

# El ADN de *Leishmania mexicana* activa al macrófago murino e induce aumento en la expresión de TLR9

Berenice Martínez-Salazar, Miriam Berzunza-Cruz e Ingeborg Becker\*

Departamento de Medicina Experimental, Hospital General de México, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 23 de enero de 2008

Aceptado: 25 de enero de 2008

## RESUMEN

**Antecedentes:** Los macrófagos son células de la respuesta inmune que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) mediante receptores presentes en la superficie de la célula como en compartimentos intracelulares, como los TLR (toll like receptors). Distintos TLR reconocen ligandos que comparten múltiples patógenos. La unión de TLR con su ligando desencadena una cascada de señalización que termina en la producción de citocinas y moléculas coestimuladoras a través de la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. Nuestro grupo demostró que el lipofosfoglucono de *Leishmania* es un ligando de TLR2 que activa células NK. Schieicher y cols.<sup>12</sup> informo recientemente la activación de células dendríticas plasmacitoides con ADN genómico de *Leishmania infantum* a través de TLR9, con alta producción de IFN tipo I.

**Objetivo:** En el presente trabajo exploramos si el ADN de *Leishmania mexicana* contiene motivos CpG no metilados capaces de activar al macrófago murino derivado de médula ósea, como ha sido descrito anteriormente para motivos CpG no metilados de ADN bacteriano.

**Resultados y conclusiones:** Encontramos que el ADN de *Leishmania mexicana* posee motivos CpG no metilados que activan macrófagos murinos de la cepa BALB/c, llevando a la producción de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  e IL12<sub>p40</sub> y a la sobreexpresión del mRNA de TLR9.

### Palabras clave:

TLR9, ADN, *Leishmania mexicana*

## SUMMARY

**Background:** Macrophages are immune system cells that recognize pathogen associated molecular patterns (PAMPs) through receptors that can be located on the cell membrane or in intracellular compartments, such as the TLR (toll like receptors). Different TLRs bind to ligands shared among multiple pathogens. The binding of ligands to TLRs induces a signaling cascade that leads to cytokine and co-stimulatory molecule production due to the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. We demonstrated that *Leishmania lipophosphoglycan* (LPG) is a ligand for TLR2, leading to NK-cell activation. Schieicher et al.<sup>12</sup> recently reported that genomic DNA from *Leishmania infantum* activates plasmacitoid dendritic cells through TLR9, leading to IFN type I production.

**Objective:** In the present study we explored whether *Leishmania mexicana* DNA contained non-methylated CpG motifs able to activate murine bone marrow derived macrophages, as previously described for bacterial DNA containing CpG motifs.

**Results and conclusions:** We observed that *Leishmania mexicana* DNA contains non-methylated CpG motifs able of activating murine bone marrow derived macrophages, leading to the production of proinflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  and IL-12<sub>p40</sub> as well as the over expression of mRNA for TLR9.

### Key words:

TLR9, DNA, *Leishmania mexicana*

## Introducción

La leishmaniosis es una enfermedad causada por un parásito protozoario flagelado del género *Leishmania* que infecta principalmente a macrófagos del mamífero hospedero.<sup>1</sup> Esta enfermedad produce diferentes manifestaciones clínicas, desde úlceras cutáneas hasta destrucción masiva del tejido que puede causar la muerte. Las manifestaciones clínicas dependen tanto de la respuesta inmune del hospedero como de la especie de *Leishmania* infectante.<sup>2</sup> En México, la leishmaniosis cutánea es causada por *Leishmania mexicana*.<sup>3</sup>

La respuesta inmune a *Leishmania* comienza con la inoculación del parásito por el vector (díptero) perteneciente al género *Lutzomyia*, la cual induce una respuesta inflamatoria ocasionando la migración de leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos hacia el sitio de la picadura.<sup>4</sup> *Leishmania* posee diversas moléculas en su superficie que actúan como factores de virulencia y como moléculas de evasión contra el sistema inmune del hospedero. Estos mecanismos incluyen un denso glucocáliz compuesto por lipofosfogluconos, glucosilinositolfosfolípidos y, además, el parásito secreta glucoconjugados, proteofosfogluconos, fosfatasas ácidas y la gp63, una metaloproteasa abundante en

