



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA FOSFATASA
PP2C DE *Leishmania major* EN LA FOSFORILACIÓN
DE STAT-1 Y EN LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO
NÍTRICO EN MACRÓFAGOS MURINOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ARATZENI MERCADO ROBLEDO



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA
2015**

Ciudad Universitaria, D. F.



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Mercado
Robledo
Aratzen
56 48 13 45
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
303146250

2. Datos del tutor

Dra.
María Magdalena
Aguirre
García

3. Datos sinodal 1

Dra.
Ingeborg Dorothea
Becker
Fauser

4. Datos sinodal 2

M. en C.
Alma Reyna
Escalona
Montaño

5. Datos sinodal 3

M. en C.
Isabel Cristina
Cañeda
Guzmán

6. Datos sinodal 4

Dra.
María del Carmen
Maldonado
Bernal

7. Datos del trabajo escrito

Participación de la proteína fosfatasa PP2C de *Leishmania major* en la fosforilación de STAT-1 y en la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos
70p.
2015

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Magdalena Aguirre García por haberme permitido realizar este trabajo con su asesoría, por el tiempo y la gran paciencia que me tuvo y especialmente por cada palabra de aliento que me dio para continuar hasta el final.

A la M. en C. Alma Reyna Escalona Montaña por haber sido mi asesora en los experimentos realizados para este trabajo, por la gran enseñanza que me regaló y por haberme ayudado a culminar este proyecto.

A los miembros del jurado: Dra. Ingeborg Becker Fauser, M. en C. Alma Reyna Escalona Montaña, M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán y la Dra. María del Carmen Maldonado Bernal por la revisión de la tesis y por sus valiosos comentarios.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por el espacio otorgado para la realización de mi trabajo.

A la M. en C. Cristina Castañeda quien me inició en el camino de la parasitología en las clases de la Facultad de Ciencias y con quien posteriormente pude encontrarme en este laboratorio para que continuara brindándome sus conocimientos.

Al Biólogo Arturo Wilkins por el conocimiento que me compartió para la realización de los experimentos.

Al Dr. José Sotero por ofrecerme su apoyo para finalizar mi trabajo.

A Susana Saldaña Castañeda por su apoyo como auxiliar de laboratorio.

A los compañeros de laboratorio por las veces que me ayudaron, por las experiencias compartidas y porque con ustedes muchas veces pude reír: Jenny Gómez, Carlos Guerrero, Rocely Cervantes, Marco Benítez, Jesús Argueta, Araceli Rojas y Omar Agni García.

A la vida por cada oportunidad que me da, sé que los obstáculos son para crecer.

DEDICATORIAS

A mis padres por regalarme la oportunidad de ser parte de su familia y brindarme el privilegio de estudiar, por todo el apoyo que me han dado, y por la paciencia que han tenido conmigo. Gracias por sus exigencias y sus regaños, sé que no son en vano, hacen de mí una mejor persona.

A mis hermanos por los momentos de alegría y enojo que hemos compartido en familia.

A todos mis compañeros, amigos y familia que me presionaron para que terminara por fin.

A mi novio Jaime Zamora Chimal que ha sido mi compañero inseparable y que ha caminado conmigo mano a mano durante más de 8 años, por ser una persona extraordinaria que no me canso de conocer, por ser incondicional, por ayudarme a superar obstáculos que parecían insuperables, y por hacerme saber que un mal capítulo no es el fin de la historia.

Infinitas gracias a todos !!!

LOS QUIERO.

El trabajo fue apoyado por CONACYT con el proyecto 152433.

Durante la elaboración de mi tesis se me otorgó una beca DGAPA PAPIIT con el proyecto IN21209.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental, UNAM.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
Lista de figuras	iv
Abreviaturas.....	v
Resumen.....	vii

I. INTRODUCCIÓN

1.1 La leishmaniasis.....	1
1.2 Manifestaciones clínicas.....	1
1.3 Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	2
1.4 Modelo murino en la leishmaniasis.....	5
1.5 Moléculas del parásito <i>Leishmania</i> y su papel ejercido en la modulación la de respuesta inmune.....	5
1.5.1 Lipofosfoglicano (LPG).....	5
1.5.2 Glicoproteína gp63.....	6
1.5.3 Proteínas fosfatasas.....	6
1.5.3.1 Proteínas fosfatasas PTPs y PP2C en <i>Leishmania spp.</i>	8
1.6 Modulación de la vía de señalización JAK/STAT.....	9
1.6.1 Activación de la cascada de señalización JAK/STAT.....	9
1.6.2 Regulación de la vía de señalización JAK/STAT.....	12
1.6.3 Regulación de la vía JAK/STAT por proteínas fosfatasas.....	14
1.6.4 Modulación de la vía de señalización JAK/STAT por <i>Leishmania spp.</i>	14
1.7 Producción de óxido nítrico en la leishmaniasis.....	16

II. JUSTIFICACIÓN	19
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo general.....	20
4.2 Objetivos particulares.....	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Cultivo de la línea celular de los macrófagos murinos Raw 264.7.....	21
5.2 Obtención y cultivo de los macrófagos peritoneales.....	21
5.3 Estímulo <i>in vitro</i> de los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 con IFN- γ y la obtención de las fracciones celulares ET, SN y P.....	22
5.4 Purificación de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de <i>L. major</i>	23
5.5 Estímulo <i>in vitro</i> de los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 y de los macrófagos peritoneales con IFN- γ y la proteína fosfatasa PP2C.....	24
5.6 Cuantificación de proteína mediante el ensayo DC (compatible con detergente)	25
5.7 Inmunodetección de la proteína pSTAT-1 por Western blot.....	25
5.8 Fosforilación específica.....	27
5.9 Cuantificación de los nitritos por el método de Griess.....	27
5.10 Análisis estadístico de la producción de nitritos.....	28
VI. RESULTADOS	
6.1 Cinética de la fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) en los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 estimulados con IFN- γ	29
6.2 Cinética de la fosforilación de STAT-1 en macrófagos Raw 264.7	

incubados con la proteína fosfatasa PP2C de <i>L. major</i>	33
6.3 Análisis de la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de los ratones BALB/c y C57BL/6.....	36
6.4 Análisis de la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de los ratones BALB/c incubados con la proteína fosfatasa PP2C de <i>L. major</i>	38
6.5 Análisis de la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de los ratones C57BL/6 incubados con la proteína fosfatasa PP2C de <i>L. major</i>	40
6.6 Análisis de la producción de nitritos en los sobrenadantes de los macrófagos peritoneales de los ratones BALB/c y C57BL/6 incubados con la proteína fosfatasa PP2C de <i>L. major</i>	42
VII. DISCUSIÓN.....	45
VIII. CONCLUSIONES.....	51
IX. PERSPECTIVAS.....	51
X. REFERENCIAS.....	52

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	4
Figura 2. Vía de señalización JAK/STAT	11
Figura 3. Regulación de la vía de señalización JAK/STAT.....	13
Figura 4. Cinética de fosforilación de STAT-1 en los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 estimulados con IFN- γ	30
Figura 5. Cinética de fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) en la fracción citosólica (FC) de los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 estimulados con IFN- γ	32
Figura 6. Cinética de la fosforilación de STAT-1 en la línea celular Raw 264.7 estimulados con la proteína fosfatasa PP2C de <i>L. major</i>	34
Figura 7. La fosforilación de STAT-1 en los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 incubados con la PP2C de <i>L. major</i>	35
Figura 8. La fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de los ratones BALB/c y C57BL/6 estimulados con IFN- γ	37
Figura 9. La fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c estimulados con la proteína PP2C.....	39
Figura 10. La fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de los ratones C57BL/6 estimulados con la proteína fosfatasa PP2C.....	41
Figura 11. La proteína fosfatasa PP2C induce la producción de nitritos en macrófagos peritoneales de ratones BALB/C y C57BL/6.....	44

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BSA	albúmina sérica bovina
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
GAS	secuencia de activación de interferón gamma
gp63	glicoproteína 63
GPI	glicosilfosfatidilinositol
IFN- γ	interferón gamma
IL	interleucina
iNOS	sintasa de óxido nítrico inducible
IPTG	Isopropil- β -D tiogalactopiranósido
IRF	factor regulador de interferón
JAK	cinasa Janus
JH	homología JAK
kDa	kilodalton
<i>L.spp</i>	<i>Leishmania spp.</i>
LPG	lipofosfoglicano
LPS	lipopolisacárido
μ g	microgramo
μ l	microlitro
μ m	micrometro
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
NF- κ B	factor nuclear kappa B
ng	nanogramo
NK	células asesinas naturales
nm	nanómetro

NO	óxido nítrico
NP-40	nonident P-40
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pH	potencial de hidrógeno
PIAS	proteínas inhibidoras de STAT activadas
PK	proteína cinasa
PMSF	floruro de fenilmetilsulfonio
pol	polimixina
PPM	proteína fosfatasa dependiente de metales
PPP	fosfoproteína fosfatasa
PPs	proteínas fosfatasas
PTPs	proteínas tirosina fosfatasas
rpm	revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo)
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
SFB	suero fetal bovino
SH2	dominio homólogo conservado Src 2
SHP-1	proteína tirosina fosfatasa de células hematopoyéticas
SOCS	proteínas supresoras de señalización de citocinas
STAT	transductores de señal y activadores de transcripción
S/T PP2C	proteína fosfatasa serina/treonina 2C
TLR	receptor tipo Toll
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
TYK2	tirosina cinasa 2
U	unidades

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por los parásitos del género *Leishmania spp.* En el modelo murino se ha establecido que la cepa BALB/c y C57BL/6 son un modelo de susceptibilidad y resistencia respectivamente a la infección por promastigotes de *L. major*. Esta susceptibilidad y resistencia dependen de la modulación de varias vías de señalización en las que el parásito participa, de esta forma facilita la infección de la célula hospedera. Dentro de estas vías se encuentra la vía de señalización JAK/STAT activada por IFN- γ , la cual es muy importante para la generación de óxido nítrico (NO) ya que se ha demostrado que una mayor producción de NO favorece a la resolución de la enfermedad. *Leishmania* es capaz de desregular la vía de señalización JAK/STAT mediante la activación de la proteína fosfatasa tirosina SHP-1 del macrófago. Sin embargo, existen otras proteínas fosfatasas propias del parásito que podrían ser cruciales para el progreso de la enfermedad, por ejemplo se ha reportado la presencia de la proteína fosfatasa serina/treonina PP2C en *L. major* de la cual se desconoce su papel en el establecimiento de la infección.

En el presente trabajo se analizó la participación de la proteína fosfatasa PP2C de *L. major* en la fosforilación de STAT-1 y en la producción de óxido nítrico en los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 y en los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57BL/6. Se encontró que la proteína fosfatasa PP2C provoca la disminución de la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos estimulados con IFN- γ y además incrementa la producción de NO. Por otro lado se observó que la fosforilación de STAT-1 es mayor en los macrófagos C57BL/6, así como la producción de NO. Los resultados de este trabajo sugieren que la PP2C del parásito puede ejercer un papel muy importante en la regulación de la vía de señalización JAK/STAT así como en la producción de óxido nítrico.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad que puede ser causada por varias especies del protozooario parásito intracelular obligado *Leishmania* (L.). Algunas de estas especies son *Leishmania major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. chagasi*, *L. donovani*, *L. amazonensis*, entre otras. Este parásito es transmitido al hospedero mamífero (humanos, perros, marsupiales entre otros) por diferentes especies de la mosca del género *Lutzomyia* para el continente americano y el género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo ⁽¹⁾.

Se estima que las infecciones por *Leishmania* afectan a más de 12 millones de personas en todo el mundo, con dos millones de casos nuevos cada año ⁽²⁾.

En México, el agente causal de la leishmaniasis cutánea es *L. mexicana* que se encuentra distribuida principalmente en los estados de Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo, Tabasco con la mayoría de casos clínicos, así como en Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, Michoacán, Jalisco y Nayarit ⁽³⁾.

1.2 Manifestaciones clínicas

El hombre que es infectado con el parásito *L. mexicana* puede desarrollar dos formas clínicas como: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Asimismo, en Asia y África, la LCL puede ser causada por *L. major*. La leishmaniasis mucocutánea (LMC) está asociada a *L. braziliensis* y la leishmaniasis visceral (LV) es causada principalmente por *L. donovani*, por lo que

el desarrollo de la enfermedad dependerá de la especie del parásito y la respuesta inmune del hospedero que puede variar según edad y sexo ⁽¹⁾.

La LCL es generalmente indolora y limitada a la piel, sin afectar los tejidos subcutáneos, caracterizada por la presencia de úlceras, con borde elevado definido que pueden ser unitarias aunque si los parásitos se propagan a través de los vasos linfáticos, pueden producir lesiones secundarias en la piel. En la LCD las lesiones se dispersan ampliamente en la piel dañando tejidos subcutáneos. La LMC es caracterizada por úlceras producidas generalmente en nariz y boca donde la inflamación exacerbada induce necrosis que puede destruir completamente el tabique nasal, en algunos casos afectando la faringe y la laringe. La LV presenta el cuadro clínico más severo caracterizado por la presencia de fiebre, hepatoesplenomegalia, pérdida de peso y pancitopenia (reducción de eritrocitos, leucocitos y plaquetas) ⁽⁴⁾.

Los distintos cuadros clínicos evidencian que las diversas especies de *Leishmania* han desarrollado múltiples estrategias para evadir los efectos microbicidas y para manipular las vías de señalización del macrófago ⁽⁵⁾.

1.3 Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

El parásito *Leishmania* se transmite por la picadura de una mosca hembra; mientras la mosca se alimenta de la sangre del mamífero, en la piel inocular los promastigotes metacíclicos, los cuales son fagocitados por los macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. Al interior de estas células fagocíticas, en el fagolisosoma, los promastigotes se transforman en amastigotes, siendo el lugar en donde por fisión binaria proliferan los amastigotes hasta lisis a la célula

hospedera, los cuales son liberados y son fagocitados por nuevas células, de esta forma los parásitos son protegidos para su crecimiento y multiplicación. El ciclo es cerrado una vez que las moscas ingieren células infectadas con amastigotes. Dentro de las moscas las células fagocíticas se lisan y dan lugar a la liberación de los parásitos en forma de amastigote que se transformarán rápidamente en promastigotes, los cuales se alojan en el tubo digestivo del vector ^(6,7,8,9) (Fig. 1).

Los promastigotes son móviles, fusiformes, miden entre 10 a 20 μm de largo, de 1 a 5 μm de ancho y tienen un flagelo anterior.

Los amastigotes son de forma redonda, presentan un pequeño flagelo llamado rizoplasto y son inmóviles, miden de 2 a 5 μm de diámetro.

