

Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Departamento de Biología Celular

Rol de la actividad esfingosina quinasa del macrófago durante la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Trabajo especial de grado

Presentado ante la Ilustre

Universidad Central de Venezuela

por la Bachiller Ana Andreina Alviares Galindo

Como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología

Tutora: Dra. Zelandia Fermín

Laboratorio de Inmunología Celular

Instituto de Biomedicina

Caracas - Venezuela

Octubre, 2018

Tabla de contenido

I. Resumen	v
II. Introducción	1
1. <i>Leishmania sp</i>	1
1.1 Ciclo de vida	2
2. Supervivencia de <i>Leishmania</i> dentro del macrófago	3
3. Las leishmaniasis	8
3.1 Diagnóstico	11
3.2 Epidemiología	12
3.3 Tratamiento y desarrollo de vacunas	14
4. Esfingosina quinasa y esfingosina 1- fosfato	17
III. Antecedentes	20
IV. Objetivos	26
V. Materiales y métodos	27
VI. Resultados	36
VII. Discusión	57
VIII. Conclusiones	65
X. Referencias	66

Agradecimientos

Agradezco a Dios, porque si algo me dio fue constancia y paciencia durante toda la carrera, agradezco a mis padres, por educarme, apoyarme, ser firmes y enseñarme con amor todo lo necesario para hoy estar donde estoy, gracias a mi mami por creer en mi hasta en los momentos en donde ni yo misma creía, por escucharme repetir mis exposiciones y contenido de exámenes una y otra vez, por los consejos, por el apoyo incondicional, gracias esposo por la paciencia, el apoyo, por escucharme, por acompañarme siempre, por los consejos positivos. Gracias tía Pili, por facilitarme los días, por esperarme sin presión, por escuchar mis anécdotas diarias. Gracias Doctora Zelandia, por la paciencia para enseñarme y para repetirme las cosas las veces que hicieran falta, por la dedicación, por compartir sus infinitos conocimientos, por hacer lo imposible para que este trabajo terminará con éxito. Gracias José Pereira, aunque no esté, por hacerme todo más fácil en el laboratorio los meses que pudimos compartir juntos. Gracias a todos los profesores de la facultad porque de maneras diversas me enseñaron las bases de esta ciencia, gracias a mis compañeros de semestre y gracias a los amigos constantes, por apoyarme, por completar mi información, aconsejarme y entender mis preocupaciones como si fueran tuyas. Gracias a mi familia en general, por ayudarme siempre que podían, gracias a todas las personas del instituto de Biomedicina que de alguna u otra manera me colaboraron durante mi tiempo allí. Gracias a mi jurado, por sus buenos consejos para la mejora de este trabajo, gracias al Licenciado Héctor Rojas por ayudarme en la obtención de imágenes de microscopía confocal, gracias a Luis y a Nataly, por ayudarme cuando necesité, por acompañarme y por hacerme reír continuamente.

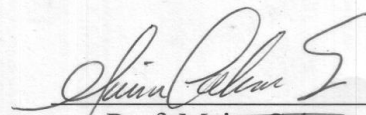
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DE LA Br. ANA ANDREÍNA ALVIARES GALINDO**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Ana Andreína Alviarez Galindo, C.I: 22.760.361, titulado **“Rol de la actividad esfingosina quinasa del macrófago durante la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana*”**, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

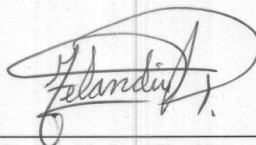
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los once días del mes de octubre del año dos mil dieciocho, dejando constar que la Prof. Zelandia Fermín actuó como coordinadora del jurado examinador.