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Ingeborg Becker. Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, 06726 México D.F., México. Tel.: (55) 5623 2674. Correo electrónico: becker@servidor.unam.mx

la superficie de los promastigotes.<sup>5</sup> La gp63 y los lipofosfolucanos son las moléculas más abundantes en la superficie del parásito y funcionan como ligandos para receptores del macrófago, facilitando la entrada del parásito en la célula.<sup>1,5</sup>

En los macrófagos, al igual que en otras células del sistema inmune innato, se han descrito receptores que reconocen a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), entre los que se encuentran los receptores TLR (*toll like receptors*). Se han informado 11 TLR en mamíferos y 10 en humanos (TLR1-TLR10).<sup>6</sup> La unión de TLR con su ligando desencadena la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas coestimuladoras dependiendo del tipo de antígeno reconocido, participando en el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmune adaptativa.<sup>7</sup>

TLR9 es un receptor que se localiza en el retículo endoplásmico y se ha demostrado que reconoce motivos CpG presentes en el ADN no metilado de bacterias.<sup>8,9</sup> La unión de TLR9 con su ligando dentro del macrófago desencadena la producción de citocinas proinflamatorias a través de la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B, en un evento dependiente de MyD88.<sup>10</sup> En células NK se ha descrito que el lipofosfolucano de *Leishmania* también es un ligando de receptores TLR2 e induce la producción de IFN $\gamma$  por estas células.<sup>11</sup> También se ha informado que las células dendríticas mieloides estimuladas con ADN genómico de *Leishmania infantum* secretan altos niveles de IFN $\alpha/\beta$ , la cual fue dependiente de TLR9. Estas citocinas promovieron la activación de las células NK.<sup>12</sup> Recientemente se demostró que TLR9 también reconoce motivos CpG en el ADN de *Trypanosoma cruzi* y ADN presente en la superficie de la hemozoína de *Plasmodium falciparum*.<sup>13,14</sup>

En este trabajo se analizó si el ADN de *Leishmania mexicana* contiene motivos CpG no metilados que pudieran ser reconocidos por el TLR9 de macrófagos murinos derivados de médula ósea. Encontramos que el ADN induce sobreexpresión del mRNA de TLR9 en macrófagos, así como la producción de las citocinas TNF $\alpha$  e IL12<sub>p40</sub>, mientras que el estímulo con ADN de linfocitos humanos no modificó la expresión del receptor y tampoco indujo la producción de citocinas. Estos datos sugieren la participación del receptor TLR9 en el reconocimiento del ADN de *Leishmania mexicana*.

## Material y métodos

### Obtención de parásitos

Se utilizaron promastigotes de *Leishmania mexicana*, de la cepa "68" proveniente de un paciente con leishmaniosis cutánea localizada aislada en Campeche. Los parásitos fueron mantenidos y cultivados por cinco días en medio bifásico Novy-Nicolle-MacNeal y se recuperaron en forma de promastigotes en fase metacíclica.

### Purificación de ADN de *Leishmania mexicana* y de linfocitos humanos

Los parásitos fueron lavados con solución amortiguadora de fosfatos dos veces y lisados con el reactivo TRIzol® (Invitro-

gen, Life Technologies, Carlsbad, California). Se extrajo el ADN como se indica en las instrucciones de uso, con algunas modificaciones para eliminar proteínas contaminantes. El ADN se lavó con citrato de sodio 0.1 M en etanol a 10%, se centrifugó y eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió con EDTA 5 mM y proteinasa K, a una concentración de 100  $\mu$ g/ml y se incubó toda la noche a 55 °C. Posteriormente se centrifugó a 2100 x g durante 10 minutos a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 1 ml de citrato de sodio a 0.1 M en etanol a 10% y se continuó con el procedimiento como se describe en las instrucciones de uso. El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro Beckman DU® 530 y se almacenó a -20 °C.

Los linfocitos de sangre periférica humana se obtuvieron de donadores voluntarios sanos que dieron su consentimiento para el estudio. Se obtuvieron las células mediante un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Se lisaron 10 x 10<sup>6</sup> las células con TRIzol® para extraer el ADN con el mismo método con el que se extrajo el ADN del parásito. El ADN de linfocitos humanos se utilizó como control negativo.

