and the pellet was extracted with chloroform/methanol/water (4 : 8 : 3, v/v) for 30 min at room temperature. The insoluble material was used for LPG extraction with 9% 1-butanol in water (2×50 mL) and the pooled supernatants were vacuum-dried. LPG was purified from this fraction by HPLC using an octyl-sepharose column and a 1-propanol gradient (5–60%) in 0.1 M ammonium acetate. Two octyl-sepharose columns were used to optimize LPG purity. The preparations were negative for the presence of endotoxin using the *Limulus* sp. amoebocyte lysate assay (E-Toxate Kit; Sigma, St. Louis, MO, USA). A sample was analysed for protein contaminants by SDS–PAGE followed by silver staining. The preparation was devoid of protein contaminants.

Bone marrow-derived macrophages (BMM ϕ)

Bone marrow-derived macrophages cells from male BALB/c or C57BL/6 mice were prepared as described previously (23). Briefly, bone marrow was flushed from the femurs and tibias from mice and 7.5×10^6 cells were plated in Petri dishes (100 \times 15 mm) (bacteriological) in 10 mL of complete medium [Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 100 IU/mL penicillin, 100 IU/mL streptomycin, 10 mM HEPES, and 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS)] and with 30% (v/v) L-cell conditioned medium obtained from the supernatant of M-CSF-secreting L929 fibroblasts (LCM), cultured at 37°C and 5% CO_2 . On day 7, adherent cells were removed with ice-cold PBS and detached with a cell scraper. Cells were then washed and suspended in complete medium at a concentration of 1.5×10^6 cells/mL and cultured for 24 h in tissue culture dishes. Purity was analysed by FACS using F4/80 (BD, Pharmingen).

Peritoneal cells

Peritoneal macrophages were collected from both groups of mice, which had previously been sacrificed by cervical

dislocation. The peritoneal cavity was infused with 8–10 mL of ice-cold sterile PBS pH 7.4. Peritoneal fluid was withdrawn through the abdominal wall with a 19-gauge needle. Peritoneal fluids from three mice were pooled, washed with ice-cold phosphate buffered saline and centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4°C. Peritoneal cells were cultured for 18–24 h (for adherence) in RPMI 1640 (supplemented with 100 IU/mL of penicillin and 100 IU/mL of streptomycin) containing 10% (v/v) heat-inactivated FBS (RPMI-FBS) at 37°C with 5% CO₂ in tissue culture Petri dishes of 100 × 15 mm in diameter (BD Falcon). For experiments, 1×10^6 macrophages were cultured in 1 mL of RPMI-FBS in 24-well treated tissue culture plates (Corning Incorporated, NY, USA). For the oxidative burst analysis, macrophages were maintained on ultra low cluster plates (Corning). Purity was analysed by FACS using F4/80 (BD, Pharmingen).

Western blot analysis

Bone marrow-derived macrophages (5×10^6) obtained from BALB/c and C57BL/6 mice were cultured overnight at 37°C with 5% CO₂ and infected with 50×10^6 *L. mexicana* promastigotes during 2 h at room temperature (RT) or stimulated with 10 µg/mL LPG (per 1×10^6 cells) during 2 h at RT. Infected macrophages were washed with PBS to eliminate nonphagocytized promastigotes and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24 h. Non-stimulated BMMφ were used as controls. Cells were washed with PBS and suspended in 1 mL ice-cold buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 50 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mg/mL trypsin inhibitor). For cell lysis, the suspension of macrophages was frozen at -70°C for 10 min and sonicated during 10 min. This procedure was repeated three times and lysates were centrifuged at $20\,000 \times g$ during 20 min at 4°C. Protein concentration was determined in the supernatants by the Bradford assay. Forty micrograms of proteins was boiled in Laemmli buffer during 5 min, resolved with 10% SDS-PAGE in Tris/glycine/SDS buffer (25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1% SDS) (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Millipore, Billerica, MA, USA) with 0.3 mA/cm² for 90 min, at RT. The membrane was blocked for 1 h with TBST (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20) with 5% skim milk (w/v) at RT and washed five times in TBST. The membrane was immunoblotted with monoclonal mouse antibodies against PKCα (sc8393, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; dilution 1 : 1000) or actin (Santa Cruz Biotechnology; dilution 1 : 2000) overnight at 4°C. After washing four times with TBST,

membranes were incubated with secondary goat-anti mouse alkaline phosphatase conjugated antibody (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA; dilution 1 : 5000) during 1 h at RT. Finally, the membranes were stained using nitro blue tetrazolium and bromo-chloroindoleyl phosphate (24).

Partial purification of protein kinase C

Protein kinase C was purified as described previously (25). In brief, BMMφ were homogenized in ice-cold buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.5% (v/v) Triton X-100, 50 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin, 0.1 mg/mL trypsin inhibitor). The suspension was frozen at -70°C during 10 min, sonicated three times during 10 min and centrifuged at $20\,000 \times g$ during 10 min. The supernatant was loaded onto DEAE-cellulose columns that had been equilibrated with column buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM 2-mercaptoethanol) at 4°C. After the column had been washed with column buffer, total PKC was eluted with column buffer containing 0.08 M NaCl, 2 mM EDTA and 0.1 mg/mL trypsin inhibitor. The eluate was concentrated in an Amicon device (YM-30 membrane) and PKCα was immunoprecipitated for the kinase assays. PKC was also purified from infected BMMφ (5×10^6) obtained from BALB/c and C57BL/6 mice. In these cases, the BMMφ were previously infected with 50×10^6 *L. mexicana* promastigotes during 2 h at RT and noninfected BMMφ were used as controls.