Prof. Francehuli Dagger



Prof. Maira Cabrera



Prof. Zelandia Fermín
(Tutor)

I. Resumen

Leishmania es el nombre de un género de protozoarios parásitos, transmitidos por la picadura de un insecto de la subfamilia Phlebotominae, causantes de un conjunto de enfermedades, en el humano y otros mamíferos, conocidas como leishmaniasis. Estos organismos poseen dos formas en su ciclo de vida; el promastigote, flagelado extracelular, que se encuentra dentro del intestino del insecto vector, y el amastigote, intracelular, no móvil, que parasita células de mamíferos, particularmente macrófagos, dentro de los cuales sobreviven y se multiplican, en el interior de vacuolas parasitóforas, evadiendo los mecanismos de destrucción de esta célula inmunitaria. En condiciones normales, los fagosomas de estas células sufren un proceso de maduración, en el que adquieren propiedades microbicidas al fusionarse con lisosomas. *Leishmania* evita su destrucción al interferir con este proceso y la subsecuente generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Solo luego de su activación el macrófago despliega su principal mecanismo leishmanicida; la producción de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina, reacción catalizada por la enzima sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS o NOS2). Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la forma promastigote de *Leishmania mexicana* interfiere con la traslocación de la enzima esfingosina kinasa 2 hacia la periferia de los fagosomas nacientes durante su internalización. Las enzimas esfingosina quinasas (SK1 y SK2) catalizan la fosforilación de la esfingosina generando el metabolito bioactivo esfingosina 1-fosfato (S1P), un potente mensajero celular involucrado en la regulación de numerosos procesos celulares, como la liberación de Ca^{+2} desde reservorios intracelulares, condición necesaria para la fusión del fagosoma a los lisosomas y la consiguiente destrucción de los microbios fagocitados. En este trabajo demostramos la participación de la actividad SK del macrófago en la activación de mecanismos microbicidas, como la acidificación de los fagosomas y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, durante la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana*, así como la inhibición de la misma como mecanismo de supervivencia del parásito.

Palabras clave: *Leishmania*, macrófago, fagosoma, esfingosina quinasa, esfingosina-1-fosfato, Dimetil esfingosina, óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno.

II. Introducción

1. *Leishmania sp*

Leishmania es el nombre de un género de protozoarios parásitos que afectan al ser humano y a otros mamíferos, causantes de un conjunto de enfermedades conocidas como leishmaniasis. Este género pertenece al subreino Protozoa, phylum Sarcomastigophora, subphylum Mastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, y ha sido dividido en dos subgéneros: *Leishmania* presente en el viejo y nuevo mundo y *Viannia*, limitado al nuevo mundo (WHO, 2010; Teixeira y col, 2013).

Leishmania presenta dos formas en su ciclo de vida; una llamada promastigote, extracelular, alargada, elíptica, que mide entre 15-20 μm de longitud y posee un flagelo que emerge de la parte anterior del cuerpo proporcionándole movilidad; y otra forma llamada amastigote, intracelular, no móvil, redondeada u ovoide, que mide entre 4-5 μm de longitud aproximadamente y no posee flagelo aparente. El promastigote presenta organelos típicos de células eucariotas como núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático, complejo de Golgi y citoesqueleto, y otros exclusivos de la familia Trypanosomatidae, como kinetoplasto, estructura paraflagelar, glicosomas, y microtúbulos subpeliculares. Esta forma vive dentro de un insecto vector, perteneciente a la sub-familia Phlebotominae; género *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomya* en el nuevo mundo. El amastigote, además de presentar todos los organelos presentes en el promastigote, posee megasomas, estructuras con actividad lisosomal. Esta forma del parásito prolifera dentro de distintas células del

hospedador mamífero, particularmente el macrófago, célula fagocítica perteneciente al sistema inmunitario (Kaye y Scott, 2011; Teixeira y col, 2013).

1.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida del parásito (**Figura 1**) inicia cuando un insecto vector hembra ingiere las formas amastigotes del parásito al picar a un hospedador mamífero parasitado; en su intestino ocurre el proceso de transformación de los amastigotes a promastigotes procíclicos (formas no infectivas), los cuales se desplazan hacia el intestino medio abdominal del insecto, donde se multiplican sucesivamente por fisión binaria y se fijan al epitelio por la región del flagelo, por acción de moléculas específicas denominadas lipofosfoglicanos (LPG), posteriormente se desplazan al intestino medio torácico donde ocurre la diferenciación a promastigotes metacíclicos, formas infectivas, no divisorias, que se localizan en la válvula estomodeal desde donde ocurre su transmisión al hospedador mamífero. Durante la alimentación de sangre, el flebótomo regurgita a los promastigotes, junto con proteofosfoglicanos derivados del parásito y componentes salivales. En la piel del hospedador mamífero (hombre, perro, ratón, liebre, caballo, entre otros), los parásitos son fagocitados por varias posibles células (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, fibroblastos), al establecer una residencia intracelular, los promastigotes se transforman en amastigotes, los cuales se replican dentro de la célula hospedadora, hasta causar su lisis, evento que permite la infección de nuevos fagocitos atraídos al sitio. Finalmente, el ciclo se completa cuando un nuevo insecto vector, al alimentarse de la sangre de un individuo infectado, ingiere células parasitadas (Kaye y Scott, 2011; Teixeira y col, 2013).