### Digestión con HpaII

Para verificar la presencia de motivos CpG, se realizó la digestión del ADN de *Leishmania mexicana* con la enzima de restricción HpaII que corta el ADN no metilado en sitios específicos CCGG. Se colocaron 5  $\mu$ l de ADN tanto del parásito como de linfocitos humanos en 1  $\mu$ l de solución amortiguadora, 1  $\mu$ l (10 U) de la enzima HpaII y 3  $\mu$ l de agua inyectable estéril. Se incubó durante 18 horas a 37 °C y se analizó el producto de la digestión en un gel de agarosa a 2% teñido con 0.5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio y se visualizó en un analizador de imágenes (Multimage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation).

### Análisis de la presencia de proteínas contaminantes en el ADN de *Leishmania mexicana* por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y teñido con plata

Para determinar si el ADN purificado de *Leishmania mexicana* estaba contaminado con proteínas del parásito se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida a 10% con SDS, en el cual se colocaron 10  $\mu$ g del ADN de *Leishmania mexicana*, 10  $\mu$ g del lisado del parásito y 4  $\mu$ g de proteinasa K (la misma concentración utilizada en la preparación del ADN del parásito). Se analizó la presencia de proteínas mediante una tinción de plata (Silver Stain Plus de Bio-Rad, Hercules, California).

### Ratones

Se utilizaron ratones sanos de la cepa BALB/c, de seis a ocho semanas de edad. Los ratones fueron criados en el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. El manejo de los animales se realizó bajo los lineamientos éticos recomendados en el control de bioterios.

### Obtención de macrófagos de médula ósea

Se sacrificó el ratón por dislocación cervical y se extrajo la médula ósea del fémur mediante inyección con solución amortiguadora de fosfatos. Las médulas obtenidas se centrifugaron a  $300 \times g$  durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Las células se cultivaron en cajas Petri con medio DMEM (GIBCO, Invitrogen Life Technologies) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina y M-CSF recombinante (PeproTech, Rocky Hill, NJ) para diferenciar las células progenitoras a macrófagos. Se cultivaron durante cinco días a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Los macrófagos adheridos fueron desprendidos de las cajas Petri con solución amortiguadora de fosfatos en frío.

### Análisis del mRNA de TLR9 en macrófagos estimulados con ADN de *Leishmania mexicana* mediante RT-PCR

Para el análisis de la expresión de mRNA de TLR9 mediante RT-PCR se incubaron  $1 \times 10^6$  macrófagos derivados de médula ósea con  $10 \mu\text{g/ml}$  de ADN de *Leishmania mexicana*,  $10 \mu\text{g/ml}$  de ADN de linfocitos humanos como control negativo y una condición sin estimular. Como controles positivos se utilizaron los nucleótidos CpG ODN (Mouse CpG, Hycult Biotechnology, Uden, Netherlands), los cuales son ligandos específicos para TLR9. Los CpG se reconstituyeron en  $100 \mu\text{l}$  de agua inyectable estéril y para estimular a los macrófagos se utilizaron a una concentración final de  $3 \mu\text{g/ml}$ . Los macrófagos fueron cultivados con los distintos estímulos durante tres horas en 1 ml de medio RPMI-1640 (GIBCO, Invitrogen Life Technologies) suplementado con 10% de SFB a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Para la extracción del ARN total se lisaron  $1 \times 10^6$  macrófagos con TRIzol. Se extrajo el ARN total y se amplificó  $1 \mu\text{g}$  con el "kit" Super Script III One-Step RT-PCR System (Life Technologies) con oligonucleótidos específicos para TLR9.<sup>15</sup> Como control se utilizó HPRT (hipoxantina guanina fosforibosil transferasa). Los oligonucleótidos para TLR9 fueron: 5'-GCACAGGAGCGGTGAAGGT-3' y 5'-GCA-GGGTCTCAGTGGAG-3'. Los oligonucleótidos para HPRT fueron 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3' y 5'-GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT-3'.

El RT-PCR se realizó en un termociclador (AB Applied Biosystems Thermal Cycler) y el producto se analizó en un gel de agarosa a 1.5% teñido con  $0.5 \mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio. Se realizó el análisis densitométrico de las bandas en un analizador de imágenes.