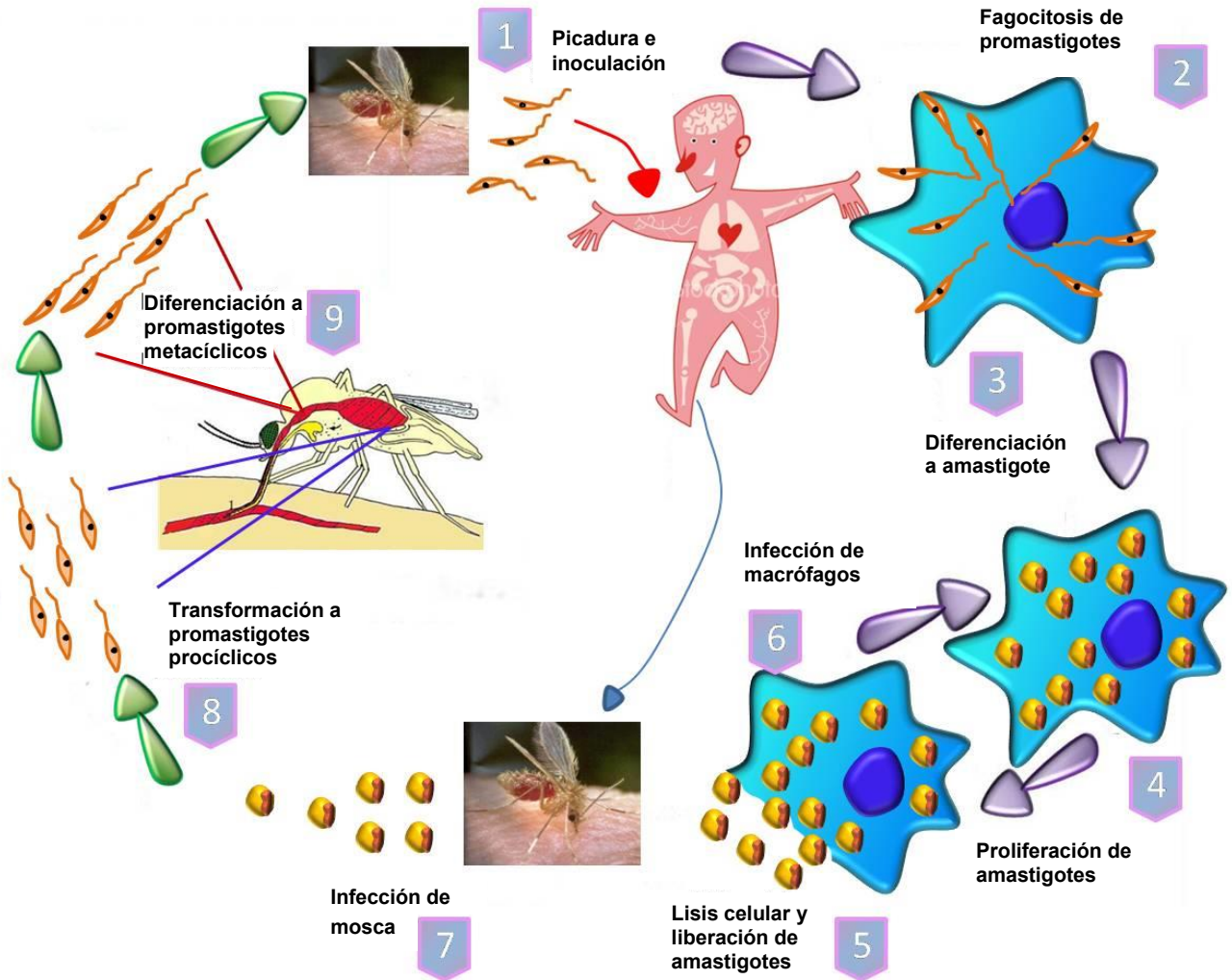


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

1. Inoculación de promastigotes metacíclicos a través de la picadura de la mosca *Lutzomyia* sp. 2. Fagocitosis de promastigotes de *Leishmania* por macrófagos u otras células fagocíticas. 3. Diferenciación de promastigotes a amastigotes en el interior del macrófago. 4. Proliferación de amastigotes por fisión binaria. 5. Lisis del macrófago y liberación de los amastigotes. 6. Infección de otras células a partir de los amastigotes liberados. 7. Ingestión de células infectadas por la mosca *Lutzomyia* al alimentarse de sangre. 8. Transformación de amastigotes a promastigotes procíclicos en el intestino medio de la mosca. 9. Diferenciación a la forma infectiva del parásito en el intestino anterior, de promastigote procíclico a metacíclico. Modificado de National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) ⁽¹⁰⁾.

1.4 Modelo murino en leishmaniasis

En el estudio de la leishmaniasis provocada por *L. major* se han utilizado distintas cepas de ratones. Los ratones BALB/c son considerados como una cepa susceptible a la leishmaniasis por tener un desarrollo progresivo de las lesiones ya que parece comprometida en el control de la infección. En cambio la cepa de ratones C57BL/6 se ha considerado como la cepa resistente a la infección por *L. major*. Esto es debido a que tiene mejor controlada la enfermedad, ya que a tiempos tempranos de la infección las células infectadas logran destruir con mayor eficiencia al parásito ⁽¹¹⁾.

1.5 Moléculas del parásito *Leishmania* y su papel ejercido en la modulación de la respuesta inmune

1.5.1 Lipofosfoglicano (LPG). Es una de las moléculas de mayor abundancia en la superficie de los promastigotes, está compuesto principalmente de unidades repetitivas de disacáridos y fosfatos, unidos a la membrana por un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). La estructura del LPG varía entre las especies de *Leishmania*. Asimismo, la abundancia del LPG varía en los diferentes estadios, los promastigotes procíclicos están cubiertos por un glicocálix de 7 nm de grosor y en los promastigotes metacíclicos el grosor es de 17 nm, en cambio los amastigotes presentan poco LPG ⁽¹²⁾.

El LPG juega un papel muy importante en la supervivencia del parásito y en la modulación de la respuesta inmune, por lo que la abundancia de éste en la superficie ha sido asociada con la resistencia de los promastigotes metacíclicos al

ataque por complemento y a la fagocitosis de los promastigotes por el macrófago ⁽¹³⁾, en la protección del parásito contra las hidrolasas del fagolisosoma, en la reducción de la producción de citocinas como IFN- γ y TNF- α , así como la inhibición de señales intracelulares como la vía de la proteína cinasa C (PKC) y la inhibición de la fusión del fagolisosoma y la producción de estallido oxidativo ⁽¹⁴⁾.

1.5.2 Glicoproteína gp63. También conocida como leishmanolisina es una metaloproteasa dependiente de zinc. Es una molécula de superficie importante ya que es la proteína más abundante que cubre a los promastigotes de *Leishmania* ⁽¹⁵⁾. Al igual que el LPG, la expresión de gp63 se encuentra reducida en el amastigote ⁽¹⁶⁾.

Estudios realizados han demostrado que la glicoproteína gp63 juega un papel muy importante en la fijación del complemento, además la proteína protege al parásito contra péptidos antimicrobianos tales como las defensinas y el pexiganano (péptido de 23 aminoácidos con actividad microbicida) ⁽¹⁷⁾.

Diferentes receptores de los macrófagos participan en la fagocitosis de *Leishmania sp.*, sin embargo también se considera que la gp63 maximiza la unión e internalización del promastigote dentro del macrófago a través de su interacción con el receptor de integrina α/β promoviendo la adhesión dependiente de complemento ⁽¹⁸⁾.

1.5.3 Proteínas fosfatasas. Las vías de señalización son reguladas por eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas donde participan las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasas. La desfosforilación está dada por

proteínas fosfatasa que son las que catalizan la separación de grupos fosfato de residuos de aminoácidos específicos, las proteínas fosfatasa han sido clasificadas en 3 familias principales. **1)** La familia de las proteínas fosfatasa de tirosina (PTP), que incluyen tanto fosfatasa específicas de tirosina (Tyr) como fosfatasa de especificidad dual (DsPTPs) las cuales pueden desfosforilar residuos de S/T y Tyr ⁽¹⁹⁾. Dentro de las PTPs se incluyen la PTP1B, las proteínas fosfatasa SHP-1, SHP-2 y la fosfatasa CD45 (Fosfatasa de diferenciación del linfocito) **2)** La familia de las fosfoproteínas fosfatasa (PPP) que tienen como sustrato residuos de serina y/o treonina (S/T) tales como la proteína fosfatasa 1 (PP1), PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 y PP7 y **3)** La familia de las proteínas fosfatasa dependientes de metales (PPM) que incluye a las fosfatasa que desfosforilan en residuos de S/T y que además su función catalítica es dependiente de los iones manganeso/magnesio, esta familia está representada por la proteína fosfatasa 2C (PP2C) ⁽²⁰⁾.

En mamíferos se han encontrado 16 genes en el genoma humano que codifican para alrededor de 22 isoenzimas de la proteína fosfatasa PP2C, entre las cuales se encuentran PP2C α , PP2C β , PP2C γ , PP2C δ , PP2C ϵ , PP2C ζ , PP2C η , PP2C κ , y PP2C de activación de células T (TA-PP2C) ⁽²¹⁾ asimismo se han encontrado PP2C homólogas en levaduras, en la planta *Arabidopsis thaliana*, en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y el protozoario *Paramecium tetraurelia* ^(22, 23). La actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C es insensible a los inhibidores ácido okadáico, tautomicina y caliculina, los cuales inhiben a las proteínas fosfatasa PP1 y PP2A ⁽²⁴⁾. Existe un inhibidor no clásico para proteínas fosfatasa S/T de la familia PPM que es el alcaloide sanguinarina derivado de la planta *Sanguinaria*

canadensis, la cual es un inhibidor potente y específico de la proteína fosfatasa PP2C ⁽²⁵⁾.

1.5.3.1 Proteínas fosfatasas PTPs y PP2C en *Leishmania*

El parásito *Leishmania* presenta diversas proteínas fosfatasas, en el genoma de *L. major* se han encontrado 88 genes para fosfatasas, de las cuales 8 son PTPs, 22 son fosfatasas duales y 58 son fosfatasas S/T, de estas 58 proteínas, 15 son fosfatasas PP2C ⁽²⁶⁾.

En *Leishmania*, las PTPs participan en el proceso de diferenciación de la fase de promastigote a la fase de amastigote ⁽²²⁾. En *L. major* y *L. donovani* se ha encontrado que la proteína fosfatasa PTP1 permite la sobrevivencia de los amastigotes *in vivo* ⁽²⁷⁾.

También se ha demostrado que *L. major* presenta PTPs de membrana que se encuentran incrementadas en los promastigotes metacíclicos en la etapa infectiva ⁽²⁸⁾. En promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* se ha reportado que la inhibición de las fosfatasas PTPs del parásito e infectar macrófagos con estos hay una reducción de la carga parasitaria ⁽²⁹⁾, además se ha encontrado que promastigotes metacíclicos de esta misma cepa secretan una PTP al medio de cultivo ⁽³⁰⁾.

Se ha reportado una proteína fosfatasa de S/T identificada como PP2C en promastigotes de *L. chagasi* ⁽³¹⁾. También la proteína fosfatasa PP2C de *L. major* fue clonada y purificada, identificada en el bolsillo flagelar de promastigotes lo cual podría indicar que se está secretando al exterior del parásito ⁽³²⁾.

En nuestro laboratorio se clonó y purificó mediante cromatografía de afinidad la proteína fosfatasa PP2C de 44.9 kDa de *L. major*, la cual fue utilizada para generar anticuerpos contra esa proteína. Los anticuerpos permitieron identificar a la proteína fosfatasa PP2C en el flagelo de los promastigotes de *L. major* ⁽³³⁾.

Además se demostró que la incubación de promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* con el compuesto sanguinarina inhibió la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C. La concentración de 250 ng indujo la apoptosis de promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* y sólo en *L. major*, la inhibición de la actividad de PP2C indujo la fosforilación de la MAP cinasa p38 ⁽³⁴⁾.

1.6 Modulación de la vía de señalización JAK/STAT

1.6.1 Activación de la cascada de señalización JAK/STAT

Se ha demostrado que las proteínas participantes en la vía de señalización JAK-STAT son necesarias para numerosas respuestas biológicas inducidas por citocinas como la proliferación, diferenciación, migración celular y la apoptosis ⁽³⁵⁾.

El mecanismo de señalización de las citocinas como IL-4, IL-6, IFN- α e IFN- γ depende principalmente de la activación de dos familias de proteínas: las Janus cinasas (JAKs) y los transductores de señales y activadores de la transcripción (STATs).

La familia de las JAKs son proteínas con actividad tirosina cinasa, la cual está conformada por cuatro miembros: JAK 1, JAK 2, JAK 3, y la tirosina cinasa 2 (TYK 2), las cuales presentan un elevado grado de homología en una serie de dominios conservados denominados JH (homología JAK), cada uno contiene un dominio JH1 el cual presenta actividad tirosina-cinasa y un dominio JH2 que es un dominio

pseudo-cinasa encontrado en el carboxilo terminal, que efectúa una función reguladora. El dominio JH3 presenta secuencias homologas con los dominios SH2 (Dominio homólogo conservado Src 2), que es probablemente la zona encargada de unir residuos fosfotirosina. Por último en el extremo amino terminal, entre el dominio JH4 al JH7 poseen un dominio FERM el cual comprende de 4 proteínas asociadas al citoesqueleto: la proteína 4.1, ezrina, radicina y moesina. Este dominio dirige la asociación estable con motivos de receptores proximales a la membrana, como los receptores de citocinas ⁽³⁶⁾.

Las proteínas STATs son factores de transcripción integrada por 7 miembros llamados STAT- 1, STAT- 2, STAT- 3, STAT- 4, STAT- 5a, STAT- 5b y STAT- 6, los cuales, en ausencia de estímulo se encuentran en el citoplasma transcripcionalmente inactivas. Están formados por siete dominios conservados, uno de ellos, el dominio SH2, el cual reconoce residuos fosfotirosina, esencial para la unión con las JAKs y para la dimerización de los STATs ⁽³⁷⁾.

La activación de la vía JAK/STAT está dada por la unión de una citocina a su receptor de superficie que lleva a la dimerización del receptor y la subsecuente activación de las JAKs, las cuales están constitutivamente asociadas al receptor. Los residuos tirosina específicos del receptor (en su dominio intracelular) son entonces fosforilados por las JAKs activados que sirven como sitios de unión para los factores de transcripción STATs ⁽³⁷⁾. Los STATs son entonces fosforilados por los JAKs, y posteriormente estos STATs fosforilados se disocian del receptor y forman homodímeros o heterodímeros (dimerizados a través de sus dominios SH2) ⁽³⁸⁾. Los dímeros de STAT fosforilados son posteriormente translocados al núcleo, donde ellos se unen a secuencias específicas de DNA en los promotores

de los genes blanco (Fig. 2), regulando así la transcripción de genes como el factor regulador de interferón 1 y 9 (IRF-1 y IRF-9), la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) y la secuencia de activación de IFN- γ (GAS) ⁽³⁹⁾.