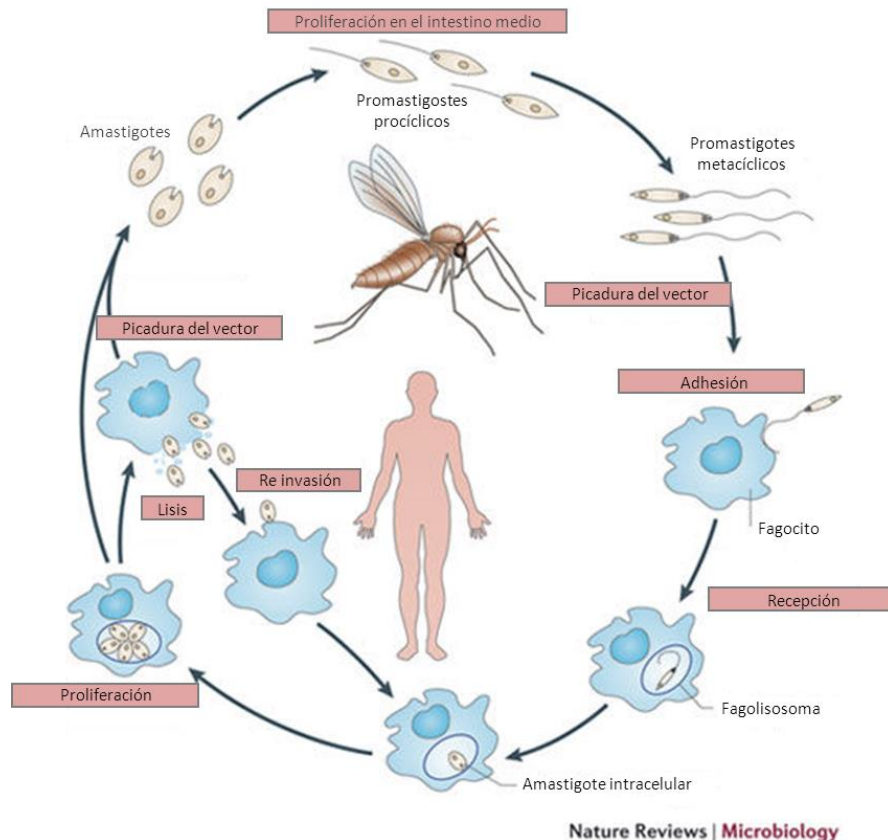


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* sp: muestra los distintos estadios del parásito dentro del insecto vector y dentro de la célula hospedera en el mamífero, representado en este caso por un humano. Además se ilustra el proceso de internalización del parásito y su proliferación en el interior celular. Modificado a partir de Kaye y col, 2011.

2. Supervivencia de *Leishmania* dentro del macrófago

Aunque *Leishmania* tiene la capacidad de infectar distintos tipos de células, el macrófago constituye su célula blanco predilecta y la responsable del mantenimiento de la infección en el hospedador vertebrado (Kaye y col, 2011).

La forma promastigote de *Leishmania* interactúa con el macrófago en varias etapas, comenzando por la adhesión, que involucra el reconocimiento de moléculas de superficie del parásito, como el lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína (gp63), por receptores

presentes en la membrana del macrófago, entre ellos: los receptores de los factores del complemento CR1 Y CR3, el receptor de manosa y el receptor de fibronectina. Luego, el parásito es internalizado mediante el proceso de fagocitosis; que depende principalmente de la ATPasa RhoA (Moradin y Descoteaux, 2012), la membrana del macrófago comienza a envolver al parásito, hasta que finalmente es incorporado en un compartimiento especializado llamado fagosoma, un organelo relacionado con el retículo endoplasmático donde ocurre el proceso de transformación a la forma amastigote (Teixeira y col, 2013).