PKCα activity assay

PKCα activity was determined as described previously (26). In brief, 1 mL aliquots of partially purified and concentrated PKC (1 mg/mL) was incubated at 4°C with 1 µg/mL anti-PKCα antibody (Santa Cruz Biotechnology) for 2 h with gentle shaking in the presence of phosphatase inhibitors (10 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 11 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate and 0.2 mg/mL phosphoserine), in the absence of 2-mercaptoethanol. Then, 20 µL of Protein A-Sepharose [30% (w/v), Calbiochem, San Diego, CA, USA] were added and incubated for 2 h at 4°C. Immune complexes were then washed five times with buffer [50 mM Tris-HCl, 0.6 M NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (v/v) GPAL] containing phosphatase inhibitors and once with kinase buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 50 mM 2-mercaptoethanol). Kinase activity was analysed in immunoprecipitates incubated with the following: (i) phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) 1×10^{-6} M; (ii) LPG 10 µg; (iii) PMA 1×10^{-6} M combined with LPG 10 µg

and (iv) Bisindolymaleimide 1 (BIM-1) 1×10^{-6} M. PKC α kinase activity was also analysed in BMM ϕ obtained from *L. mexicana*-infected and noninfected mice of both strains. The incubations were performed in 50 μ L of assay mixture, consisting of kinase buffer plus 20 μ g/mL phosphatidylserine, 0.8 μ g/mL 1,2-diolein, 10 μ M [γ - 32 P]ATP (6000 Ci/mmol, Perkin-Elmer) and 200 μ g/mL of protein substrate (histone H1-IIIIS; SIGMA) during 20 min at 30°C. The reactions were terminated by adding 50 μ L of SDS-PAGE sample buffer, boiled for 5 min and analysed by SDS-PAGE [12.5% (w/v) gel] and autoradiography (24 h). Data were quantified by densitometric analysis (Biorad, Quantity One Analysis Software) performed both in Coomassie-stained gels and the corresponding autoradiographies. The ratio of 32 P-labelled protein/dyed protein represents the total specific phosphorylation.

Oxidative burst

The respiratory burst of mouse peritoneal macrophages was studied by luminol-dependent chemiluminescence, triggered by PMA, as described previously (27). In brief, for the ROI production assay, peritoneal cells were centrifuged at $290 \times g$ and 1×10^6 cells per assay were seeded into sterile luminometer cuvettes. ROI production was measured by chemiluminescence (CL) in the presence of 60 μ M luminol (Eastman-Kodak, Rochester, NY, USA), using a thermostatically (25°C) controlled luminometer (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems, Finland). Chemiluminescence in peritoneal macrophages was triggered with 5×10^{-4} M PMA and was continuously monitored throughout 30 min. The assays were performed in the presence or absence of *L. mexicana* parasites, at a parasite-cell ratio of 10 : 1, with 10 μ g LPG or with 2.3 nM Gö6976 (12-(2-Cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo(2,3-a)pyrrolo(3,4-c)-carbazol), (Calbiochem), a specific PKC α inhibitor (28). The maximum value obtained during the 30 min assay was registered in each experiment. The per cent of inhibition of the oxidative burst was calculated using the following equation: % inhibition = $(1 - x) \times 100$, where x is the ratio of the mV obtained for macrophages in the presence of *L. mexicana* promastigotes, with LPG or with Gö6976, divided by the mV obtained for macrophages in the absence of stimuli.

Survival of intracellular parasites

The intracellular survival of parasites was analysed as described previously (29). Briefly, peritoneal macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice were plated into four-well Lab-Tek Chamber Slides (Nunc, Naperville, IL, USA)

and infected with stationary-phase *L. mexicana* promastigotes at a parasite-cell ratio of 10 : 1 in culture medium (RPMI 1640 supplemented with 100 IU/mL penicillin, 100 IU/mL streptomycin, 10 mM HEPES) at 28°C for 2 h. Unbound parasites were removed with four washes of PBS at RT. Infected cells were then incubated in culture medium in the presence or absence of 2.3 nM Gö6976, at 37°C and 5% CO $_2$ during 24 h. Afterwards, oxidative burst was induced in macrophages with 5×10^{-4} M PMA during 30 min at 37°C. To detect intracellular parasites that had survived the oxidative burst, macrophages were washed three times with PBS and the cells were then incubated with fresh medium at 37°C and 5% CO $_2$ during 24 h. After this period, the slides with infected macrophages were dried, fixed in absolute methanol and stained with Giemsa stain. We determined the survival of intracellular parasites by microscopic analysis (AxioImager M1, Zeiss, Germany) by counting the total number of intracellular parasites in 100 infected macrophages per slide. Parasite survival in nonstimulated cells was used as control. The percentage of parasite survival was calculated in relation to those surviving in nonstimulated macrophages.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM (standard error of the mean). Statistical evaluation of the data was performed using the Mann-Whitney *U*-test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Western blot analysis of PKC α expression in BALB/c and C57BL/6 BMM ϕ stimulated with *Leishmania mexicana* promastigotes or with LPG

The effect of LPG (10 μ g/mL) or *L. mexicana* promastigotes (parasite: cell ratio of 10 : 1) on the expression of PKC α of BMM ϕ was examined using immunoblots. The analysis revealed that there were no changes in the expression of PKC α in BMM ϕ obtained from C57BL/6 or from BALB/c mice after stimulation with LPG or with *L. mexicana* promastigotes (Figure 1). Purity of BMM ϕ was 95% (data not shown).