### Cuantificación de citocinas $\text{TNF}\alpha$ , $\text{IL}12_{\text{p40}}$ e $\text{IL}10$ por ELISA

Para el análisis de la producción de citocinas  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL}12_{\text{p40}}$  e  $\text{IL}10$  se incubaron  $1 \times 10^6$  macrófagos con  $10 \mu\text{g/ml}$  y  $20 \mu\text{g/ml}$  de ADN de *Leishmania mexicana*,  $3 \mu\text{g/ml}$  de CpG como control positivo,  $10 \mu\text{g/ml}$  de ADN de linfocitos como control negativo y una condición sin estímulo, durante 18 horas a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . La cuantificación de las citocinas se realizó mediante ELISA de los sobrenadantes del cultivo. Para cada

citocina se utilizaron las siguientes concentraciones de anticuerpos de captura:  $2 \mu\text{l/ml}$  para  $\text{TNF}\alpha$  a pH 6;  $1 \mu\text{l/ml}$  para  $\text{IL}12_{\text{p40}}$  y  $2.5 \mu\text{l/ml}$  para  $\text{IL}10$  a pH 9. Se colocaron  $50 \mu\text{l}$  por pozo y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  toda la noche. Se lavaron las placas cuatro veces con una solución amortiguadora de fosfatos con 0.01% de Tween 80. Se bloqueó la placa agregando  $200 \mu\text{l}$  por pozo de una solución bloqueadora durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de un lavado extenso se colocaron  $100 \mu\text{l}$  de los sobrenadantes y se incubó la placa a  $4^\circ\text{C}$  toda la noche. La placa se lavó cuatro veces y se colocaron  $100 \mu\text{l}$  de los anticuerpos de detección ( $2 \mu\text{l/ml}$  para  $\text{TNF}\alpha$ ;  $0.5 \mu\text{l/ml}$  para  $\text{IL}12_{\text{p40}}$ ;  $1 \mu\text{l/ml}$  para  $\text{IL}10$ ) diluidos en albúmina bovina a 1% con 0.05% de Tween 20. Se incubó la placa durante una hora a temperatura ambiente, se lavó seis veces y se agregó estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida 1:2000 en albúmina bovina a 1% con 0.05% de Tween 20 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la placa ocho veces. Finalmente se agregaron  $100 \mu\text{l}$  de la solución reveladora compuesta por un regulador de sustrato y sustrato de fosfatasa. La placa fue leída en un lector de ELISA (312e BIO-TEK Instruments, Winooski, Vermont) a una longitud de onda de 405 nm. Todas las incubaciones se hicieron en presencia de sulfato de polimixina B para evitar una posible contaminación con lipopolisacáridos. Los experimentos se hicieron por triplicado para cada citocina.

El análisis estadístico de la producción de citocinas se realizó mediante U de Mann-Whitney y los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## Resultados

### Motivos CpG en el ADN de *Leishmania mexicana*

Para comprobar si el ADN de *Leishmania mexicana* posee motivos CpG no metilados que puedan ser reconocidos por el TLR9 presente en macrófagos murinos, se hizo una digestión con la enzima de restricción HpaII. En la figura 1 se observa que el ADN del parásito fue digerido por la enzima (carril 2), desplegando una serie de cortes visibles a lo largo del carril, mientras que el ADN metilado de linfocitos humanos no fue digerido (carril 4). En los carriles 1 y 3 se muestran los ADN de *Leishmania mexicana* y de linfocitos humanos no digeridos, respectivamente. Este resultado demuestra que el ADN de *Leishmania mexicana* no es metilado y que posee motivos CpG. Sin embargo, no se debe descartar que el ADN contenga otros motivos CpG en un contexto diferente al reconocido por la enzima HpaII y que también pueden activar una respuesta inmune a través de TLR9.

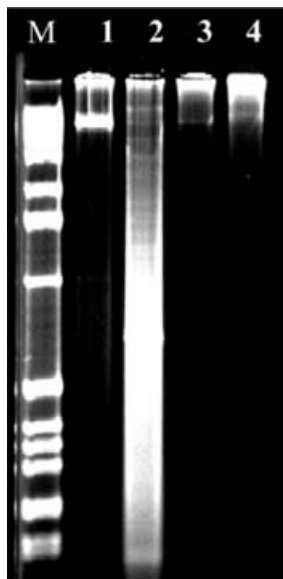
### Proteínas contaminantes en el ADN de *Leishmania mexicana*

Para eliminar la posibilidad de que los macrófagos incubados con los distintos ADN respondieran ante la presencia de proteínas contaminantes, se analizó la posible presencia de proteínas por medio de electroforesis en gel de poliacrilami-

da teñido con plata. Se observó que el ADN del parásito no contenía trazas de proteínas que pudieran estar estimulando la producción de citocinas. Tampoco se detectó la proteína K que se utilizó para la eliminación de proteínas durante la purificación del ADN (datos no mostrados).