Luego de la internalización de la mayoría de los microorganismos, los fagosomas de los macrófagos sufren un proceso de maduración, en el que adquieren propiedades microbicidas al fusionarse con lisosomas, convirtiéndose en fagolisosomas (Kaye y col, 2011; Teixeira y col, 2013). Durante la biogénesis del fagolisosoma los eventos de fusión son controlados por un subtipo de GTPasas, las proteínas Rab, que incluyen a Rab5 y Rab7, las cuales se encargan de regular la naturaleza de los eventos de fusión con endosomas tempranos y tardíos, respectivamente (Bobadilla, 2008). Los fagosomas se fusionan con los endosomas y lisosomas al tiempo que los componentes de la membrana son reciclados a la membrana plasmática (Bobadilla, 2008). Durante el proceso de maduración, la acidificación y los niveles de enzimas lisosomales como las hidrolasas ácidas, LAMP-1, LAMP-2 y catepsina D aumentan (Podinovskaia y Descoteaux, 2015).

Los macrófagos producen una variedad de compuestos tóxicos que ayudan a destruir al microorganismo fagocitado. Los más importantes de éstos son los péptidos antimicrobianos, el óxido nítrico (NO), el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno

(H_2O_2) que son directamente tóxicos para las bacterias. El superóxido se origina por un multicomponente asociado a la membrana, la NADPH oxidasa, en un proceso conocido como la explosión respiratoria, porque se acompaña de un aumento transitorio del consumo de oxígeno (Janeway's Immunobiology, 2017). En fagocitos no estimulados esta enzima está inactiva, ya que no está completamente ensamblada. El complejo citocromo b558, un conjunto de sub-unidades compuesto por p22 y gp91, se localiza en la membrana plasmática de macrófagos en reposo y es traslocado a los lisosomas después de la maduración de los fagolisosomas. Otros componentes como p40, p47 y p67 están en el citosol, la activación del fagocito induce a estas subunidades a unirse con el citocromo b558 asociado a la membrana y formar la NADPH oxidasa completa y funcional. La enzima activa convierte el oxígeno molecular en el ion superóxido (O_2^-) y en otros radicales libres de oxígeno. La enzima superóxido dismutasa convierte el superóxido en H_2O_2 . Reacciones químicas y enzimáticas adicionales producen una conjunto de sustancias químicas tóxicas a partir del H_2O_2 , entre ellas los radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), hipoclorito (OCl^-) e hipobromito (OBr^-). De forma tal que, una vez fagocitados, muy pocos microorganismos pueden sobrevivir dentro de las vacuolas fagocíticas de los macrófagos, debido al bajo pH, las enzimas hidrolíticas, las especies reactivas de oxígeno e intermediarios reactivos de nitrógeno (NO) (Janeway's Immunobiology, 2017).

Luego de la internalización por parte del macrófago, *Leishmania* inicia la transformación de la forma promastigote a amastigote, un proceso desencadenado por factores como el aumento de la temperatura (34°C) y el descenso del pH (4 – 5) (Charest, y Matlashewski 1994). Dentro de las primeras 24 horas el promastigote pierde su flagelo y adopta una forma

ovoide y reducida, y se puede registrar la expresión de genes específicos de la forma amastigote (Charest, y Matlashewski, 1994). Estudios recientes han demostrado que la reducción de tamaño que tiene lugar durante la transformación del parásito de la forma promastigote a amastigote es consecuencia de un proceso de invaginación masiva del complejo membrana plasmática-citoesqueleto, el cual conduce a la formación de vesículas citoplasmáticas que contienen fluido extracelular, similares a las observadas en procesos autofágicos descritos en eucariotas superiores (Dagger y col, 2017).

Los promastigotes de *Leishmania* interfieren con la maduración del fagosoma el tiempo necesario para su diferenciación a la forma amastigote, mejor adaptada para la supervivencia en el fagolisosoma. El hecho de que la forma amastigote resida dentro de un ambiente ácido, en la vacuola parasitófora, es consistente con el pH óptimo al cual se llevan a cabo muchos de sus procesos metabólicos, como respiración, catabolismo de sustratos energéticos e incorporación de precursores en macromoléculas, a diferencia de las condiciones para la forma promastigote, sensible al pH ácido, en la cual el valor óptimo es neutro (Moradin y Descoteaux, 2012).