Analysis of PKC α activity

To examine possible differences in PKC α activity between BALB/c and C57BL/6 BMM ϕ , we used partially purified immune complexes specific for PKC α to measure their capacity to phosphorylate histone H1 IIIIS, a typical PKC

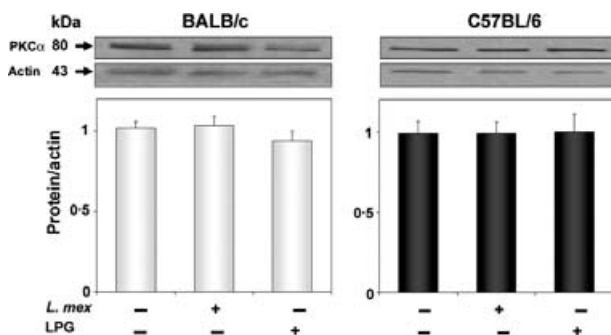


Figure 1 Western blot analysis of PKC α expression in BMM ϕ of BALB/c and C57BL/6 mice. PKC α is detected as an 80 kDa band. The densitometric analysis of the PKC α expression was performed in basal conditions as well as stimulated with 10 μ g/mL LPG or infected with *Leishmania mexicana* promastigotes during 2 h (in a 10 : 1 parasite: cell ratio). Cells were incubated with anti-PKC α or anti-actin antibodies overnight at 4°C. Following four washings with TBST, membranes were incubated with secondary antibody during 1 h at RT. Densitometric evaluations shown in graph bars are mean \pm SEM of three independent experiments.

substrate. The assay was performed in the absence or presence of the following agents: LPG (10 μ g/mL), PMA (a potent PKC activator) and BIM-1 (potent and selective PKC inhibitor). We found that in BALB/c mice, LPG significantly inhibited PKC α activity, producing a 2.85-fold decrease when compared with control values ($P < 0.0369$). When LPG was incubated simultaneously with PMA, the degree of inhibition induced by LPG was less striking (1.9-fold decrease), in comparison with control values. As expected, an almost total inhibition of PKC α activity was achieved with PKC inhibitor BIM-1. In marked contrast, we found that LPG induced the opposite effect on PKC α activity of C57BL/6 BMM ϕ , where it significantly enhanced the phosphorylation of histone H1 IIIS (2.8-fold increase) ($P < 0.0369$), as compared with the control. The enhanced phosphorylation was comparable with that achieved by stimulation with PMA. As observed for PKC α from BALB/c BMM ϕ , the PKC inhibitor BIM-1 also completely inhibited the activity of PKC α obtained from BMM ϕ of C57BL/6 mice (Figure 2a).

We also found that in BMM ϕ of BALB/c mice infected with *L. mexicana*, the PKC α activity decreased 1.85-fold, when compared with the activity of noninfected controls ($P < 0.036$). In contrast, PKC α obtained from C57BL/6 macrophages infected with *L. mexicana*, showed a 2-fold increase over the controls ($P < 0.033$) (Figure 2b). All these data show a clear difference in the modulation of PKC α activity between PKC α purified from BALB/c and C57BL/6 mice in the presence of live promastigotes or purified LPG.

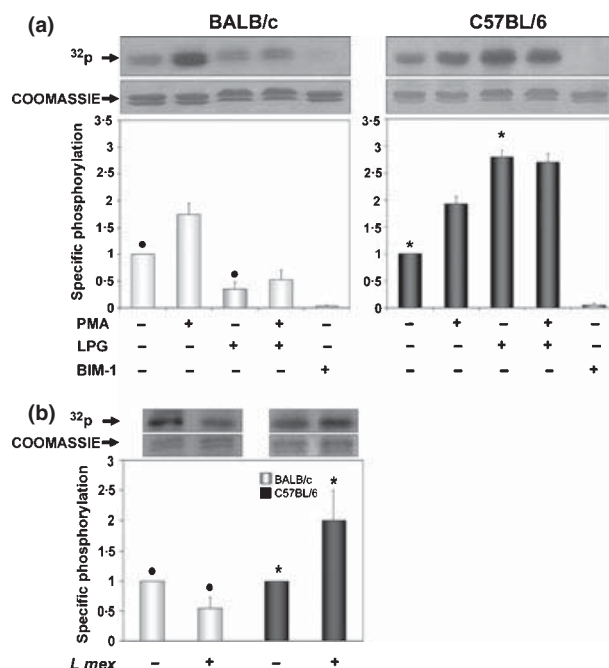


Figure 2 Effect of LPG and *Leishmania mexicana* promastigotes on PKC α activity *in vitro* using histone H1-IIIS as substrate. The panel shows the histone H1-IIIS autoradiograph (32 P) and Coomassie blue-stained gel. (a) Specific phosphorylation of histone H1-IIIS by PKC α from BALB/c and C57BL/6 BMM ϕ stimulated with PMA 1×10^{-6} M, LPG 10 μ g, PMA 1×10^{-6} M together with LPG 10 μ g, or with BIM-1, is shown. (b) Specific phosphorylation of histone H1-IIIS by PKC α obtained from *L. mexicana*-infected and noninfected BMM ϕ of BALB/c and C57BL/6 mouse strains. Densitometric evaluations shown in graph bars are mean \pm SEM from three independent experiments (●, * indicates statistically significant differences from nonstimulated controls).