**RT-PCR de TLR9 en macrófagos murinos estimulados con ADN de *Leishmania mexicana***

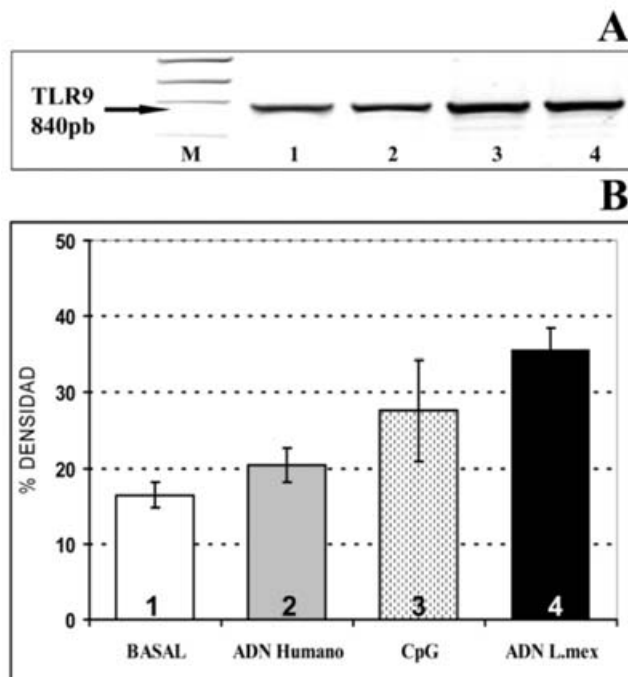
Se realizó un RT-PCR con oligonucleótidos específicos para TLR9 y HPRT. Se obtuvo el ARN de  $1 \times 10^6$  macrófagos murinos derivados de médula ósea, que fueron incubados durante tres horas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de ADN de *Leishmania mexicana*, 10  $\mu\text{g/ml}$  de ADN de linfocitos humanos (control negativo), 3  $\mu\text{g/ml}$  de CpG (control positivo) y de macrófagos sin estimular. En la figura 2A se observa que el ADN de *Leishmania mexicana* indujo un incremento en la expresión del mRNA de TLR9 (carril 4), al igual que el control positivo de CpG (carril 3). En contraste, el ADN de los linfocitos humanos no modificó la expresión del mRNA de TLR9 (carril 2), que se parece a la expresión observada en condiciones basales (carril 1). En el análisis densitométrico de las bandas del RT-PCR se observa que el estímulo con el ADN del parásito indujo una sobreexpresión en el mRNA del receptor TLR9 respecto a las células incubadas con el ADN humano o con las células sin estímulo (Figura 2B). Este resultado sugiere la participación de TLR9 en el reconocimiento del ADN de *Leishmania mexicana*.



**Figura 1.** El ADN de *Leishmania mexicana* y de linfocitos humanos se digirió con la enzima de restricción HpaI y el producto se visualizó con luz ultravioleta en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En los carriles se observa marcador molecular (M); carril 1, ADN de *Leishmania mexicana* sin HpaI; carril 2, ADN de *Leishmania mexicana* digerido con HpaI; carril 3, ADN de linfocitos humanos sin HpaI; carril 4, ADN de linfocitos humanos con HpaI.

**Producción y secreción de citocinas:  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL12}_{\text{p40}}$ ,  $\text{IL10}$**

Se analizaron las citocinas secretadas por macrófagos derivados de médula ósea estimulados durante 18 horas con 10  $\mu\text{g/ml}$  y 20  $\mu\text{g/ml}$  de ADN de *Leishmania mexicana*, con 10  $\mu\text{g/ml}$  de ADN de linfocitos y con 3  $\mu\text{g}$  de CpG. En el cuadro I se muestran los promedios de cuatro experimentos que se hicieron por triplicado para la cuantificación de  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL10}$ , y de cinco experimentos para  $\text{IL12}_{\text{p40}}$ . Encontramos que los estímulos ejercidos por 10  $\mu\text{g/ml}$  y 20  $\mu\text{g/ml}$  de ADN de *Leishmania mexicana* sobre los macrófagos indujeron