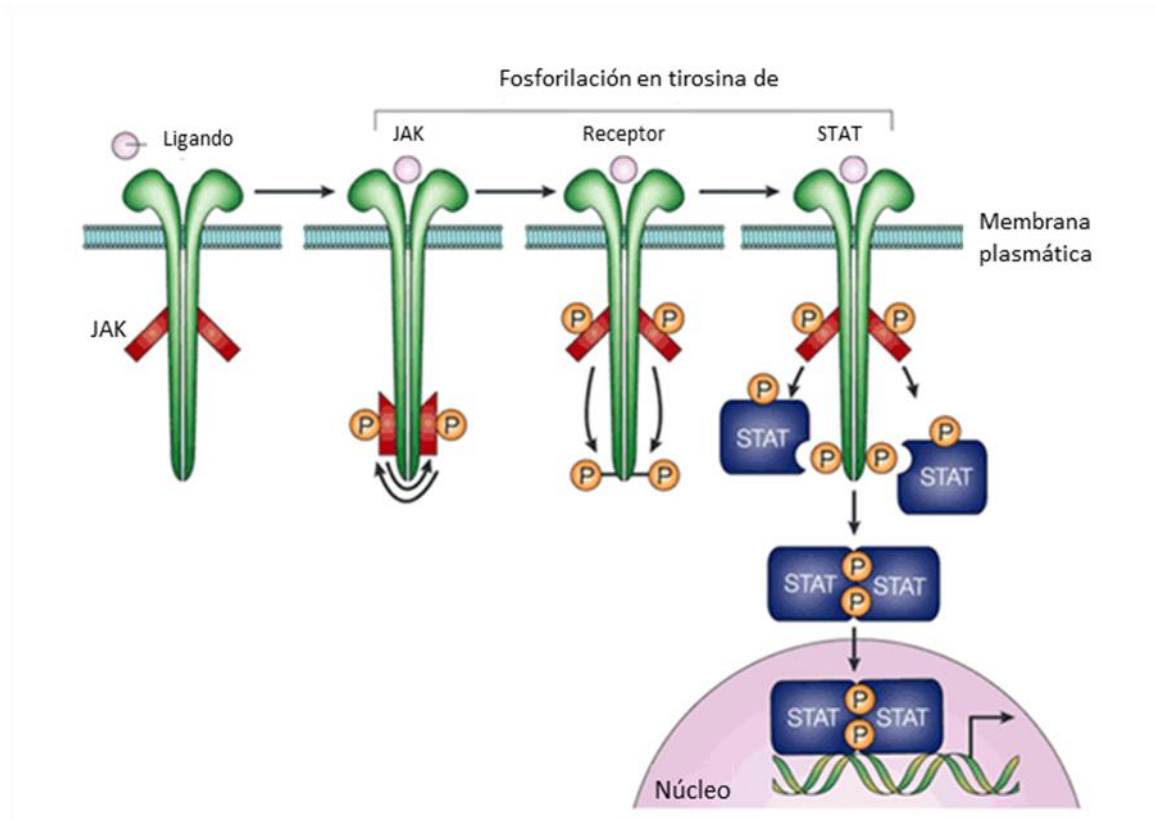


Figura 2. Vía de señalización JAK/STAT

Secuencia de fosforilaciones en tirosina desencadenadas por la interacción receptor-citocina. La dimerización del receptor permite la transfosforilación y activación de las Janus cinasas. Seguido por la fosforilación de los residuos tirosina del receptor y el reclutamiento de los factores de transcripción STAT. Enseguida sucede la fosforilación en tirosina de STAT. Se forman dímeros de STAT a través de sus dominios SH2, permitiendo la translocación al núcleo ⁽⁴⁰⁾.

La duración de la activación de STAT típicamente oscila entre unos pocos minutos a un par de horas en condiciones fisiológicas normales, y se ha encontrado ser constitutivamente activo en líneas celulares tumorales humanas especialmente para STAT-1, STAT3, y STAT5 ⁽⁴¹⁾.

El factor de transcripción STAT-1 induce la expresión de iNOS y citocinas proinflamatorias tales como IL-1 β , IL-12 y TNF- α las cuales participan en el control y eliminación de varios microorganismos como parásitos, bacterias y virus. Además se ha encontrado que STAT-1 participa en la acidificación del fagosoma la cual es independiente de IFN- γ .

El IFN- γ es una glicoproteína homodimérica y las principales células productoras de IFN- γ son los linfocitos y las células NK.

El receptor del IFN- γ (IFN- γ R) está formado por dos subunidades llamadas IFN γ R1 e IFN γ R2, cada una formada por dos cadenas polipeptídicas α y β .

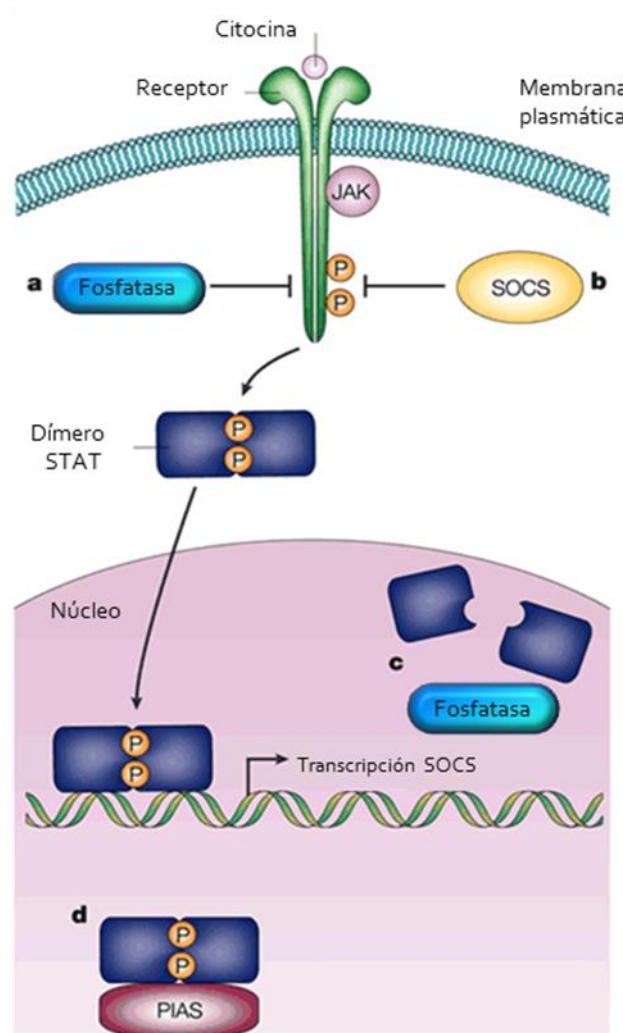
La cadena IFN- γ R α juega un papel importante en la unión al ligando mientras que IFN- γ R β es requerido para la transducción de señales del IFN- γ ⁽⁴²⁾.

Las funciones de IFN- γ son mediadas vía IFN- γ R en la cual se involucran las cinasas JAK1/JAK2 asociadas a receptor y el factor de transcripción STAT-1.

1.6.2 Regulación de la vía de señalización JAK/STAT

La actividad de STATs puede ser regulada por modificación de proteínas mediante la fosforilación de tirosina, serina, metilación y acetilación ⁽⁴³⁾. En estas vías de transducción de señales debe haber una estrecha regulación para evitar la excesiva estimulación, para ello hay proteínas inhibitorias que contribuyen a la regulación negativa de la señalización de esta vía, de los cuales se han reconocido tres: PTPs tales como SHP-1 (con un dominio SH2) y la PTP CD45, las proteínas inhibidoras de STATs activadas (PIAS) y las proteínas supresoras de señalización de citocinas (SOCS) ⁽⁴⁴⁾ (Fig. 3).

Las proteínas PIAS bloquean la unión de STAT al ADN, inhibiendo de esta forma la activación de genes regulados por STAT.



Esquema 3. Regulación de la vía de señalización JAK/STAT

En citoplasma: **a.** Fosfatasa **b.** Proteínas SOCS. En núcleo: **c.** Fosfatasa nucleares **d.** PIAS ⁽⁴⁰⁾.

La familia de las proteínas SOCS está conformada por SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS 4, SOCS 5, SOCS 6, SOCS 7 y CIS. Las SOCS pueden ser inducidas por citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-4 e IL-6, en algunos casos una citocina puede

inhibir la señalización para otra citocina. Por ejemplo, la citocina IL-6 regula la expresión de SOCS1 en linfocitos T CD4⁺, lo cual inhibe la señalización de IFN- γ , causando de esta forma, la inhibición de la diferenciación de los linfocitos ⁽⁴⁵⁾.

Las proteínas SOCS podrían tener un amplio rango de acción en la regulación de la vía JAK-STAT ⁽⁴⁴⁾.

Por ejemplo, SOCS1 interactúa directamente con JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2, inhibiendo así su actividad catalítica ⁽⁴⁶⁾ y SOCS3 puede inhibir la actividad de JAK2, aunque SOCS3 se une con menor afinidad que SOCS1 ⁽⁴⁷⁾.

1.6.3 Regulación de la vía JAK/STAT por proteínas fosfatasa

En distintos estudios se ha demostrado que existen proteínas fosfatasas capaces de regular la vía de señalización JAK-STAT, tales como las fosfatasas SHP-2, SHP-1, CD45, PTP1B, PTP de células T (PTP-TC), Receptor tipo tirosina fosfatasa (PTPRT) y PTP-tipo basófilo (PTPBL) ⁽⁴⁸⁾.

La proteína fosfatasa tirosina SHP-1 es una importante molécula que regula negativamente los tipos celulares hematopoyéticos ⁽⁴⁹⁾. La fosfatasa SHP-1 desfosforila proteínas importantes en vías de señalización, estas proteínas cinasas pueden ser JAK1/2, TYK2, y STAT-1 α , -2, -3, -5 α/β y -6, provocando una inhibición de la vía de señalización JAK/STAT.

1.6.4 Modulación de la vía de señalización JAK/STAT por *Leishmania spp.*

El parásito *L. donovani* interfiere en la señalización de citocinas y se ha reportado que los promastigotes de *L. donovani* inducen la expresión de SOCS3.

SOCS3 ha sido asociado con la regulación de algunas vías de transducción de señales, además regula negativamente la señalización de citocinas, tales como IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ las cuales son esenciales para las funciones inmunes del macrófago.

Se ha demostrado que la infección de los macrófagos con *L. donovani* induce la expresión de SOCS3, proteína que bloquea la función del IFN- γ , lo cual resulta en la baja activación de los macrófagos infectados⁽⁵⁰⁾.

En otro estudio se demostró que STAT-1 juega un papel importante en la infección de los ratones con promastigotes de *L. major*, ya que la producción de óxido nítrico en respuesta al IFN- γ establece una resistencia anti-leishmanicida. Aunado a esto, se comprobó que los macrófagos deficientes de STAT-1 mostraron un incremento en el pH de fagolisosoma lo cual incrementó la susceptibilidad a la infección por *Leishmania*⁽⁵¹⁾.

Por otra parte, *L. donovani* disminuye la expresión de IFN- γ R en monocitos humanos, y desregula la vía de señalización de IFN- γ por la disminución en la fosforilación de tirosina JAK1, JAK2 y STAT-1 α , bloqueando así las funciones biológicas de IFN- γ ⁽⁵²⁾. Asimismo en las líneas celulares Raw 264.7 y J774A.1 la expresión de IFN- γ R α así como IFN- γ R β decrece luego de la infección con promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*.

Sin embargo, se ha demostrado que los macrófagos murinos infectados con promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* reducen los niveles totales de la proteína y de fosforilación de JAK1 y JAK2 en los macrófagos murinos⁽⁵³⁾.

Por otro lado, algunos investigadores observaron que *L. donovani* requiere de la activación de la fosfatasa SHP-1 del macrófago para su supervivencia dentro de estas células fagocíticas ⁽⁵⁴⁾.

También se ha demostrado que *L. major* promueve la actividad de la proteína fosfatasa SHP-1 del macrófago, lo que conduce a la desfosforilación de residuos tirosina de la cinasa JAK2 (fosforilación inducible por IFN- γ) ⁽⁵⁴⁾.

Sin embargo, en ausencia de SHP-1 en la célula, el parásito es rápidamente eliminado *in vitro* por los macrófagos a través de mecanismos microbicidas dependientes o independientes de NO, por lo que *Leishmania* disminuye la activación de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) ⁽⁵⁵⁾, limitando de esta forma la destrucción de los parásitos mediado por el efecto del NO, favoreciendo como consecuencia la progresión de la enfermedad. Se ha demostrado que el NO juega un papel importante en el control de la infección por *Leishmania*.

Aunque, además de la proteína SHP-1 propia de la célula reguladas por *Leishmania*, existen otras proteínas particulares del parásito que probablemente estén actuando a favor de la infección de la célula hospedera.

1.7 Producción de óxido nítrico en la leishmaniasis

El óxido nítrico (NO) es una molécula citotóxica la cual representa un mecanismo de defensa generada principalmente por los macrófagos. El NO es liberado a partir de la conversión de L-arginina a L-citrulina, esta reacción es catalizada por la enzima iNOS. Durante la invasión de diversos patógenos intracelulares el NO puede jugar un papel muy importante para el control de la infección, ejerciendo su efecto microbicida en la membrana, el citoplasma o el núcleo celular, siendo el

lipopolisacárido (LPS) una de las principales moléculas inductoras de la producción de NO, esta producción es generada mediante la vía de señalización de los receptores tipo Toll (TLR), activando de esta forma el factor de transcripción NF- κ B, que se transloca al núcleo celular y se une a la región promotora del gen de la iNOS ^(56, 57, 58).

Asimismo el IFN- γ también induce la expresión de la enzima iNOS (en humanos, codificada por el gen NOS2) que conduce al estallido respiratorio, formándose NO y especies reactivas de oxígeno, provocando así efectos citotóxicos.

Se ha propuesto que la regulación negativa de la expresión de la iNOS es a través del complejo enzimático PI3 cinasa (PI3K) ⁽⁵⁹⁾, aunque se ha demostrado que macrófagos deficientes de SHP-1 tienen mayor producción de nitritos que los macrófagos silvestres, por lo que se sugiere que las PTP también regulan negativamente la inducción de la iNOS ⁽⁶⁰⁾.

Muchos microorganismos son eliminados por el efecto del NO, generalmente en células como los macrófagos, aunque en algunas infecciones no es suficiente la acción microbicida, tal es el caso de algunos microorganismos intracelulares como *Mycobacterium*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania*. En el caso de *Leishmania*, los macrófagos activados por citocinas como IFN- γ y TNF- α pueden destruir al parásito. Los macrófagos murinos infectados con amastigotes de *L. major* inducen la síntesis de TNF- α y la acción previa del IFN- γ aumenta más de 10 veces la producción de TNF- α . A pesar de esto, muchas de las infecciones en humanos por *Leishmania* no resuelven favorablemente, aunque los hospederos infectados logran controlar mejor la enfermedad cuando inicialmente hay una mayor producción de NO ⁽⁶¹⁾.

Así, en los modelos murinos, *in vitro*, la resistencia a la leishmaniasis en macrófagos de ratones C57BL/6 está asociada a una alta producción de NO en la etapa temprana de infección de *L. major*, comparado con los ratones BALB/c que pueden presentar 3 veces menor producción de NO. Por lo que una alta expresión de iNOS favorece la eliminación del parásito *Leishmania* ⁽⁶¹⁾.

En hepatocitos de ratas estimulados con diferentes citocinas se ha demostrado que tanto la inactivación de PTP así como de las proteínas fosfatasa S/T provoca la disminución de la producción de NO ⁽⁶²⁾. Sin embargo en estudios de cáncer, se ha observado que la activación de la proteína fosfatasa PP2A puede reducir la producción de NO, disminuyendo de esta forma la progresión del cáncer ⁽⁶³⁾, siendo favorable el papel regulador de las fosfatasas en las células.

II. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que la vía de señalización JAK/STAT puede ser modulada por proteínas SOCS, PIAS y las fosfatasa como PTP1B, SHP-1 y CD45. Asimismo se sabe que la proteína fosfatasa SHP-1 del macrófago es activada cuando el parásito *L. major* infecta a esta célula. Además *L. donovani* modula la vía de señalización de JAK/STAT activando diversos reguladores como SOCS en el macrófago. Por otro lado, el control de la infección por *Leishmania* está fuertemente asociada a la activación de los macrófagos dada por el IFN- γ ya que juega un papel muy importante en la activación de la vía JAK/STAT, ya que puede llevar a la producción de óxido nítrico. Sin embargo, no se sabe si la proteína fosfatasa PP2C de *L. major* participa en la fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) y en la producción de NO, la cual es una molécula que juega un papel muy importante en el control de la leishmaniasis.

III. HIPÓTESIS

Si la proteína fosfatasa PP2C de *L. major* desfosforila el factor de transcripción STAT-1 (Tyr 701) entonces modula la producción de óxido nítrico en los macrófagos murinos.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar la participación de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. major* en la desfosforilación de STAT-1 y en la producción de óxido nítrico en los macrófagos murinos.

4.2 Objetivos Particulares:

- 4.2.1 Analizar el tiempo óptimo de fosforilación de STAT-1 en los macrófagos murinos de la línea celular Raw 264.7 estimulados con IFN- γ .
- 4.2.2 Realizar una cinética de fosforilación de STAT-1 en los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 incubados con la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. major*.
- 4.2.3 Analizar la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos de ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 estimulados con IFN- γ .
- 4.2.4 Analizar la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos de ratones BALB/c y C57BL/6 incubados con la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. major*.
- 4.2.5 Determinar la producción de nitritos en los macrófagos de ratones BALB/c y C57BL/6 después de ser incubados con la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. major*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo de la línea celular de los macrófagos murinos Raw 264.7

Se cultivó la línea celular de macrófagos murinos Raw 264.7 en cajas de cultivo de 100 mm x 20 mm (Corning) con medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, 37°C y CO₂ al 5 %. Después de 3 días de cultivo, se retiró el medio y se realizó el despegado de los macrófagos con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X que contenía el ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) a una concentración de 5 mM durante 10 min a 37 °C. La suspensión celular se colocó en un tubo cónico de 15 ml (Corning) y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en 1ml de medio RPMI con 10% de SFB. Las células se incubaron a 4° C para evitar su adherencia al tubo de 15 ml. La viabilidad se determinó mediante el conteo en una cámara Neubauer utilizando como colorante vital Azul tripán (Gibco). Posteriormente los macrófagos se sembraron en cajas de 24 pozos de baja adherencia, ajustando a 1 millón de células por pozo en un volumen de 1 ml de medio RPMI con 10% de SFB.

5.2 Obtención y cultivo de los macrófagos peritoneales

Se sacrificaron ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 por dislocación cervical. Posteriormente, se cortó la piel del vientre de los ratones dejando al descubierto la membrana peritoneal. Se inyectaron 10 ml de PBS 1X frío (pH 7.4) en el peritoneo y se agitó moderadamente el peritoneo de los ratones. Después, se extrajo el PBS del peritoneo con una jeringa de 10 ml y la suspensión celular se colocó en

tubos cónicos de 50 ml para cada cepa de ratón por separado. Posteriormente la suspensión celular se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min a 4°C y las células se lavaron con 20 ml de PBS 1X frío. Se repitió el paso anterior y el botón celular, se resuspendió en 1 ml de RPMI con SFB al 10%. Se determinó el número de células vivas con el colorante vital Azul tripán. Posteriormente los macrófagos se sembraron en cajas de 24 pozos de baja adherencia, ajustando a 1 millón de células por pozo en un volumen de 1ml de medio RPMI con 10% de SFB. Las células se dejaron reposar durante 24 h previo al estímulo.

5.3 Estímulo *in vitro* de los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 con IFN- γ y obtención de las fracciones celulares ET, FC y P

Los macrófagos fueron estimulados con el IFN- γ (100 U/ml) durante 15, 30, 60 min y durante 24 horas, asimismo se dejó una condición sin estímulo. Transcurrido el tiempo, los macrófagos se lavaron 3 veces con PBS 1X, se retiró el PBS y se agregó directamente a cada pozo 40 μ l de amortiguador de lisis RIPA (Tris-HCl pH 7.4 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 1%, ditioneitol (DTT) 1mM, más una mezcla de inhibidores de proteasas (leupeptina 1 μ g/ml, aprotinina 10 μ g/ml y PMSF 1 mM) y de inhibidores de fosfatasas (ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) 10mM y fluoruro de sodio (NaF) 10 mM). La mezcla celular se retiró de cada uno de los pozos y se colocaron en tubos eppendorf de 0.5 ml, para favorecer la lisis celular se agitaron en un vórtex cada 5 min, el procedimiento fue realizado a 4°C. La lisis celular se verificó al microscopio utilizando azul tripán.

Para la fracción extracto total (ET) se tomaron 20 μ l y el resto se centrifugó a 12000 rpm durante 10min a 4°C, el sobrenadante o fracción citosólica (FC) se

separó y la pastilla a la que se le denominó fracción membranal (P) se resuspendió en 10µl de RIPA. Se tomó una alícuota de cada fracción para la cuantificación de proteína por el método DC (Biorad). El volumen restante de cada una de las fracciones se guardó a -70°C hasta su uso.

5.4 Purificación de la proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. major*

Se cultivaron promastigotes de la cepa MHOM/SV/7315-ASKH de *L. major* para la obtención del ADN. Se realizó el diseño de oligonucleótidos a partir del genoma de este parásito, el gen encontrado en el cromosoma 25 que codifica para una PP2C con una longitud de 1221 pares de bases y con una proteína de masa molecular de 44.9 KDa fue amplificado utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, la banda del peso esperado se purificó y se utilizó para clonarla en el plásmido de expresión pET 23b (Novagen) en *E. coli*. Las bacterias con el plásmido se cultivaron y mediante el kit QIAprep Spin Miniprep se obtuvo el ADN puro. El fragmento de ADN y el plásmido pET23b se digirieron con enzimas de restricción. Las digestiones analizadas mediante electroforesis se purificaron y se usaron para la reacción de ligación, los productos de esta reacción fueron usados para transformar células competentes que luego de su cultivo se obtuvieron colonias de expresión, las cuales contenían el plásmido con el gen Lmj PP2C con His-Tag. Se realizó la inducción con isopropil β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) y las bacterias inducidas fueron sonicadas para la obtención del sobrenadante. La purificación de la enzima PP2C se realizó mediante la utilización de una cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (Bio- Rad), usando una resina

acoplada a níquel, seleccionando de esta forma las proteínas con residuos de histidina. La proteína recombinante se pasó por una columna para eliminar el LPS presente, producto de la lisis bacteriana y la proteína purificada fue utilizada para los estímulos *in vitro* ⁽³²⁾.

5.5 Estímulo *in vitro* de los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 y de los macrófagos peritoneales con IFN- γ y la proteína fosfatasa PP2C

Los macrófagos fueron incubados con IFN- γ (100 U/ml), PP2C (10 μ g/ml), y/o polimixina B (pol B) (10 μ g/ml), la polimixina B es un decapeptido que se une al lípido A del LPS, neutralizando de esta forma su acción ⁽⁷³⁾. En las condiciones de macrófagos incubadas con la proteína fosfatasa PP2C con o sin pol B el tiempo de incubación fue de 0.5, 1, 12, y 24 horas. En otro ensayo los macrófagos fueron incubados con la proteína fosfatasa PP2C conjuntamente con IFN- γ durante 30 min con o sin pol B. En otro experimento las células fueron incubadas con la proteína fosfatasa PP2C (10 μ g/ml) por 24 horas, pasado el tiempo se les adicionó IFN- γ , dejando incubar 30 min, además se incubó conjuntamente la proteína fosfatasa PP2C e IFN- γ durante 30 min, asimismo se incubaron células sólo con la proteína fosfatasa PP2C (10 μ g/ml). Para cada ensayo se utilizó como control positivo el estímulo de IFN- γ durante 30 min de incubación. De la misma forma, se dejó una condición basal de macrófagos utilizado como control negativo.

Después del estímulo *in vitro*, los macrófagos fueron lisados con el amortiguador de lisis RIPA. El extracto celular se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf limpio y se tomó una alícuota de

cada condición para la cuantificación de proteína. El sobrenadante restante se guardó a -70°C hasta su uso.

5.6 Cuantificación de proteína mediante el ensayo DC (compatible con detergente)

Para la cuantificación de la proteína en los sobrenadantes celulares, se utilizó el método DC, el cual está basado en el ensayo de Lowry (Bio-Rad DC Protein Assay). Los datos obtenidos fueron extrapolados en una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA). Como blanco se utilizó el amortiguador de la lisis RIPA y se determinó la cantidad de proteína en 5 µl de muestra. Cada una de las condiciones se realizó por duplicado. La placa se dejó reposar por 15 min protegida de la luz y se leyó a 650 nm en el lector de ELISA (BIO-TEK Instruments), los datos se analizaron en el programa KC4 v2.

5.7 Inmunodetección de la proteína pSTAT-1 por Western blot

La identificación de la proteína STAT-1 se realizó por ensayos de Western-blot en geles de poliacrilamida al 7.5%. Las muestras se ajustaron a 25 µg y enseguida se les agregó amortiguador de Laemmli 2X (Glicerol, amortiguador de Tris-HCl pH 6.8, azul de bromofenol, pironina y β-mercaptoetanol), se hirvieron durante 3 min a 96°C, y se colocaron en hielo, posteriormente las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida y se corrieron a un voltaje constante de 70 V durante 30 min y consecutivamente se incrementó el voltaje a 120 V durante 1 h.

Una vez terminada la electroforesis, el gel se equilibró en amortiguador de transferencia durante 10 min, posteriormente las proteínas se transfirieron a

membranas de PVDF-Immobilon (Millipore) previamente activadas con metanol por 3 min. La transferencia se realizó en un equipo transblot semi-seco (Bio- Rad) durante 60 min a un voltaje constante de 20 V.

Para verificar la transferencia de las proteínas, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau, la membrana se cortó a un peso molecular aproximado de 120 kDa para la identificación de distintas la proteína pSTAT-1 α y la proteína β -actina posteriormente se lavó con TBST 1X.

La membrana transferida se bloqueó con 3% de BSA en TBST 1X durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente. Después la membrana se lavó 6 veces con TBST 1X cada 10 min.

La membrana que se cortó arriba de los 120 kDa se incubó con el anticuerpo pSTAT-1 Tyr 701 (Cell Signalling 9170) dilución 1:500 en 5% de leche en TBST 1X y la membrana restante se incubó con el anticuerpo β -actina (Santa Cruz Biotechnology, SA) dilución 1:10000 con 1% de BSA en TBST 1X. Las membranas se dejaron toda la noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente se les retiró el anticuerpo primario y se lavaron con TBST 1X. La membrana incubada anteriormente con el anticuerpo pSTAT, se incubó con un segundo anticuerpo Anti-rabbit (Cell Signalling 7074) conjugado con peroxidasa de rábano a una dilución 1:2000 con 1% de BSA en TBST 1X y para la segunda membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-goat (Santa Cruz Biotechnology,SA) 1:5000 en BSA 1% en TBST 1X, durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Pasado el tiempo de incubación, el anticuerpo se retiró y la membrana se lavó cada 10 min durante 2 h. Por último la membrana se le adicionó una

solución de sustrato + luminol (Pierce) por 3 min y se reveló por quimioluminiscencia utilizando placas de revelado de la marca Kodak.

5.8 Fosforilación específica

Mediante densitometría con el programa Quantity One, se calculó la fosforilación específica de la proteína STAT-1, la cual resultó de la división de la proteína actina entre STAT-1 fosforilado.

5.9 Cuantificación de nitritos por el método de Griess

Los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 se estimularon con LPS (10 ng) y/o IFN- γ (100 U/ml) y/o PP2C (10 μ g) durante 24 horas. Asimismo, se dejó una condición basal de macrófagos no estimulados utilizados como control negativo. Al día siguiente los sobrenadantes de estas células se colectaron y en una placa de 96 pozos de fondo plano (Corning), mediante el ensayo de Griess se analizó cada una de las muestras para determinar la producción de NO, tomando 100 μ l del sobrenadante de cada una y se preparó una curva patrón de nitrito de sodio (NaNO₂) para establecer la concentración de NO. Cada una de las condiciones se realizó por duplicado. Se adicionó 0.1 ml del reactivo de Griess a cada pozo y la placa se incubó durante 10 min en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Posteriormente la placa se leyó a una longitud de onda (λ) de 545 nm en el lector de ELISA (BIO-TEK Instruments). Los datos se analizaron en el programa KC4 v 2.

5.10 Análisis estadístico de la producción de nitritos

La evaluación estadística de los datos se realizó mediante la prueba de ANOVA de 2 vías, y Tukey de múltiples comparaciones. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todos los gráficos muestran el promedio \pm el error estándar.

VI. RESULTADOS

6.1 Cinética de la fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) en los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 estimulados con IFN- γ

Los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 se estimularon con 100 U/ml de IFN- γ durante 15, 30, 60 min y 24 horas. Los macrófagos fueron lisados y se obtuvieron distintas fracciones como: extracto total (ET), fracción citosólica (FC) y fracción membranal (P). En la figura 4A se muestra la fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) en las fracciones con el siguiente orden: ET en los carriles 1, 4, 7, 10 y 13; FC en las carriles 2, 5, 8, 11 y 14 ; y P en los carriles 3, 6, 9, 12 y 15.

Los resultados mostraron que a partir de los 15 min de estimulación de los macrófagos con el IFN- γ , STAT-1 está fosforilado en las fracciones ET y FC. A los 30 min de estímulo, STAT-1 se encontró fosforilado en ET, FC y P. En la condición de los 60 min de estímulo con IFN- γ la fosforilación de STAT-1 solo se observó en la fracción ET. Sin embargo, a las 24 horas no se observó la fosforilación de STAT-1 en ninguna de las fracciones de los macrófagos. También fue ausente la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos sin estímulo (S/E).

La β -actina se utilizó como control de carga. En la figura 4B se muestra el análisis densitométrico de la fosforilación específica de STAT-1 en las diferentes fracciones analizadas en 4A.