Effect of LPG and *Leishmania mexicana* promastigotes on the oxidative burst of peritoneal macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice

It has been reported that PKC α is a predominant PKC isoenzyme required for the oxidative burst in macrophages (14). We next analysed the effect of LPG on the oxidative burst induced by PMA on peritoneal macrophages of both mouse strains in the presence or absence of the PKC α inhibitor Gö6976. We found that LPG induced opposing effects on the PMA-induced oxidative burst of macrophages from both mouse strains. Whereas in macrophages of BALB/c mice, LPG inhibited the oxidative burst by 11.33%, compared with control values ($P < 0.002$), in C57BL/6 macrophages, LPG enhanced the oxidative burst by 13.7% ($P < 0.017$) over the controls not incubated with LPG. When the macrophages were pre-incubated with the PKC α inhibitor Gö6976, either alone or in combination with LPG, the oxidative burst of macrophages of both

mouse strains was inhibited in relation to the macrophages in the absence of Gö6976, albeit the degree of inhibition was higher in the BALB/c macrophages ($P < 0.002$) (Figure 3a).

We also analysed the effect of *L. mexicana* promastigotes on the PMA-induced oxidative burst of peritoneal

macrophages obtained from both mouse strains. The assay was performed in the absence or presence of the PKC α inhibitor Gö6976. *L. mexicana* promastigotes significantly diminished the oxidative burst induced by PMA on macrophages of both mouse strains, yet the degree of inhibition was significantly higher in BALB/c macrophages (46.4%, $P < 0.002$) than in C57BL/6 macrophages (19.4% $P < 0.00013$) as compared with controls not incubated with the parasite. In the presence of Gö6976, the degree of inhibition exerted by *L. mexicana* promastigotes on the oxidative burst of BALB/c macrophages was similar to that achieved without Gö6976. In C57BL/6 macrophages, Gö6976 was able to increase the degree of inhibition of the oxidative burst exerted by *L. mexicana* promastigotes, as compared with the oxidative burst in the absence of Gö6976 ($P < 0.00013$) (Figure 3b). The purity of peritoneal macrophages ranged between 80% and 85% (data not shown).

The levels of oxidative burst in cells not stimulated by PMA, but treated only with LPG or *L. mexicana* promastigotes, were also measured. In both cases, the levels of oxidative burst were below the detection level of the apparatus.

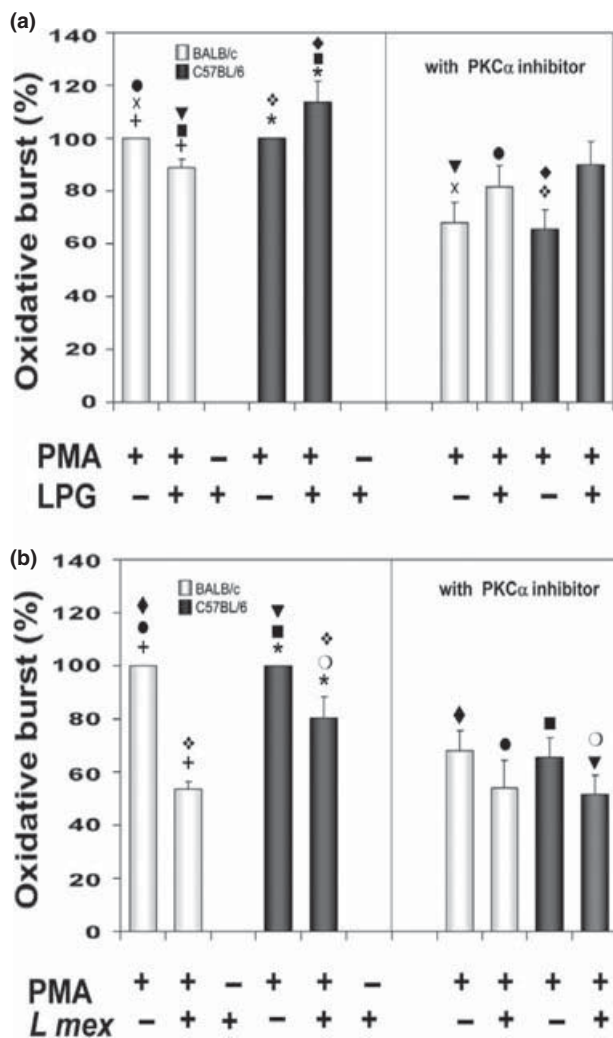


Figure 3 Effect of LPG and *Leishmania mexicana* promastigotes on the oxidative burst of peritoneal macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. The oxidative burst was induced by PMA and ROI production was measured by CL in the presence of luminal during 30 min at 25°C, where the maximum value was registered. Levels of oxidative burst in cells not stimulated by PMA, but treated only with LPG or parasites were also measured. (a) Oxidative burst of BALB/c and C57BL/6 macrophages in the presence of 10 μ g of LPG with or without the PKC α inhibitor Gö6976. (b) Oxidative burst of macrophages of both mouse strains in the presence of *L. mexicana* promastigotes with or without Gö6976. The data shown are mean \pm SEM of six independent experiments (symbols indicate statistically significant differences).