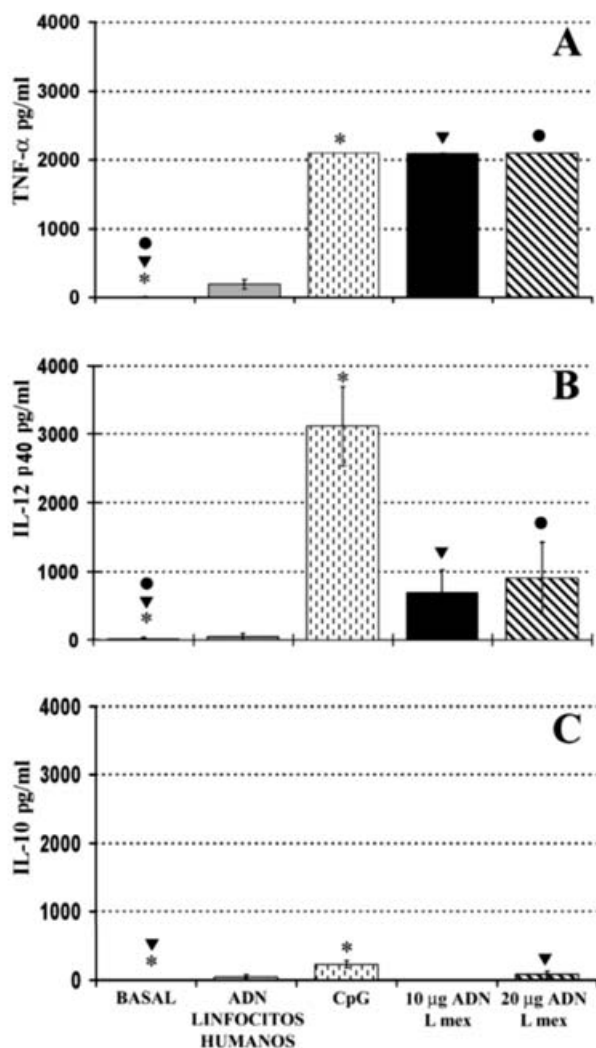
**Figura 2.** Análisis de la especificidad de TLR9. A) Producto de la RT-PCR de macrófagos murinos incubados con diferentes antígenos. M=Marcador molecular FX174 RF DNA/Hae III Fragments; carril 1, medio de cultivo; carril 2, 10  $\mu\text{g}$  de ADN de linfocitos humanos; carril 3, 3  $\mu\text{g}$  de CpG; carril 4, 10  $\mu\text{g}$  de ADN de *Leishmania mexicana*. B) Análisis de la densidad de las bandas del producto de la RT-PCR. Promedios  $\pm$  error estándar de dos experimentos.

**Cuadro I.** Resultados de la cuantificación de citocinas producidas por los macrófagos incubados con diferentes estímulos

pg/ml	Basal	ADN Lin. humanos	CpG	10 $\mu\text{g}$ ADN L. mex	20 $\mu\text{g}$ ADN L. mex
$\text{TNF}\alpha$	0.00	192.27	2100.00	2100.00	2100.00
$\text{IL12}_{\text{p40}}$	18.00	46.00	3112.22	693.15	902.32
$\text{IL10}$	0.00	44.67	229.89	0.00	85.36

Promedios de los resultados de  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-12}_{\text{p40}}$  e  $\text{IL-10}$ .





**Figura 3.** Análisis de la producción de citocinas. Macrófagos derivados de médula ósea fueron estimulados durante 18 horas con 10 µg de ADN de linfocitos humanos (control negativo), 3 µg de CpG, 10 y 20 µg de ADN de *Leishmania mexicana*, y una condición sin estimular (basal). Los sobrenadantes fueron recolectados para la cuantificación de citocinas. Los símbolos muestran los resultados estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ). A) Producción de TNF $\alpha$ . B) Producción de IL12 $_{p40}$ . C) Producción de IL10. Para TNF $\alpha$  e IL10 se muestran los promedios de cuatro experimentos  $\pm$  error estándar; en IL12 $_{p40}$ , cinco experimentos.

una intensa producción de TNF $\alpha$ , obteniéndose el valor máximo detectable en la curva de concentración equivalente a 2100 pg/ml, en ambos casos. Este elevado valor también se obtuvo en células estimuladas con CpG. Los incrementos en la producción de TNF $\alpha$  obtenidos con ADN de *Leishmania mexicana* y con CpG fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ), al ser comparados contra las células sin estimular. A diferencia de esto, las células estimuladas con el ADN de linfocitos humanos no incrementaron su producción de TNF $\alpha$  (Figura 3A).