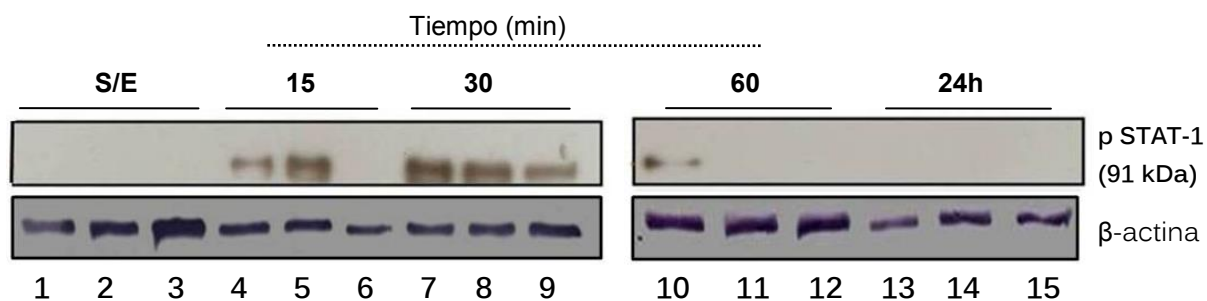
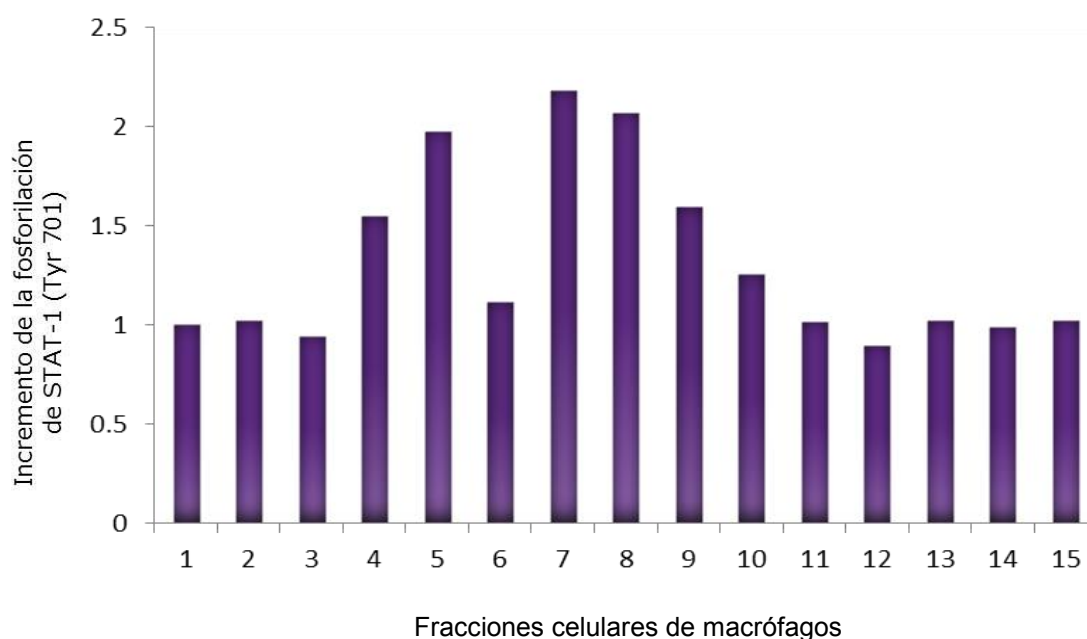
A**B**

Figura 4. Cinética de fosforilación de STAT-1 en los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 estimulados con IFN- γ

A. Fosforilación de STAT-1 en Tyr 701 en las fracciones celulares de los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 estimulados durante 15 min, 30 min, 60 min y 24 h con IFN- γ (100 U/ml): Extracto total (ET) en los carriles 1,4,7,10 y 13, fracción citosólica (FC) en los carriles 2,5,8,11,14 y fracción membranal (P) en los carriles 3,6,9,12 y 15. Se utilizó como control los macrófagos sin estímulo (S/E). La β -actina se utilizó como control de carga.

B. Análisis densitométrico de los niveles relativos de fosforilación específica de STAT-1.

Posteriormente la fosforilación de STAT-1 se analizó sólo en la fracción citosólica (FC) de macrófagos estimulados con IFN- γ (100 U/ml) durante 15, 30 y 60 min..

En la figura 5A se observó que STAT-1 es fosforilado a los 15, 30 y 60 min de estímulo con IFN- γ , donde la condición de macrófagos estimulados durante 30 min con IFN- γ resultó ser el tiempo óptimo para la fosforilación de STAT-1.

La β -actina se utilizó como control de carga. En la figura 5B se muestra el análisis densitométrico de la fosforilación específica de STAT-1.

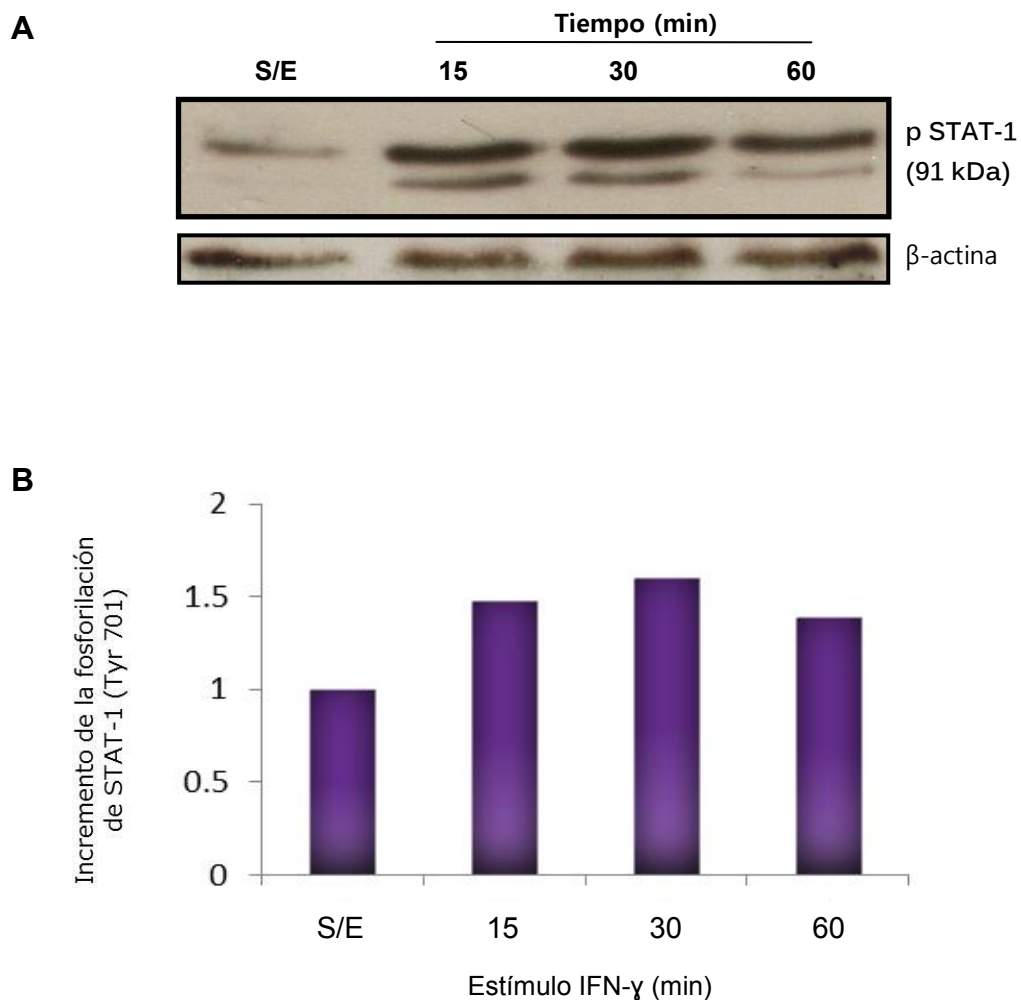


Figura 5. Cinética de fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) en la fracción citosólica (FC) de los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 estimulados con IFN-γ

A. Fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) en la fracción citosólica de los macrófagos Raw 264.7 estimulados con IFN-γ durante 15, 30 y 60 min de estímulo, y se utilizó como control los macrófagos sin estímulo (S/E). Como control de carga se utilizó la β-actina. **B.** Análisis densitométrico de los niveles relativos de fosforilación específica de STAT-1.

6.2 Cinética de la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos Raw 264.7 incubados con la proteína fosfatasa PP2C de *L. major*

Los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 fueron incubados durante 0.5, 1, 12, y 24 horas con 10 µg de la proteína recombinante PP2C de *Leishmania major* en presencia y ausencia de pol B. Se utilizó como control de fosforilación de STAT-1, macrófagos estimulados por 30 min con IFN-γ (100 U/ml).

En la figura 6A se observa que la incubación de los macrófagos con la proteína fosfatasa PP2C no indujo la fosforilación de STAT-1 en ninguna de las condiciones analizadas. Sin embargo, en el control de macrófagos estimulados con IFN-γ por 30 min se observó la fosforilación de STAT-1.

La β-actina se utilizó como control de carga. En la figura 6B se muestra el análisis densitométrico de la fosforilación específica de STAT-1.

Como no observamos un efecto directo de la proteína fosfatasa PP2C en la fosforilación de STAT-1, ahora los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 fueron incubados durante 30 min con 10 µg de la proteína recombinante PP2C de *L. major* y estimulados con IFN-γ (100 U/ml), en presencia y ausencia de pol B (Fig. 7).

En la figura 7A se observa que la proteína PP2C de *L. major* disminuye la fosforilación de STAT-1 en macrófagos estimulados con IFN-γ (fracción 3), esta disminución es más evidente cuando los macrófagos fueron incubados con la proteína fosfatasa PP2C y pol B y estimulados con IFN-γ (fracción 4), en comparación al control de macrófagos estimulados con IFN-γ durante 30 min

(carril 2). En el control de macrófagos sin estímulo no fue observada la fosforilación de STAT-1 (fracción 1).

La β -actina se utilizó como control de carga. En la figura 7B se muestra el análisis densitométrico de la fosforilación específica de STAT-1.

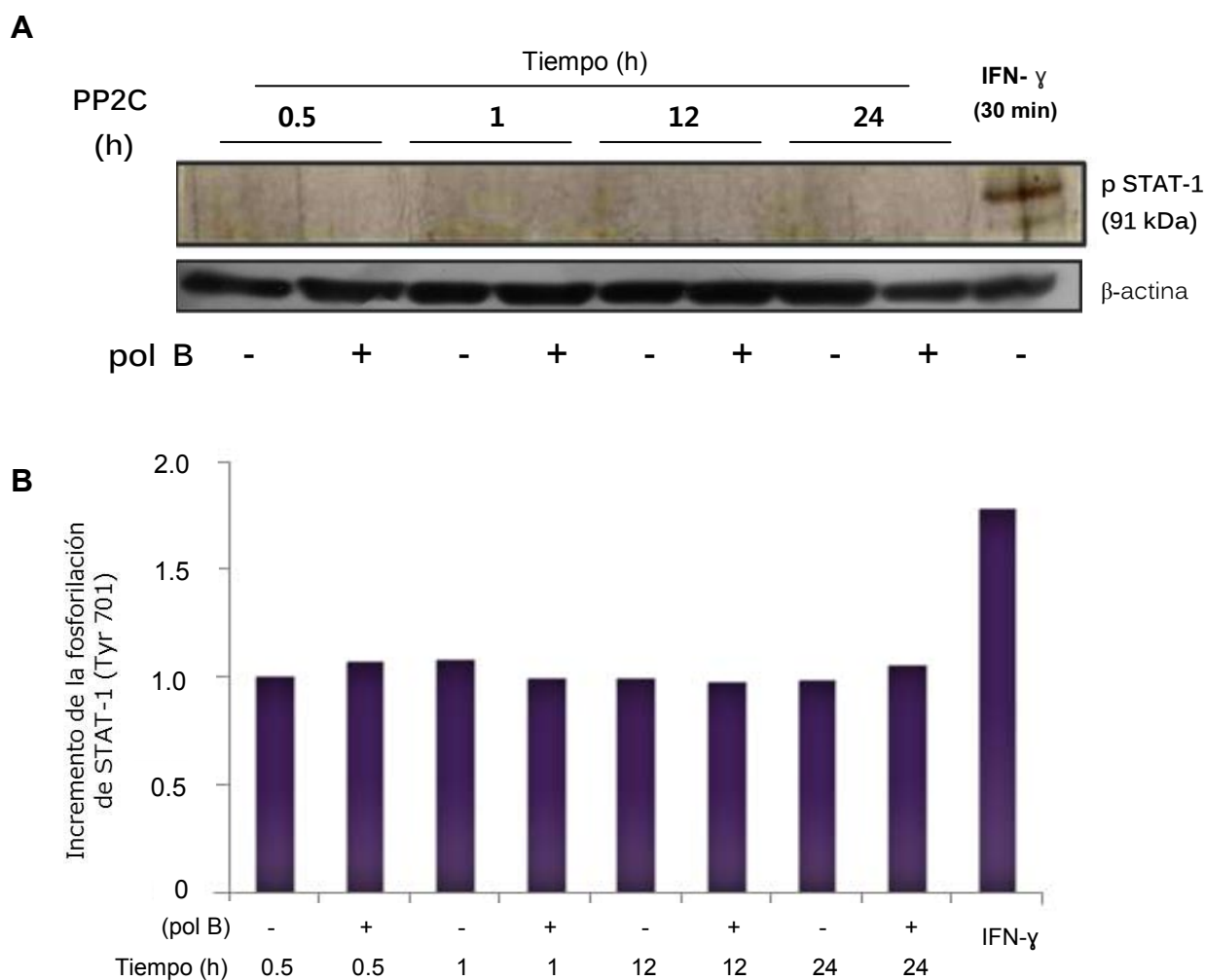


Figura 6. Cinética de la fosforilación de STAT-1 en la línea celular Raw 264.7 estimulados con la proteína fosfatasa PP2C de *L. major*

A. La fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) en la FC de los macrófagos Raw 264.7 estimulados con PP2C (10 μ g) por 0.5, 1, 12 y 24 horas en presencia o ausencia de pol B. Como control positivo se estimularon macrófagos con IFN- γ (100 U/ml) por 30 min. Como control de carga se utilizó la β -actina. **B.** Análisis densitométrico de los niveles relativos de fosforilación específica de STAT-1.