Effect of PKC α inhibition on the survival of *Leishmania mexicana* parasites within peritoneal macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice

To determine a possible correlation between PKC α activity and the effectiveness of burst oxidation with the intracellular survival of the parasite, peritoneal macrophages from both mouse strains were infected with *L. mexicana* promastigotes. The oxidative burst was then induced by PMA and the parasite survival was analysed. Results show that in C57BL/6 macrophages stimulated with PMA, only 66% (259 parasites/100 macrophages) of the parasites survived as compared with parasite survival in macrophages not stimulated with PMA (390 parasites/100 macrophages). In contrast, 92% (280 parasites/100 macrophages) survived in BALB/c macrophages as compared with parasite survival in nonstimulated macrophages (304 parasites/100 macrophages). When the burst oxidation was induced with PMA in the presence of PKC α inhibitor (Gö6976), the parasite growth in macrophages from both mouse strains increased above the nonstimulated control: 33% (405 parasites/100 macrophages) in BALB/c and 7% (419 parasites/100 macrophages) in C57BL/6 (Figure 4).

The data indicate that LPG and *L. mexicana* parasites exert opposing effects on PKC α activity of susceptible and resistant mouse macrophages, which correlate with the magnitude of burst oxidation and with the survival of the parasites within macrophages. Taken together, our data

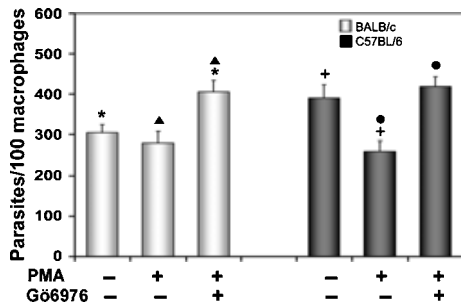


Figure 4 Analysis of intracellular survival of *Leishmania mexicana* parasites in peritoneal macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice stimulated with PMA in the presence and absence of PKC α inhibitor Gö6976. Peritoneal macrophages were infected with *L. mexicana* promastigotes (ratio of 1 : 10). Unbound parasites were removed and infected cells were then incubated in the presence or absence of PKC α inhibitor Gö6976. Macrophages were then stimulated with PMA for 30 min and after 24 h the slides were stained with Giemsa. The total number of intracellular parasites in 100 infected macrophages was quantified by microscopic analysis. Parasite survival in nonstimulated cells was used as control. The percentage of parasites that survived the oxidative burst was calculated in relation to those surviving in nonstimulated macrophages. The data shown are mean \pm SEM of three independent experiments (●, *, ▲, + indicates statistically significant differences).

suggest that PKC α plays an important role in the *L. mexicana* infection outcome *in vitro*.

DISCUSSION

One of the primary defence mechanisms of macrophages against *Leishmania* infections is the oxidative metabolism. It has been shown that *L. donovani* parasites avoid triggering the oxidative burst by actively inhibiting PKC in macrophages (30), and the molecule responsible of this inhibition is LPG (20). LPG is a glycosylinositolphospholipid (GPI)-anchored polymer formed by repeating disaccharide-phosphate units, through which promastigotes interact with both the insect vector and the mammalian host. LPG is essential for infecting macrophages through various mechanisms. It has been shown that LPG alters the organization of lipid microdomains on the phagosome membrane. Additionally, LPG participates in other immune evasion mechanisms such as the efficient of scavenging toxic oxygen metabolites, modulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and downregulation of PKC activation, required for the assembly of the NADPH oxidase complex (31,32). It has been proposed that a fraction of LPG intercolates from the lipid bilayer of the parasite to the lipid bilayer of the macrophage (33).

PKC α , which is rapidly recruited to the nascent phagosome, is the predominant isoenzyme required for the

O $_2^-$ production and additionally regulates other macrophage functions related to host defence, such as Fc γ R-mediated phagocytosis and signal transduction leading to activation of ERK1/2 (14,34,35). PKC α is associated with the phagosomal membrane and phosphorylates the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), a membrane protein associated with actin-based motility and with membrane trafficking. PKC-dependent phosphorylation of phagosome MARCKS leads to the movement of both lysosomes and phagosomes on microtubules, that is required for their interaction. In the J774 cell line, it has been demonstrated that the inhibition of PKC α by *L. donovani* LPG leads to the inhibition of F-actin depolymerization at the phagosomal membrane, thereby avoiding the fusion events required for the delivery of endosomal contents into parasitophorous vacuoles, thus permitting parasite multiplication (35–37).