Numerosas investigaciones han demostrado que la acidificación que se presenta típicamente al transformarse el fagosoma inicial en fagolisosoma, es inhibida transitoriamente en aquellos que contienen promastigotes de *Leishmania* (Kaye y col, 2011). El lipofosfoglicano, un componente de la membrana celular de *Leishmania*, de expresión abundante en la superficie del promastigote y moderada o ausente en el amastigote, ha sido identificado como responsable de alterar el tráfico intracelular y la biogénesis del fagosoma (Moradin y Descoteaux, 2012). Este glicofosfolípido ocasiona la

acumulación de F-actina en la periferia de la vacuola parasitófora, lo que dificulta la maduración del fagosoma, al modificar la estructura de los lípidos que se encuentran en la membrana y que participan en el reconocimiento de otras moléculas que promueven la maduración (Moradin y Descoteaux, 2012). Solo durante la internalización de la forma amastigote ocurre la fusión de los lisosomas con la vacuola que contiene al parásito, ya que esta forma no se ve afectada por las enzimas lisosomales (Teixeira y col, 2013).

Tanto el promastigote como el amastigote, evitan la exposición a oxidantes, a través, de la inhibición de la generación de especies reactivas de oxígeno, uno de los mecanismos utilizados, es prevenir el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa responsable de su síntesis (Moradin y Descoteaux, 2012). La proteína gp63, está asociada con la supresión de la explosión oxidativa (Henriques y col, 2002). La transformación a la forma amastigote, está asociada con una reducción de la expresión de las moléculas LPG y gp63 (Henriques y col, 2002).

Otro mecanismo de evasión de la inmunidad del hospedador mamífero por parte del parásito es la inhibición de la presentación de sus péptidos antigénicos por parte del macrófago, internalizando y degradando moléculas del MHC (Antoine y col, 1999).

Luego de su activación por factores como la citoquina IFN- γ o agonistas del receptor TLR-4 como el lipopolisacárido bacteriano, el macrófago despliega su principal mecanismo leishmanicida, la producción de óxido nítrico (NO) a partir de la L-arginina, reacción catalizada por la enzima sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS o NOS2), el cual es capaz de destruir a la forma amastigote y poner fin a la infección (Liew y col, 1990; Green y col, 1994; Podinovskaia y Descoteaux, 2015).

3. Las leishmaniasis

La leishmaniasis se presenta bajo diferentes manifestaciones clínicas: leishmaniasis visceral, cutánea localizada, cutánea difusa, cutánea diseminada, mucocutánea y atípica, cuyo desarrollo, tasa de curación y respuesta al tratamiento dependen tanto de la especie de parásito causante de la infección (**Figura 2**), como de la respuesta inmunitaria y estado general de salud del hospedador. La malnutrición y la inmunosupresión, especialmente la causada por la infección por el virus de inmunodeficiencia humana, aumentan la susceptibilidad a la enfermedad, y pueden conducir al desarrollo de lesiones en localizaciones atípicas, como tubo digestivo, espacio peritoneal, pulmones, entre otros (WHO, 2010; Teixeira y col, 2013).

Leishmaniasis Visceral: esta forma se caracteriza por afectar órganos internos como el bazo, hígado, mucosa del intestino delgado, médula ósea, ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides. Los síntomas más comunes son fiebre, anorexia y hepatoesplenomegalia, en ocasiones se presentan hemorragias mucosas y con el avance de la condición es frecuente que se presenten otras infecciones como neumonía, disentería o tuberculosis. Es la forma más grave de la enfermedad, generalmente mortal en ausencia de tratamiento (Buffet. P, 2008; WHO, 2010; Teixeira y col, 2013).

Leishmaniasis cutánea localizada: este tipo de leishmaniasis se produce en el punto de inoculación del parásito, inicia como una mácula que se ulcera hasta formar lesiones redondeadas crateriformes con bordes elevados. Las lesiones pueden aparecer desde semanas hasta años después de la infección, pueden ser múltiples o únicas, suelen sanar

espontáneamente en el curso de semanas o meses dejando importantes cicatrices, y suelen responder bien al tratamiento (Buffet. P, 2008; WHO, 2010; Teixeira y col, 2013).