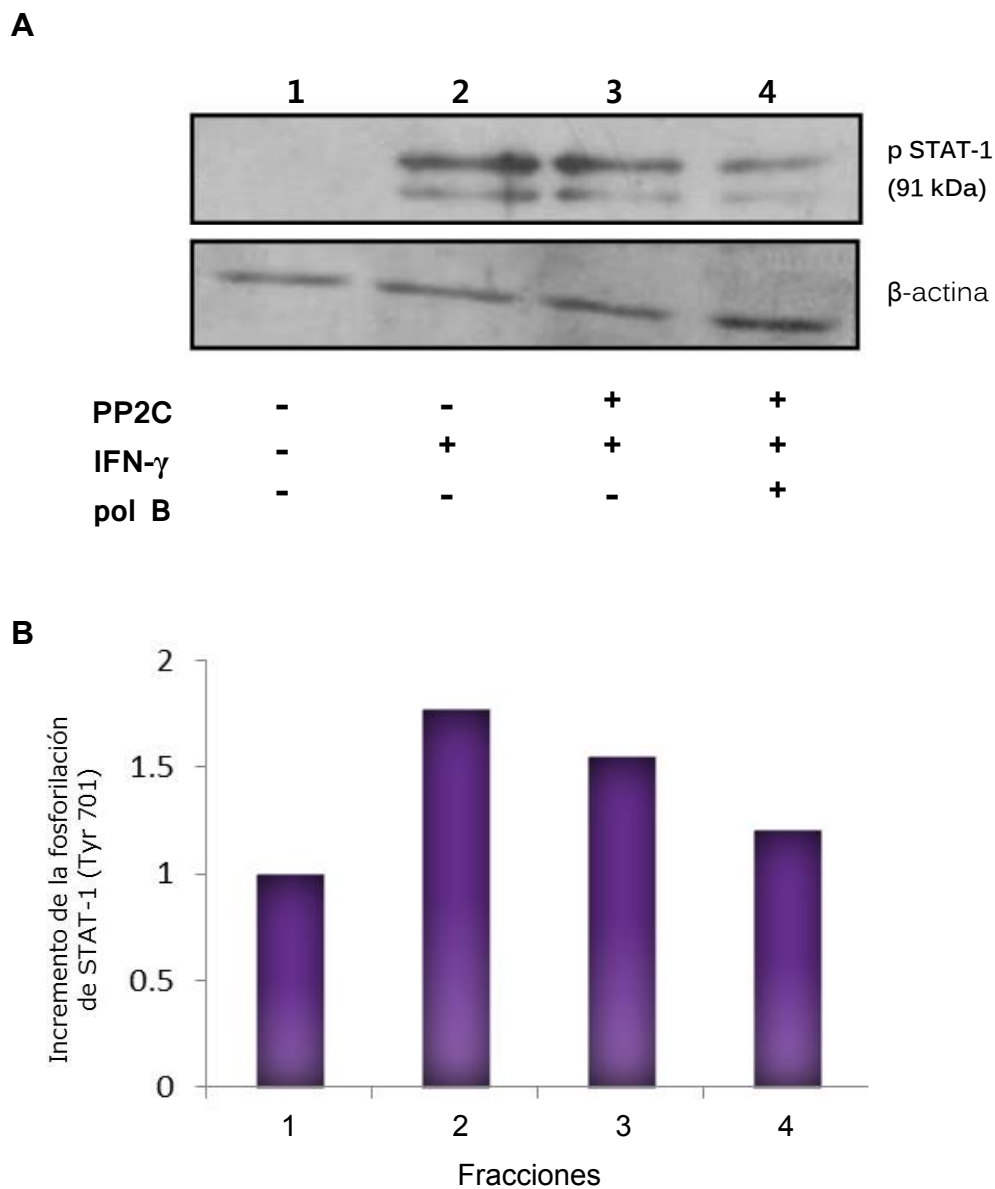


Figura 7. La fosforilación de STAT-1 en los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 incubados con la PP2C de *L. major*

A. La fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) en los macrófagos Raw 264.7. Macrófagos sin estímulo (fracción 1). Macrófagos incubados con IFN- γ (fracción 2). Macrófagos incubados con 10 μ g de PP2C e IFN- γ (100 U/ml) en ausencia (-) (fracción 3) o presencia (+) de pol B por 30 min (fracción 4). Como control de carga se utilizó la β -actina.

B. Análisis densitométrico de los niveles relativos de fosforilación específica de STAT-1.

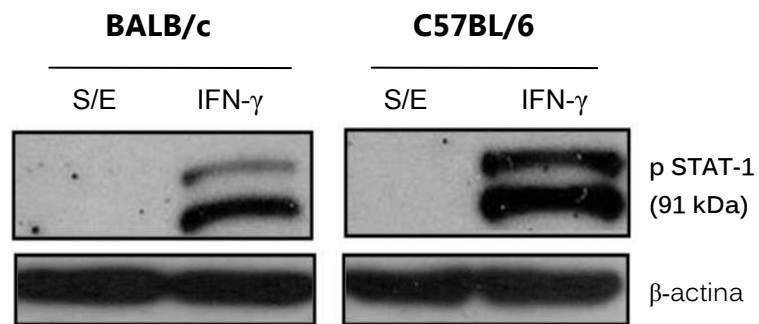
6.3 Análisis de la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de los ratones BALB/c y C57BL/6

En los macrófagos peritoneales de los ratones BALB/c y C57BL/6 estimulados con IFN- γ por 30 min se analizó la fosforilación de STAT-1.

En la figura 8A encontramos la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de los ratones BALB/c y C57BL/6 estimulados con IFN- γ por 30 min. Sin embargo, esta fosforilación de STAT-1 fue mayor en los macrófagos de C57BL/6 en comparación con los macrófagos de BALB/c. En la condición de los macrófagos no estimulados con IFN- γ no fue observada la fosforilación de STAT-1.

La β -actina se utilizó como control de carga. En la figura 8B se muestra el análisis densitométrico de la fosforilación específica de STAT-1.

A



B

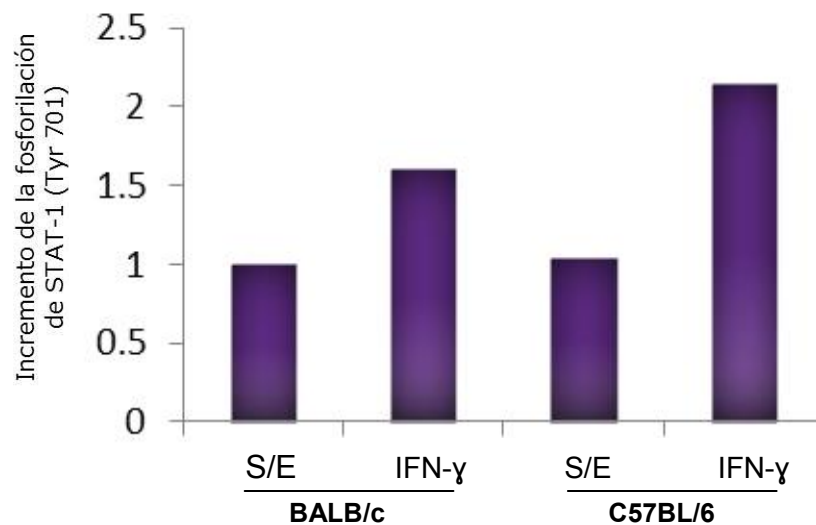


Figura 8. La fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de los ratones BALB/c y C57BL/6 estimulados con IFN- γ

A. La fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) en los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57BL/6 estimulados con IFN- γ (100 U/ml) por 30 min. Macrófagos sin estímulo (S/E). Como control de carga se utilizó la β -actina. **B.** Análisis densitométrico de los niveles relativos de fosforilación específica de STAT-1.

6.4 Análisis de la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c incubados con la proteína fosfatasa PP2C de *L. major*

Se analizó la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c posterior a la incubación con la proteína fosfatasa PP2C (10 µg) durante 24 horas y 30 min y/o estimularlos con IFN-γ (100 U/ml) durante 30 min.

En la figura 9A observamos que la fosforilación de STAT-1 se presentó en los macrófagos de BALB/c estimulados con IFN-γ por 30 min (fracción 2), pero ésta no fue observada en macrófagos que no fueron estimulados con IFN-γ por 30 min (fracción 1). Interesantemente donde se incubaron los macrófagos con la proteína fosfatasa PP2C durante 24 h y se estimularon con IFN-γ por 30 min no se observó la fosforilación de STAT-1 (fracción 3). Mientras que en la condición de macrófagos incubados con PP2C durante 30 min y estimulados con IFN-γ por 30 min, la fosforilación de STAT-1 disminuyó en comparación con el control de macrófagos estimulados sólo con IFN-γ (fracción 4). Sin embargo, en los macrófagos que sólo fueron estimulados con la proteína fosfatasa PP2C, no se observó la fosforilación de STAT-1 (fracción 5).

La β-actina se utilizó como control de carga. En la figura 9B se muestra el análisis densitométrico de la fosforilación específica de STAT-1.

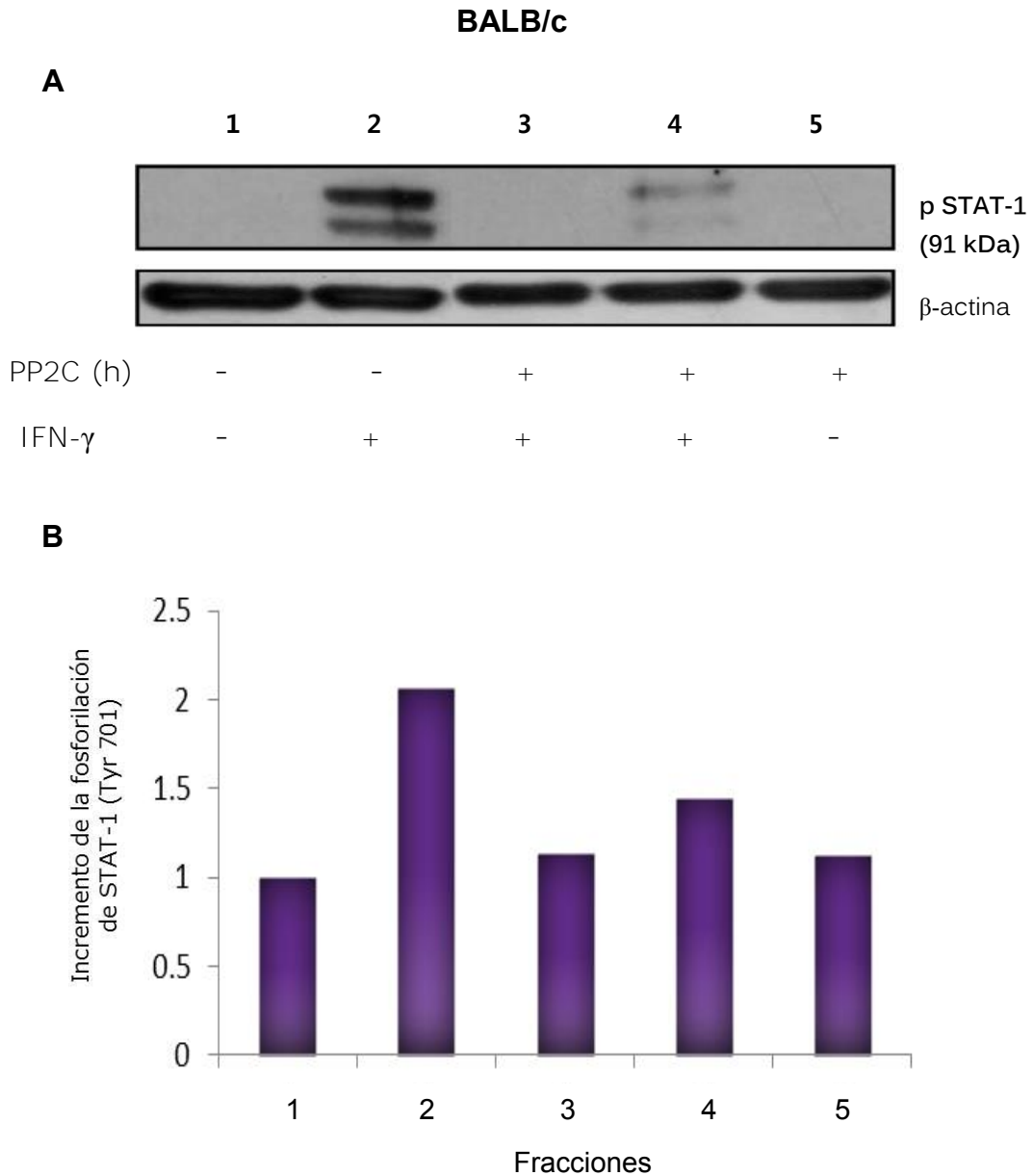


Figura 9. La fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c estimulados con la proteína PP2C

A. Fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) en FC de los macrófagos peritoneales incubados sólo con PP2C (10 μ g) (fracción 5), con PP2C y estimulados con IFN- γ (100 U/ml) (fracciones 3 y 4). Como control positivo del experimento se estimularon macrófagos por 30 min con IFN- γ (100 U/ml) (fracción 2). Macrófagos sin estímulo (fracción 1) Como control de carga se utilizó la β -actina. **B.** Análisis densitométrico de los niveles relativos de fosforilación específica de STAT-1.

6.5 Análisis de la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de ratones C5BL/6 incubados con la proteína fosfatasa PP2C de *L. major*

Se analizó la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de ratones C57BL/6 después de incubarlos con la proteína fosfatasa PP2C (10 µg) durante 30 min y 24 horas y/o estimularlos con IFN-γ (100 U/ml) durante 30 min.

En la Fig. 10 A, en la condición de los macrófagos sin estímulo no se observó la fosforilación de STAT-1 (fracción 1). En los macrófagos estimulados con IFN-γ (100 U/ml) por 30 min se observó la fosforilación de STAT-1 (fracción 3). Interesantemente, en la condición en donde los macrófagos se incubaron durante 24 horas con la proteína fosfatasa PP2C y posteriormente se estimularon por 30 min con IFN-γ (100 U/ml), no se observó la fosforilación de STAT-1 (fracción 2). Mientras que en los macrófagos donde se incubó simultáneamente con PP2C e IFN-γ por 30 min, se observó que la fosforilación de STAT-1 disminuye con respecto al control (fracción 4). Por último, en la condición de los macrófagos incubados solo con la proteína fosfatasa PP2C por 24 horas, no se observó la fosforilación de STAT-1 (fracción 5).

La β-actina se utilizó como control de carga. En la figura 10B se muestra el análisis densitométrico de la fosforilación específica de STAT-1.