In this work, we analysed if the modulation of PKC α by LPG of *L. mexicana* was related to parasite survival in macrophages of susceptible BALB/c mice vs. cells of the more resistant C57BL/6 mice. We found that *L. mexicana* LPG exerted opposing effects on PKC α of macrophages of both strains: whereas in the susceptible BALB/c mouse it was inhibitory, in the more resistant C57BL/6 mouse, it activated PKC α . The modulation that LPG exerted on PKC α activity correlated with the magnitude of the oxidative burst and with the intracellular parasite survival. Thus, the inhibition of PKC α activity in BALB/c macrophages was associated with a reduction in the oxidative burst, permitting an enhanced parasite survival. In contrast, in C57BL/6 macrophages, LPG increased PKC α activity, enhancing the oxidative burst, thereby limiting the parasite survival.

Our data are in accordance with the literature, where it has been reported that the respiratory burst of macrophages can differ between BALB/c and C57BL/6 mice, according to their susceptibility to different pathogens. Peritoneal macrophages from herpes simplex resistant (C57BL/6) mice present an augmented respiratory burst capacity as compared with virus-susceptible (BALB/c) mice (38). The opposing effect exerted by *L. mexicana* LPG on PKC α of macrophages from different mouse strains is also in accordance with the literature, where it has been shown that the isoenzyme PKC γ can have opposing responses in different mouse strains (39). Even though LPG has been shown to down-regulate PKC activation, thus allowing increased intracellular survival of *L. donovani*, there are still controversial data regarding the importance of LPG in establishing a successful *Leishmania* infection. It has been shown that deletion of the *lpg1* gene did not influence the infectivity of *L. mexicana* on macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice (40). On the other

hand, it has also been reported that LPG is required for activation of dendritic cells that protect against *Leishmania* infections and that deletion of LPG in *lpg1*^{-/-} mutant parasites leads to accelerated lesion development in C57BL/6 mice (41).

Our comparative data using various mouse strains contribute to the understanding of the role that *Leishmania* LPG could be playing in parasite infectivity, showing that the genetic background of the host determines the relative degree in which LPG could be modulating the oxidative burst, one of the most important leishmanicidal defence mechanisms of host cells. Other host cell components have been linked to strain susceptibility towards *Leishmania* infections. Thus, LTB₄ has been shown to be essential for the control of *Leishmania amazonensis* in the resistant mouse strain C3H/HePas, as macrophages of resistant mice produce higher levels of LTB₄ when compared with macrophages from susceptible BALB/c mice (42). Yet much remains to be explored on how the genetic background of the host correlates with susceptibility towards *Leishmania*.

Taken together, our data show that *L. mexicana* infections of BALB/c BMM ϕ lead to PKC α inhibition (Figure 2b) and that the molecule responsible for this inhibition is *L. mexicana* LPG (Figure 2a). The inhibition of PKC α then leads to oxidative burst reduction (Figure 3), permitting increased parasite survival, as compared with nonstimulated controls (Figure 4). In C57BL/6 BMM ϕ , the opposite response is observed. *L. mexicana*-infected cells display activation of PKC α (Figure 2b), which is confirmed by purified LPG incubated with PKC α (Figure 2a). LPG activation of PKC α then leads to enhanced oxidative burst (Figure 3a), thus reducing parasite survival, as compared with nonstimulated controls (Figure 4). It is noteworthy, that in contrast to purified LPG, the complete parasite inhibits the respiratory burst in C57BL/6 macrophages, albeit to a lesser degree than observed for BALB/c cells. This inhibitory response in the oxidative burst induced by the whole parasite could be related to a variety of other molecules and mechanisms in addition to LPG, such as the possible recognition of opsonized parasites by CR3, a complement receptor that inhibits the oxidative burst (43).

The importance of PKC α in parasite control is further strengthened by the fact that the PKC α inhibitor Gö6976, which significantly reduced the oxidative burst in macrophages of both mouse strains, allowed an enhanced parasite survival in macrophages not only in BALB/c cells but also in C57BL/6 cells, which were originally able to limit parasite survival. These data underscore the importance of the varying modulation of PKC α by *L. mexicana* LPG in regulating parasite survival within macrophages.

The opposing response of macrophages from both mouse strains seems to be specifically related to *L. mexicana* LPG and not to alterations in the PKC α enzyme, as a nonspecific stimulus, such as PMA, modified the enzymatic activity of PKC α in an identical manner in macrophages of both mouse strains.

The opposing effect of LPG on PKC α of both mouse strains is noteworthy, as to date, it has only been reported that *L. donovani* LPG inhibits PKC isolated from rat brain. In that study, it was shown that LPG is a competitive inhibitor of diolein on the regulatory binding site C1 of PKC (44). Although the LPG binding site on PKC α has not been mapped, results suggest that LPG must bind to C1 region of PKC. Comparison of the primary sequence of PKC α C1 site between the two mice strains used in our study (data not shown) showed no differences between them. As post-translational modification represents a ubiquitous and essential device for control of PKC activity localization, stability and protein-protein interaction, it would be possible that the opposite effect exhibited by LPG may be as a result of differences in post-translational modifications found in PKC α at or near this site in each mouse strain (45). In addition, it has been proposed that differences in specificities of high and low affinity phorbol ester-binding sites may partially contribute to distinct effects on PKC-regulated cellular processes (46). In this respect, it has been suggested that ligand affinity and conformational flexibility of the C1 domains determine differential activation mechanisms and it would be interesting to analyse if LPG binds preferentially to the high affinity (C1B) or low affinity (C1A) phorbol ester-binding sites of C1, as has been observed for other activators (47,48). To clarify further the background of the differential activation of PKC α in macrophages of susceptible and resistant mouse strains, it will be crucial to analyse the precise binding site of LPG to PKC α . It is noteworthy that the inhibition of PKC α by Gö6976 is achieved through binding of the inhibitor to the C3 domain of PKC α , thereby achieving the same degree of inhibition in both mouse strains (28).