Asimismo, la estimulación con ambas concentraciones de ADN de *Leishmania mexicana* indujo incrementos en la producción de IL12 $_{p40}$  por los macrófagos de médula ósea (693 pg/ml con el estímulo de 10 µg/ml y 902 pg/ml con el estímulo de 20 µg/ml de ADN de *Leishmania*), los cuales fueron significativamente mayores que el valor obtenido con el ADN de linfocitos humanos (46 pg/ml). El estímulo con CpG indujo una intensa producción de IL12 $_{p40}$  (3112 pg/ml), que igual que las anteriores fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 3B).

El análisis de la producción de IL10 mostró que los macrófagos estimulados con 10 µg de ADN del parásito no produjeron IL10, mientras que el estímulo con 20 µg/ml de ADN de *Leishmania mexicana* indujo una baja producción de IL10 (85 pg/ml). Por otro lado, el estímulo con CpG provocó la producción de 230 pg/ml de IL10. Las células estimuladas con ADN de linfocitos humanos produjeron 45 pg/ml de IL10 (Figura 3C).

## Discusión

En México, la leishmaniosis cutánea es causada por *Leishmania mexicana* que puede causar cuadros clínicos severos y desfigurantes, por lo cual es muy relevante buscar nuevos métodos preventivos y curativos. Los avances sobre ligandos para receptores de la respuesta inmune innata actualmente están cobrando importancia para el tratamiento y prevención de patógenos intracelulares. En este trabajo se analizó si el ADN de *Leishmania mexicana* tiene efecto inmunoestimulante sobre macrófagos murinos derivados de médula ósea y si esto afecta la expresión del receptor TLR9.

Los macrófagos desempeñan un papel importante en todo el proceso de la enfermedad. Estas células son las encargadas de fagocitar y eliminar al parásito, aunque también son células hospederas del mismo.<sup>1</sup> Además de macrófagos, también las células dendríticas de origen mielóide pueden ser células hospederas para el parásito, mientras que las células dendríticas plasmacitoides establecen contacto celular con el parásito, sin embargo no lo fagocitan.<sup>12</sup> Este contacto es suficiente para estimular la producción de IFN $\alpha/\beta$  en las células dendríticas plasmacitoides. Ambas citocinas son capaces de activar a células NK. Las células NK activadas secretan IFN $\gamma$ , que activa al macrófago infectado favoreciendo la eliminación de parásito.<sup>12</sup> Tanto el macrófago como la célula dendrítica son células presentadoras de antígenos que puede procesar al parásito y presentar epítopes de las moléculas del parásito activadores de linfocitos T. Entre los receptores que utilizan ambas células presentadoras de antígenos para reconocer diversas moléculas asociadas a patógenos se encuentran los TLR, que pueden reconocer una variedad de PAMP como lipopolisacárido<sup>6</sup> presente en la membrana de algunas bacterias, lipofosfoglucono de *Leishmania*,<sup>11</sup> flagelina y CpG no metilados en el ADN de bacterias.<sup>8</sup> El reconocimiento de distintos PAMP por receptores innatos tipo TLR induce la producción de citocinas proinflamatorias tales como IL1, IL6, IL12 y TNF $\alpha$ .<sup>7</sup>

Se ha demostrado que los CpG tienen un valor terapéutico como agentes antiinfecciosos y pueden servir como adyuvantes en vacunas con capacidad para estimular más efectivamente y mantener activadas las respuestas inmunes innata y adaptativa tipo Th1.<sup>16</sup> La eficacia de los CpG-ADN como adyuvantes ha sido estudiada en múltiples vacunas, en las cuales se encontró que inducen una fuerte producción de anticuerpos.<sup>16</sup> Adicionalmente, CpG-ADN activa las células dendríticas plasmacitoides, induciendo su secreción de interferones tipo I, lo cual limita el crecimiento de un amplio espectro de virus y bacterias debido al efecto antiviral de las citocinas y a la activación de macrófagos, que favorece la fagocitosis y destrucción de patógenos.<sup>17</sup>

La respuesta Th1 también es crucial en el control de la leishmaniosis, ya que el macrófago infectado con *Leishmania* necesita ser activado para poder eliminar al parásito intracelular, por lo cual el uso de ADN de *Leishmania* como inductor de una respuesta tipo Th1 podría ser importante en el control de esta enfermedad.