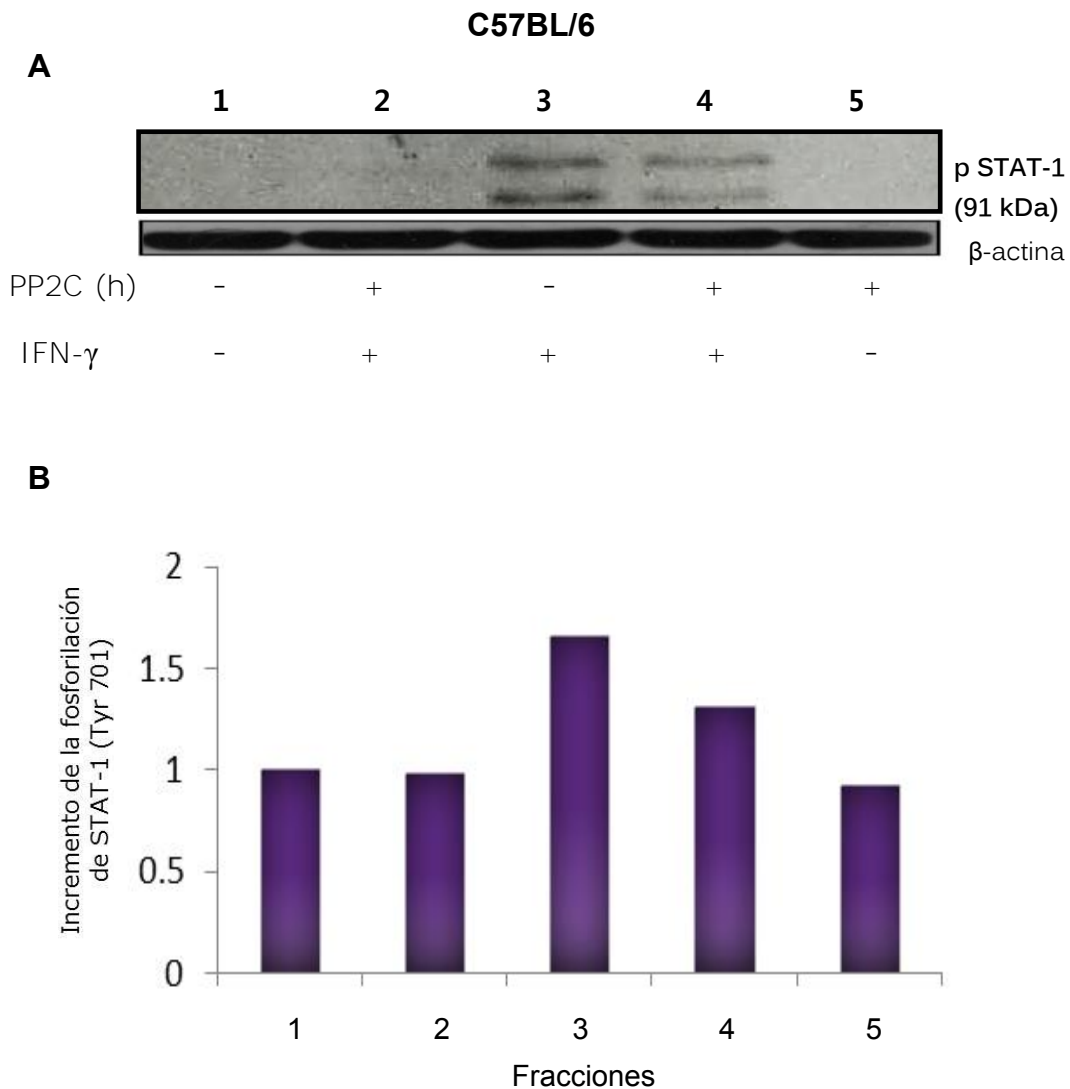


Figura 10. La fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales de los ratones C57BL/6 estimulados con la proteína fosfatasa PP2C

A. Fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) en FC de los macrófagos peritoneales incubados sólo con PP2C (10 μ g) (fracción 5), con PP2C y estimulados con IFN- γ (100 U/ml) (fracciones 2 y 4). Como control positivo del experimento se estimularon macrófagos por 30 min con IFN- γ (100 U/ml) (fracción 3). Macrófagos sin estímulo (fracción 1) Como control de carga se utilizó la β -actina. **B.** Análisis densitométrico de los niveles relativos de fosforilación específica de STAT-1.

6.6 Análisis de la producción de nitritos en los sobrenadantes de los macrófagos peritoneales de los ratones BALB/c y C57BL/6 incubados con la proteína fosfatasa PP2C de *L. major*.

Los macrófagos de ratones BALB/c fueron estimulados con LPS e IFN- γ por 24h y posteriormente se analizó la producción de nitritos, se observó un incremento de la producción de nitritos 8.5 veces con respecto al control (sin estímulo). Los macrófagos incubados con la proteína fosfatasa PP2C y pol B mostraron un incremento en la producción de nitritos 11.5 veces con respecto al control, mientras que con respecto al estímulo con LPS e IFN- γ se observó que la producción fue menor. Como control del estímulo LPS e IFN- γ se incubó IFN- γ , LPS y pol B, en esta condición se observó que la producción de nitritos fue similar al control. Asimismo se incubaron los macrófagos con la proteína fosfatasa PP2C, IFN- γ y pol B, y donde observamos que la producción de nitritos es similar a la condición en la que se incubó con la proteína fosfatasa PP2C y pol B.

Los macrófagos de los ratones C57BL/6 fueron estimulados con IFN- γ y LPS y se observó un incremento de la producción de nitritos 4.2 veces mayor con respecto al control. Los macrófagos que fueron estimulados con la proteína fosfatasa PP2C + pol B, mostraron un incremento en la producción de nitritos casi 5 veces mayor con respecto al control, mientras que con respecto al estímulo con LPS + IFN- γ se observó que la producción de nitritos fue mayor. Como control del estímulo IFN- γ + LPS se incubó IFN- γ + LPS + pol B, en esta condición se observó que la producción de nitritos es equivalente a la condición de macrófagos sin estímulo.

Cuando se incubaron a los macrófagos con PP2C + IFN- γ + pol B, y se observó una producción de nitritos fue similar a la condición en la que se incubó con PP2C + pol B.

Finalmente, se observó que la producción de nitritos llega a ser 3 veces mayor en los macrófagos de ratones C57BL/6 que en los macrófagos de ratones BALB/c, aun en la condición donde se incubó con la PP2C de *L. major* (Fig.11).

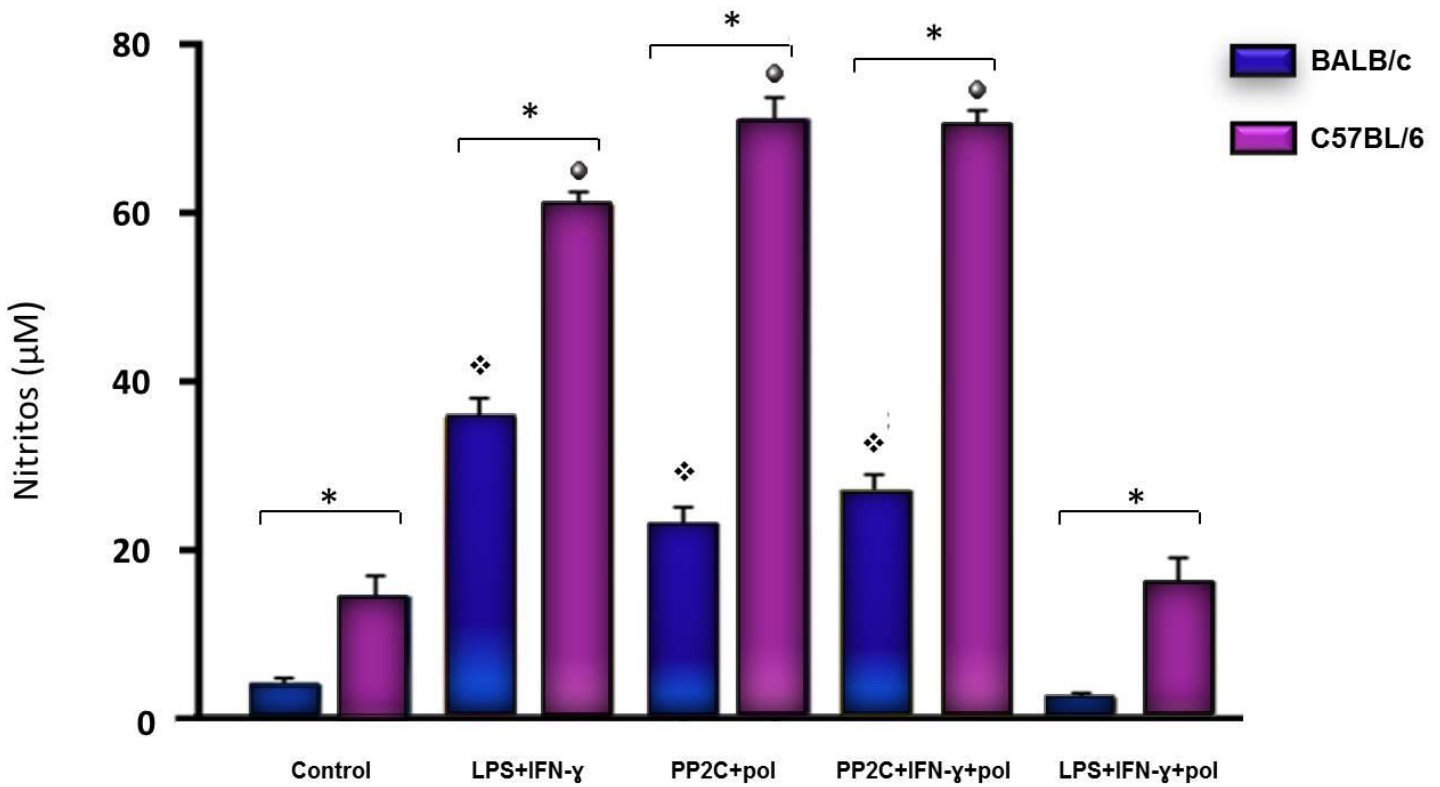


Figura 11. La proteína fosfatasa PP2C induce la producción de nitritos en los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57BL/6

Se estimularon los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57BL/6 con LPS (10 ng), o con proteína fosfatasa PP2C (10 µg), en ausencia o presencia de IFN-γ (100 U/ml) y pol B. Como control negativo se dejaron macrófagos peritoneales sin estimular durante 24 horas (Control). * P <0.05, macrófagos ratones BALB/c estimulados vs. macrófagos de ratones C57BL/6 estimulados (barras ligadas por una barra horizontal). ♦ P <0.05, macrófagos de ratones BALB/c estimulados con LPS+IFN-γ, PP2C+pol, PP2C+IFN-γ+pol, LPS+IFN-γ+pol vs. macrófagos sin estimular. ● P <0.05, macrófagos de ratones C57BL/6 estimulados con LPS+IFN-γ, PP2C+pol, PP2C+IFN-γ+pol, LPS+IFN-γ+pol vs. macrófagos sin estimular.

VII. DISCUSIÓN

La vía de señalización de JAK/STAT regula importantes mecanismos como la síntesis y la liberación de mediadores inflamatorios tales como las citocinas, por lo que su desregulación puede afectar en el control de patógenos.

Se ha demostrado que la fosforilación del factor de transcripción STAT-1 puede ser alterado en los macrófagos infectados por *L. donovani* ⁽⁶⁴⁾. Esto sugiere dos posibles mecanismos: por un lado, *Leishmania* podría activar las fosfatasa del macrófago que desfosforilen a STAT-1 o bien, el parásito podría producir fosfatasa que desfosforilen a STAT-1.

Datos experimentales han demostrado que *Leishmania* puede activar las proteínas tirosina fosfatasa como: SHP-1, PTP1B y TCPTP de los macrófagos, dichas proteínas podrían tener un papel esencial para la progresión de la infección por *Leishmania* ⁽⁶⁵⁾.

Se reportó que en respuesta al estrés, en la vía de señalización de las MAP cinasas (MAPK), la proteína fosfatasa PP2C α de humano desfosforila e inactiva la MAPK p38 y también desfosforila MKK3/6 y MKK4/7, así como también regula negativamente la vía de señalización JNK y p38 ⁽⁶⁶⁾.

En nuestro grupo de laboratorio se ha demostrado que la proteína fosfatasa PP2C de *L. major* participa en la apoptosis del parásito, ya que la incubación de promastigotes de *L. major* con la sanguinarina inhibe la actividad de la proteína fosfatasa PP2C e induce la apoptosis del parásito y este dependiente de MAP p38.

Este trabajo fue enfocado en el estudio de la proteína fosfatasa PP2C de *L. major*, la cual podría ser fundamental en la infección de los macrófagos y la evasión de los mecanismos celulares para eliminar el parásito.

Por lo que la propuesta en este trabajo es que la proteína fosfatasa PP2C del parásito *Leishmania*, podría estar participando activamente en la desregulación de otra vía de señalización como la vía JAK/STAT.

Inicialmente se ocuparon macrófagos de la línea celular Raw 264.7 en los cuales se demostró que la proteína fosfatasa PP2C no indujo la fosforilación de STAT-1. Sin embargo, cuando estos macrófagos fueron incubados durante 30 minutos con IFN- γ y PP2C, se observó que la fosforilación disminuyó con respecto al control de IFN- γ , resultado aún más notorio en la condición donde se adicionó la pol B para eliminar el posible efecto del LPS derivado del proceso de purificación de la proteína fosfatasa PP2C, ya que el LPS puede conducir a la activación del macrófago vía TLR-4 e inducir la fosforilación de STAT-1, estimulada por la producción de IFN- β ⁽⁶⁷⁾, por lo cual la pol B resulta eficaz en la neutralización del efecto del LPS, al unirse al lípido A del LPS, impidiendo su unión al TLR4 ⁽⁶⁸⁾.

Hasta esta parte del trabajo habíamos demostrado que la proteína fosfatasa PP2C disminuye la fosforilación de STAT-1 inducida por IFN- γ .

Posteriormente, se estudió en el modelo murino dos cepas de ratones: una susceptible (BALB/c y una resistente (C57BL/6) en la leishmaniasis. En estas se analizó la fosforilación de STAT-1 en los macrófagos peritoneales incubados con PP2C. Estos resultados mostraron que la proteína fosfatasa PP2C también interfirió en el papel ejercido por el IFN- γ en la fosforilación de STAT-1, ya que la fosforilación inducida por el IFN- γ disminuyó o fue ausente cuando era incubada

conjuntamente con la proteína fosfatasa PP2C en los macrófagos peritoneales de ambas cepas de ratón.

Estos resultados sugieren que la proteína PP2C puede estar actuando como la proteína fosfatasa SHP-1 de los macrófagos que provoca la desfosforilación de residuos tirosina de la cinasa JAK2, aunque no se ha demostrado que la PP2C de *Leishmania* pueda desfosforilar residuos de tirosina, la proteína fosfatasa PP2C de *L. major*, además de dominio para serina/treonina, también tiene un dominio catalítico para residuos tirosina que podría conferirle la capacidad de actividad dual, tal y como se ha descrito en la proteínas PP2C de la bacteria *Salmonella typhi* que desfosforila tanto residuos tirosina como serina/treonina ⁽⁶⁹⁾.

Por lo que falta investigar si PP2C de *L. major* desfosforila a STAT-1 directamente en el residuo Tyr 701 o si activa alguna vía que involucra la desfosforilación de STAT-1 como la activación de SOCS1 o SOCS3. Estas moléculas evitan la fosforilación interactuando directamente con las cinasas JAK e inhibe su actividad catalítica ⁽⁷⁰⁾.

Con respecto a la fosforilación de STAT-1 inducida por IFN- γ en los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57BL/6 fue notoria la diferencia en el grado de fosforilación de STAT-1. Los macrófagos de ratones BALB/c presentaron una menor fosforilación de STAT-1 en comparación con los macrófagos de ratones C57BL/6. Estos resultados concuerdan con el modelo de susceptibilidad y resistencia de la cepa BALB/c y C57BL/6 respectivamente, ya que al haber una mayor fosforilación de STAT-1 en los macrófagos de ratones C57BL/6 resulta en una mayor inducción de iNOS y por tanto es mayor la producción de NO, favoreciendo el control de la infección por *Leishmania*. Por lo que en los ratones

BALB/c, al haber una menor fosforilación de STAT-1 en los macrófagos, la producción de NO resultaría limitada, repercutiendo por lo tanto en el control de la infección ⁽⁷¹⁾.