Even though we found that the modulation of PKC α by LPG affects parasite survival through the modulation of oxidative burst, it is possible that this is not the only mechanism affecting parasite survival, as this enzyme also affects other macrophage effector functions.

To the best of our knowledge, this is the first comparative report that shows a differential modulation of PKC α by *L. mexicana* and by the parasite LPG in macrophages of susceptible BALB/c and the more resistant C57BL/6 mice, which correlates with the oxidative burst and with parasite survival. To date, it is not clear if the different

activation of PKC α by LPG in both mouse strains is possibly related to different binding domains or possibly to other mechanisms such as polymorphisms or SNPs in the genes associated with the signalling pathway of this enzyme.

It will be interesting to analyse the response of PKC α to *L. mexicana* LPG in macrophages of patients with DCL. In addition, it remains to be determined whether the inhibition that LPG exerts on the enzymatic activity of PKC α in macrophages is solely responsible for the susceptibility of BALB/c mice towards infection with *L. mexicana*.

ACKNOWLEDGEMENTS

José Delgado-Domínguez was a recipient of a CONACyT scholarship for the Posgrado en Ciencias Biológicas. We thank Marco Gudiño Zayas, Omar Agni García, Augusto González and Daniel Sánchez Almaraz for technical assistance, and Lucía Álvarez Trejo for excellent secretarial support. This work was supported by CONACyT: 45052-M, CONACyT: 102155 and DGAPA: IN221806-3 and IN220109.

REFERENCES

- Rosas LE, Keiser T, Barbi J, *et al.* Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *Int Immunol* 2005; **17**: 1347–1357.
- Aguilar Torrentera F, Lambot MA, Laman JD, *et al.* Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **66**: 273–279.
- Villasenor-Cardoso MI, Salaiza N, Delgado J, Gutierrez-Kobeh L, Perez-Torres A & Becker I. Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host. *Parasite Immunol* 2008.
- Murray HW. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Immunol* 1982; **129**: 351–357.
- Murray HW & Cartelli DM. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J Clin Invest* 1983; **72**: 32–44.
- Haidaris CG & Bonventre PF. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania donovani* tissue forms by activated macrophages. *J Immunol* 1982; **129**: 850–855.
- Channon JY, Roberts MB & Blackwell JM. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology* 1984; **53**: 345–355.
- Zarley JH, Britigan BE & Wilson ME. Hydrogen peroxide-mediated toxicity for *Leishmania donovani* chagasi promastigotes. Role of hydroxyl radical and protection by heat shock. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1511–1521.
- Bhattacharyya S, Ghosh S, Dasgupta B, Mazumder D, Roy S & Majumdar S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J Infect Dis* 2002; **185**: 1704–1708.
- Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, *et al.* Type 1 interferon (IFN α /beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 1998; **8**: 77–87.
- Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; **334**: 661–665.
- Fujihara M, Connolly N, Ito N & Suzuki T. Properties of protein kinase C isoforms (beta II, epsilon, and zeta) in a macrophage cell line (J774) and their roles in LPS-induced nitric oxide production. *J Immunol* 1994; **152**: 1898–1906.
- Zheng L, Zomerdijk TP, Aarnoudse C, van Furth R & Nibbering PH. Role of protein kinase C isozymes in Fc gamma receptor-mediated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes. *J Immunol* 1995; **155**: 776–784.
- Li Q, Subbulakshmi V, Fields AP, Murray NR & Cathcart MK. Protein kinase calpha regulates human monocyte O-2 production and low density lipoprotein lipid oxidation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 3764–3771.
- Carnevale KA & Cathcart MK. Protein kinase C beta is required for human monocyte chemotaxis to MCP-1. *J Biol Chem* 2003; **278**: 25317–25322.
- Korchak HM, Rossi MW & Kilpatrick LE. Selective role for beta-protein kinase C in signaling for O-2 generation but not degranulation or adherence in differentiated HL60 cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 27292–27299.
- Dey R, Sarkar A, Majumder N, *et al.* Regulation of impaired protein kinase C signaling by chemokines in murine macrophages during visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 2005; **73**: 8334–8344.
- Bhattacharyya S, Ghosh S, Jhonson PL, Bhattacharya SK & Majumdar S. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. *Infect Immun* 2001; **69**: 1499–1507.
- Descoteaux A & Turco SJ. The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol Today* 1993; **9**: 468–471.
- Descoteaux A, Matlashewski G & Turco SJ. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol* 1992; **149**: 3008–3015.
- Turco SJ & Sacks DL. Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1991; **45**: 91–99.
- Becker I, Salaiza N, Aguirre M, *et al.* *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003; **130**: 65–74.
- Racoosin EL & Swanson JA. Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages. *J Exp Med* 1989; **170**: 1635–1648.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Robles-Flores M, Alcantara-Hernandez R & Garcia-Sainz JA. Differences in phorbol ester-induced decrease of the activity of protein kinase C isozymes in rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1094**: 77–84.