El presente trabajo sugiere que el ADN de *Leishmania* es un ligando con capacidad de provocar un incremento en el mRNA de TLR9, así como en la producción de citocinas proinflamatorias que favorecen la inducción de una respuesta celular tipo Th1. Llama la atención que el ADN de *Leishmania* induce preferencialmente citocinas proinflamatorias como IL12<sub>p40</sub> y TNF $\alpha$ , mientras que IL10, citocina inhibitoria de macrófagos, se produce en pequeñas cantidades y únicamente cuando se usan dosis elevadas de ADN. Estos resultados indican que el ADN de *Leishmania* es una molécula interesante para utilizarse como inmunoestimulante activador del macrófago, lo cual es importante para el control de patógenos intracelulares como *Leishmania*.

Esta observación se refuerza en estudios hechos con macacos infectados con el SIV (virus de inmunodeficiencia de simios) y con *Leishmania major*, en los que se utilizaron CpG diseñados para uso en humanos en estudios de protección contra leishmaniosis.<sup>18</sup> Se encontró que los CpG protegieron a los simios de la infección con *Leishmania*, mientras que la enfermedad progresó rápidamente en animales no inmunizados. Los macacos inmunizados con CpG redujeron su carga parasitaria 1000 veces en comparación con los animales no inmunizados.<sup>18</sup>

En resumen, el estímulo de TLR9 del macrófago por ADN de *Leishmania* representa un potencial interesante para el diseño de terapias curativas y preventivas de la leishmaniosis. El diseño de posibles vacunas podría incluir la combinación de una proteína de superficie de *Leishmania*, como la gp63, para ser presentada como antígeno específico para linfocitos T. Para lograr la inducción específica de una

respuesta Th1 se podría combinar la proteína gp63 con el ADN de *Leishmania*; esta combinación molecular podría ser un diseño molecular novedoso que garantizara una buena inducción de la respuesta Th1 requerida para el control de la leishmaniosis.

## Agradecimientos

Berenice Martínez Salazar fue becaria del proyecto PAPIIT IN221806-3 (2005) y de CONACyT 47256-M (2006). Agradecemos el apoyo técnico prestado por Marco Gudiño Zayas y el apoyo secretarial invaluable de Lucía Álvarez.

## Referencias

1. Handman E. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol* 1999;44:1-39.
2. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999;354:1191-1199.
3. Velasco C, Guzmán B, Sánchez R, Torrentera A, Hernández M. *Leishmaniasis con especial referencia a México*. México: INDRE; 1994.
4. Agudelo S, Robledo S. Respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania* spp. *2003*;13:167-178.
5. Guha-Niyogi A, Sullivan DR, Turco SJ. Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology* 2001;11:45R-59R.
6. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76.
7. Janeway CA Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
8. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-745.
9. Latz E, Visintin A, Espevik T, Golenbock DT. Mechanisms of TLR9 activation. *J Endotoxin Res* 2004;10:406-412.
10. Wagner M. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* 2004;25:381-386.
11. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003;130:65-74.
12. Schleicher U, Liese J, Knippertz I, Kurzmann C, Hesse A, Heit A, et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *J Exp Med* 2007;204:893-906.
13. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2006;177:3515-3519.
14. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:1919-1924.
15. An H, Yu Y, Zhang M, Xu H, Qi R, Yan X, et al. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* 2002;106:38-45.
16. Krieg AM. Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine* 2000;19:618-622.
17. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 2004;4:249-258.
18. Verthelyi D, Gursel M, Kenney RT, Lifson JD, Liu S, Mican J, et al. CpG oligodeoxynucleotides protect normal and SIV-infected macaques from *Leishmania* infection. *J Immunol* 2003;170:4717-4723.