Dada la relación existente entre la activación de STAT-1 por IFN- γ con la producción de NO, y de esta molécula con el control de la infección, se decidió medir la cantidad de NO producida por los macrófagos peritoneales incubados con la proteína PP2C mediante la cuantificación de los nitritos en el sobrenadante del cultivo. Se observó que en el control de los macrófagos sin estimular, la producción basal de nitritos es 3.4 veces mayor en los macrófagos C57BL/6 que en macrófagos BALB/c. Asimismo, los macrófagos C57BL/6 estimulados con LPS e IFN- γ tuvieron una producción de nitritos 1.7 veces mayor con respecto a los macrófagos de ratones BALB/c. Y finalmente, en los macrófagos C57BL/6 incubados con la proteína PP2C+pol B tuvieron una producción 3 veces mayor que los macrófagos BALB/c. Estas diferencias en la producción de nitritos pueden correlacionarse con los datos que muestran que la actividad de PKC α , una cinasa requerida por el macrófago para el estallido oxidativo, es inhibida en macrófagos de ratones BALB/c por el LPG de *L. mexicana*, lo cual también inhibe el estallido oxidativo. En cambio, en los macrófagos de ratones C57BL/6 incubados con LPG incrementan la actividad de PKC α y a cambio, es menos drástica la inhibición del estallido oxidativo ⁽⁷²⁾, lo cual nuevamente se correlaciona con las diferencias existentes en el modelo murino de la leishmaniasis, en la que los ratones C57BL/6 tienen un mejor control de la infección, gracias a la potente producción de NO a tiempos tempranos de infección.

Por otro lado, se observó que la proteína fosfatasa PP2C + pol B incrementó la producción de nitritos en los macrófagos, 11.5 veces en los macrófagos de BALB/c y 4.2 en los macrófagos de C57BL/6 con respecto a su respectivo control. En el caso de la condición donde fue incubada la proteína fosfatasa PP2C, el IFN- γ y pol B, no se observó un efecto potenciador por parte del IFN- γ , comparado con la condición donde fue incubada la proteína fosfatasa PP2C + pol B.

Aun no queda claro cuál es el mecanismo por el cual la proteína fosfatasa PP2C podría estar interactuando con la inhibición de la fosforilación de STAT-1 y a la vez inducir la producción de NO. Sin embargo, se sabe que la proteína PP2C δ , también llamada Wip1 a través de STAT1 regula el desarrollo de los neutrófilos ⁽⁷³⁾. En el caso de las enfermedades infecciosas, posiblemente la proteína fosfatasa PP2C se une a algún receptor TLR. Se sabe que algunas proteínas fosfatasas de virus se unen a TLR 4 ^(74, 75, 76) y que además, la proteína llamada profilina de *Toxoplasma gondii* se une a TLR 11 ⁽⁷⁷⁾.

La activación por TLR4 induce la producción de NO ⁽⁵⁰⁾, por lo que si la PP2C estuviera interactuando con TLR4, explicaría la alta producción de NO cuando los macrófagos son incubados con la proteína fosfatasa PP2C durante 24 horas.

Por otro lado, se ha demostrado que hay una relación estrecha entre IFN- γ y TLR4, vías que también están implicadas en la activación de las SOCS. Ya que a tiempos largos de coestimulación de los macrófagos con un agonista de TLR4 e IFN- γ , se produce una inhibición de la señal del IFN- γ , evitando la fosforilación de STAT-1, probablemente mediado por la activación de SOCS1 y SOCS3 ⁽⁷⁸⁾. Y aunque SOCS1 es capaz de reducir la generación de NO inducida por IFN- γ , no

regula la producción mediada por la vía de NF- κ B ⁽⁷⁹⁾, vía por la cual, se podría estar produciendo el NO inducido por la PP2C.

Sin embargo, es necesario conocer el posible mecanismo por el cual la proteína fosfatasa PP2C podría estar regulando la fosforilación de STAT-1 inducida por el IFN- γ y asimismo la producción de óxido nítrico.

VIII. CONCLUSIONES

- 1) La proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. major* incubada con los macrófagos durante tiempos cortos como 30 minutos pueden reducir la fosforilación de STAT-1 (Tyr 701) inducida por IFN- γ .
- 2) La PP2C incubada por tiempos más largos como 24 horas evita la fosforilación de STAT-1.
- 3) La PP2C es capaz de inducir la producción de NO.

IX. PERSPECTIVAS

- ✚ Analizar el mecanismo dependiente de TLR o STAT-1 por el que la proteína fosfatasa PP2C incrementa el NO.
- ✚ Identificar el posible receptor que utiliza la PP2C para la estimulación de la producción de NO.
- ✚ Utilizar la PP2C como inmunomodulador en la leishmaniasis.

X. REFERENCIAS

1. Banuls, A. L., M. Hide, et al. (2007). "*Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans." *Adv Parasitol* 64: 1-109.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS)
<http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/Leishmaniasis.pdf>
3. Zetina, J.L.J. (2008). "Leishmaniasis cutánea en el estado de Quintana Roo, México". *Dermatología Rev Mex* 52(1).
4. McGwire, B. S. and A. R. Satoskar. (2014). "Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment." *Qjm* 107(1): 7-14.
5. Shio, M. T., K. Hassani, et al. "Host cell signalling and *Leishmania* mechanisms of evasion." *J Trop Med* 2012: 819512.
6. Olivier, M., D. J. Gregory, et al. (2005). "Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view." *Clin Microbiol Rev* 18(2): 293-305.
7. Gupta, G., S. Oghumu, et al. (2013). "Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis." *Adv Appl Microbiol* 82: 155-84.
8. Bates, A., E. Rogers. (2004). "New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*". *Curr Mol Med.* 4(6):601-9.
9. McGwire, B., A. Satoskar. (2014). "Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment". *QJM.* 107(1):7-14
10. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)
<http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/Pages/lifecycle.aspx>
11. Sacks, D. and N. Noben-Trauth (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice." *Nat Rev Immunol* 2(11): 845-58.
12. Pimenta, P. F., E. M. Saraiva, et al. (1991). "The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*." *Exp Parasitol* 72(2): 191-204.

13. Spath, G. F., L. A. Garraway, et al. (2003). "The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16): 9536-41.
14. Ilg, T., R. Etges, et al. (1992). "Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan." *J Biol Chem* 267(10): 6834-40.
15. Halle, M., M. A. Gomez, et al. (2009). "The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation." *J Biol Chem* 284(11): 6893-908.
16. Schneider, P., J. P. Rosat, et al. (1992). "*Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages." *Exp Parasitol* 75(2): 196-206.
17. Kulkarni, M. M., W. R. McMaster, et al. (2006). "The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing." *Mol Microbiol* 62(5): 1484-97.
18. Brittingham, A., G. Chen, et al. (1999). "Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin." *Infect Immun* 67(9): 4477-84.
19. Luan, S. (2003). "Protein phosphatases in plants." *Annu Rev Plant Biol* 54: 63-92.
20. Stoker, A. W. (2005). "Protein tyrosine phosphatases and signaling." *J Endocrinol* 185(1): 19-33
21. Lammers, T. and S. Lavi (2007). "Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42(6): 437-61.
22. Arino, J., A. Casamayor, et al. "Type 2C protein phosphatases in fungi." *Eukaryot Cell* 10(1): 21-33.
23. Klumpp, S., C. Hanke, et al. (1994). "A membrane-bound protein phosphatase type 2C from *Paramecium tetraurelia*. Purification, characterization, and cloning." *J Biol Chem* 269(52): 32774-80.
24. Shi, Y. (2009). "Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure." *Cell* 139(3): 468-84

25. Aburai, N., M. Yoshida, et al. "Sanguinarine as a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 2C in vitro and induces apoptosis via phosphorylation of p38 in HL60 cells." *Biosci Biotechnol Biochem* 74(3): 548-52.
26. Brenchley, R., H. Tariq, et al. (2007). "The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains." *BMC Genomics* 8: 434.
27. Nascimento, M., W. W. Zhang, et al. (2006). "Identification and characterization of a protein-tyrosine phosphatase in *Leishmania*: Involvement in virulence." *J Biol Chem* 281(47): 36257-68.
28. Aguirre, M., A. Escalona, et al. (2006). "*Leishmania major*: detection of membrane-bound protein tyrosine phosphatase". *Parasitology*. 132(Pt 5):641-9
29. Escalona- Montaña, A. "Estudio funcional de la proteína fosfatasa de *Leishmania* y análisis de su participación en la infección de macrófagos". Tesis. Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM.
30. Escalona, A.R., D. Pardavé, et al. (2010). *Leishmania mexicana* promastigotes secrete a protein tyrosine phosphatase. *Parasitol Research*. 107.(2). 509-515.
31. Burns, J. M., Jr., M. Parsons, et al. (1993). "Molecular cloning and characterization of a 42-kDa protein phosphatase of *Leishmania chagasi*." *J Biol Chem* 268(23): 17155-61.
32. Escalona- Montaña, A. (2007). Clonación y purificación de la proteína fosfatasa PP2C de *Leishmania major*. Tesis. Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM.
33. Escalona- Montaña, A. (2015). Artículo en preparación.
34. Ornelas-Cruces, M. (2014). Participación de la proteína fosfatasa 2C en la modulación de la apoptosis del parásito *Leishmania*. Tesis. Licenciatura en Biología. UNAM
35. Harrison, A. D. (2012). "The JAK/STAT pathway". *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4(3).
36. Schindler, C. and C. Plumlee (2008). "Interferons and the JAK-STAT pathway." *Semin Cell Dev Biol* 19(4): 311-8.

37. Shuai, K. and B. Liu (2003). "Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system." *Nat Rev Immunol* 3(11): 900-11.
38. Shuai, K., C. M. Horvath, et al. (1994). "Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions." *Cell* 76(5): 821-8.
39. Darnell, J. E., Jr. (1997). "STATs and gene regulation." *Science* 277(5332): 1630-5.
40. David, E.L. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Stats: transcriptional control and biological impact". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3:651-662
41. Buettner, R., L. B. Mora, et al. (2002). "Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention." *Clin Cancer Res* 8(4): 945-54.
42. Boehm, U., T. Klamp, et al. (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." *Annu Rev Immunol* 15: 749-95.
43. Schindler, C., D. E. Levy, et al. (2007). "JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines." *J Biol Chem* 282(28): 20059-63.
44. Krebs, D. L. and D. J. Hilton (2001). "SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling." *Stem Cells* 19(5): 378-87.
45. Diehl, S., J. Anguita, et al. (2000). "Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1." *Immunity* 13(6): 805-15.
46. Endo, T. A., M. Masuhara, et al. (1997). "A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases." *Nature* 387(6636): 921-4.
47. Krebs, D., J. Hilton. (2000). "SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling" *J Cell Sci* 113 (Pt 16): 2813-9
48. Xu, D. and C. K. Qu (2008). "Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway." *Front Biosci* 13: 4925-32.
49. Yi, T. L., J. L. Cleveland, et al. (1992). "Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13." *Mol Cell Biol* 12(2): 836-46.

50. Bertholet, S., H. L. Dickensheets, et al. (2003). "*Leishmania donovani*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation." *Infect Immun* 71(4): 2095-101.
51. Späth, G. F., P. Schlesinger, et al. (2009). "A novel role for Stat1 in phagosome acidification and natural host resistance to intracellular infection by *Leishmania major*." *PLoS Pathog* 5(4): e1000381.
52. Nandan, D. and N. E. Reiner (1995). "Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1." *Infect Immun* 63(11): 4495-500.
53. Bhardwaj, N., L. E. Rosas, et al. (2005). "*Leishmania* inhibits STAT1-mediated IFN-gamma signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1beta by *Leishmania mexicana*." *Int J Parasitol* 35(1): 75-82.
54. Blanchette, J., N. Racette, et al. (1999). "*Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation." *Eur J Immunol* 29(11): 3737-44.
55. Forget, G., K. A. Siminovitch, et al. (2001). "Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine Leishmaniasis." *Eur J Immunol* 31(11): 3185-96.
56. Xie, Q. W., Y. Kashiwabara, et al. (1994). "Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase." *J Biol Chem* 269(7): 4705-8.
57. Billack, B. (2006). "Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B." *Am J Pharm Educ* 70(5): 102.
58. Aktan, F. (2004). "iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation." *Life Sci* 75(6): 639-53.
59. Diaz-Guerra, M. J., A. Castrillo, et al. (1999). "Negative regulation by phosphatidylinositol 3-kinase of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages." *J Immunol* 162(10): 6184-90.

60. Blanchette, J., I. Abu-Dayyeh, et al. (2009). "Regulation of macrophage nitric oxide production by the protein tyrosine phosphatase Src homology 2 domain phosphotyrosine phosphatase 1 (SHP-1)." *Immunology* 127(1): 123-33.
61. Stenger, S., H. Thuring, et al. (1994). "Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*." *J Exp Med* 180(3): 783-93.
62. Taylor, B., S. Liu, et al. (1999). "The role of protein phosphatases in the expression of inducible nitric oxide synthase in the rat hepatocyte". *Hepatology* 29(4):1199-207
63. Switzer, C., D. Wink, et al. (2011). "Nitric oxide and protein phosphatase 2A provide novel therapeutic opportunities in ER-negative breast cancer". *Trends Pharmacol Sci* 32(11):644-51
64. Bertholet, S., H. L. Dickensheets, et al. (2003). "*Leishmania donovani*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation." *Infect Immun* 71(4): 2095-101.
65. Gomez, M. A., I. Contreras, et al. (2009). "*Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases." *Sci Signal* 2(90): ra58.
66. Takekawa, M., T. Maeda, et al. (1998). "Protein phosphatase 2C alpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways." *Embo J* 17(16): 4744-52.
67. Rhee, S.H., B.W. Jones. (2003). "Toll-like Receptors 2 and 4 Activate STAT1 Serine Phosphorylation by Distinct Mechanisms in Macrophages". *J Biol Chem.* 278(25):22506-12.
68. Cardoso, L., M. Araujo. (2007). "Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis". *Microb Cell Fact.* 6:1.
69. Lai, S. M. and H. Le Moual (2005). "PrpZ, a *Salmonella enterica* serovar Typhi serine/threonine protein phosphatase 2C with dual substrate specificity." *Microbiology* 151(Pt 4): 1159-67.

70. Whyte, C., E. Bishop. (2011). "Supressor of cytokine signaling (SOCS) 1 is a key determinant of differential macrophage activation and function". J Leukoc Biol. 90(5):845-54.
71. Stenger, S., H. Thuring, et al. (1994). "Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*." J Exp Med 180(3): 783-93.
72. Delgado, J., I. Becker, et al. (2010). "*Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKCalpha-induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice". Parasite Immunol. 32 (6):440-9
73. Liu, G., B. Sun. (2013). "Phosphatase Wip1 negatively regulates neutrophil development through p38 MAPK-STAT1". Blood. 121(3):519-29.
74. Kurt-Jones, E. A., L. Popova, et al. (2000). "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus." Nat Immunol 1(5): 398-401.
75. Rassa, J. C., J. L. Meyers, et al. (2002). "Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4." Proc Natl Acad Sci U S A 99(4): 2281-6.
76. Burzyn, D., J. C. Rassa, et al. (2004). "Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus." J Virol 78(2): 576-84.
77. Yarovinsky, F., D. Zhang, et al. (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." Science 308(5728): 1626-9.
78. Dalpke, H., S. Eckerle. (2003). "Triggering of Toll-like receptors modulates IFN-gamma signaling: involvement of serine 727 STAT1 phosphorylation and suppressors of cytokine". Eur J Immunol. 33(7):1776-87.
79. Prêle, C., E. Woodward. (2008). "SOCS1 regulates the IFN but not NFkB pathway in TLR- stimulated human monocytes and macrophages". J Immunol. 181(11): 8018–8026.