- 1 26 Rendon-Huerta E, Mendoza-Hernandez G & Robles-Flores
2 M. Characterization of calreticulin as a protein interacting
3 with protein kinase C. *Biochem J* 1999; **344**(Pt 2): 469–475.
- 4 27 Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, *et al.* Treatment of two
5 patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by
6 *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile
7 but not the disease outcome. *Trop Med Int Health* 1999; **4**:
8 801–811.
- 9 28 Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, *et al.* Selective
10 inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole
11 Go 6976. *J Biol Chem* 1993; **268**: 9194–9197.
- 12 29 Reiling L, Jacobs T, Kroemer M, Gaworski I, Graefe S & Clos
13 J. Spontaneous recovery of pathogenicity by *Leishmania major*
14 hsp100^{-/-} alters the immune response in mice. *Infect Immun*
15 2006; **74**: 6027–6036.
- 16 30 Dermine JF, Goyette G, Houde M, Turco SJ & Desjardins M.
17 *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome
18 microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol* 2005; **7**:
19 1263–1270.
- 20 31 Desjardins M & Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal
21 biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med*
22 1997; **185**: 2061–2068.
- 23 32 Giorgione JR, Turco SJ & Epanand RM. Transbilayer inhibition
24 of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania*
25 *donovani*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 11634–11639.
- 26 33 Turco SJ. Adversarial relationship between the leishmania lipo-
27 phosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Par-*
28 *asite Immunol* 1999; **21**: 597–600.
- 29 34 Breton A & Descoteaux A. Protein kinase C- α participates
30 in Fc γ R-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem*
31 *Biophys Res Commun* 2000; **276**: 472–476.
- 32 35 St-Denis A, Chano F, Tremblay P, St-Pierre Y & Descoteaux
33 A. Protein kinase C- α modulates lipopolysaccharide-
34 induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol*
35 *Chem* 1998; **273**: 32787–32792.
- 36 36 Holm A, Tejle K, Magnusson KE, Descoteaux A & Rasmus-
37 son B. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes peri-
38 phagosomal actin accumulation: correlation with impaired
39 translocation of PKC α and defective phagosome maturation.
40 *Cell Microbiol* 2001; **3**: 439–447.
- 41 37 Holm A, Tejle K, Gunnarsson T, Magnusson KE, Descoteaux
42 A & Rasmusson B. Role of protein kinase C α for uptake
43 of unopsonized prey and phagosomal maturation in macro-
44 phages. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **302**: 653–658.
- 45 38 Ellermann-Eriksen S, Sommerlund M & Mogensen SC. Differ-
46 ential sensitivity of macrophages from herpes simplex virus-
47 resistant and -susceptible mice to respiratory burst priming by
48 interferon- α /beta. *J Gen Virol* 1989; **70**(Pt 8): 2139–2147.
- 49 39 Bowers BJ, Christensen SC, Pauley JR, *et al.* Protein and
50 molecular characterization of hippocampal protein kinase C in
51 C57BL/6 and DBA/2 mice. *J Neurochem* 1995; **64**: 2737–2746.
- 52 40 Ilg T. Lipophosphoglycan is not required for infection of mac-
rophages or mice by *Leishmania mexicana*. *EMBO J* 2000; **19**:
1953–1962.
- 41 41 Aebischer T, Bennett CL, Pelizzola M, *et al.* A critical role for
42 lipophosphoglycan in proinflammatory responses of dendritic
43 cells to *Leishmania mexicana*. *Eur J Immunol* 2005; **35**: 476–
44 486.
- 45 42 Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M & Jancar
46 S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania am-*
47 *azonensis* infection and contribute to strain variation in sus-
48 ceptibility. *J Immunol* 2006; **177**: 3201–3208.
- 49 43 Olivier M, Gregory DJ & Forget G. Subversion mechanisms
50 by which *Leishmania* parasites can escape the host immune
51 response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 2005;
52 **18**: 293–305.
- 41 44 McNeely TB & Turco SJ. Inhibition of protein kinase C activ-
42 ity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem*
43 *Biophys Res Commun* 1987; **148**: 653–657.
- 44 45 Robles-Flores M, Melendez L, Garcia W, *et al.* Posttransla-
45 tional modifications on protein kinase c isozymes. Effects of
46 epinephrine and phorbol esters. *Biochim Biophys Acta* 2008;
47 **1783**: 695–712.
- 48 46 Slater SJ, Taddeo FJ, Mazurek A, *et al.* Inhibition of mem-
49 brane lipid-independent protein kinase C α activity by
50 phorbol esters, diacylglycerols, and bryostatin-1. *J Biol Chem*
51 1998; **273**: 23160–23168.
- 52 47 Slater SJ, Ho C, Kelly MB, *et al.* Protein kinase C α con-
tains two activator binding sites that bind phorbol esters and
diacylglycerols with opposite affinities. *J Biol Chem* 1996; **271**:
4627–4631.
- 41 48 Slater SJ, Seiz JL, Cook AC, *et al.* Regulation of PKC α
42 activity by C1-C2 domain interactions. *J Biol Chem* 2002; **277**:
43 15277–15285.