Leishmaniasis cutánea difusa: se caracteriza por la presencia de pápulas, nódulos o placas cutáneas, cargadas de parásitos. No cura espontáneamente, aunque los órganos internos no están afectados, el tratamiento es difícil y las recidivas son frecuentes. Se caracteriza por una anergia o ausencia de respuesta inmunitaria específica del individuo infectado frente al parásito (Buffet. P, 2008; WHO, 2010; Teixeira y col, 2013).

Leishmaniasis cutánea diseminada: se presenta como numerosas lesiones nodulares o ulceradas extensas. Pueden encontrarse desde decenas hasta cientos de lesiones cutáneas, es frecuente que afecte las mucosas. A diferencia de la forma cutánea difusa, la respuesta inmunitaria específica frente al parásito permanece intacta, la respuesta al tratamiento es parcial y la tasa de recaídas a corto plazo, es elevada (Buffet. P, 2008; WHO, 2010; Teixeira y col, 2013).

Leishmaniasis mucocutánea: este tipo de leishmaniasis se caracteriza por el desarrollo de lesiones destructivas desfigurantes que afectan la mucosa oronasofaríngea por diseminación linfática o hematógena, puede presentarse desde meses hasta más de veinte años después de una lesión cutánea causada por especies del sub-género *Viannia*. Por lo general no cura espontáneamente, y las infecciones bacterianas secundarias son bastante frecuentes, la tasa de éxito del tratamiento convencional es superior al 75% (Buffet. P, 2008; WHO, 2010; Teixeira y col, 2013).

Leishmaniasis atípica: se caracteriza por lesiones atípicas, uno o pocos nódulos, no ulcerados, que contienen pocos parásitos, está vinculada a habitantes de países de Centroamérica. *Leishmania chagasi*, es el parásito identificado en la mayoría de las lesiones, sin embargo también se ha detectado *Leishmania mexicana*; en aislados de nódulos se han encontrado cantidades importantes de cenizas volcánicas, y otros materiales dónde predominan el sílice y el aluminio, los cuales han sido asociados al desarrollo atípico y a la respuesta inmunológica que limita la multiplicación de los parásitos y previene la visceralización (Convit y col, 2005).

Subgénero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Viejo Mundo	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> ^a <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
Nuevo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> ^a <i>L. venezuelensis</i> <i>L. gamhami</i> ^a <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> ^b	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Tropismo principal	Visceral	Dérmico	Dérmico	Mucoso

^a Estatus de especie en debate.
^b Posición taxonómica en debate.

Figura 2. Taxonomía de *Leishmania* y patologías asociadas a las diferentes especies: esta tabla presenta un resumen de los distintos subgéneros y especies del parásito, ubicándolos por grupos de acuerdo la patología a la cual está asociado, tanto en el viejo como en el nuevo mundo. Tomado de WHO, 2010.

3.1 Diagnóstico

El diagnóstico clínico de la infección por *Leishmania* no es suficiente, pues los síntomas son comunes a otras patologías, así que se apoya en algunas pruebas de laboratorio tales como parasitológicas, serológicas, de detección de antígenos y moleculares. Comúnmente, se utiliza la visualización microscópica de amastigotes en biopsias de lesiones o aspirados celulares para confirmar la infección (WHO, 2010). Aunque la especificidad de la microscopia es elevada, su sensibilidad es muy variable, por ello, como segunda opción se recurre al diagnóstico serológico, con inmunoensayos como el ELISA o la inmunofluorescencia, los cuales son considerados muy sensibles, sin embargo la limitación de este tipo de pruebas es que pueden presentar reacciones cruzadas, con malaria, tripanosomiasis y toxoplasmosis, así como con lepra y tuberculosis (Alvar,2001); otro inconveniente común es que en los casos de leishmaniasis donde se producen anticuerpos específicos, estos siguen siendo detectables durante varios años después de la curación, adicional a esto, pueden resultar positivas en personas que viven en zonas endémicas debido a infecciones asintomáticas. Existen otras pruebas, que consisten en la detección de antígenos del parásito en muestras de orina, las cuales son más específicas que las anteriormente descritas, ya que evitan la reactividad cruzada, y permiten distinguir entre infecciones activas y pasadas. La detección de ADN del parásito mediante PCR, ya sea en sangre, biopsias o aspirados medulares, es considerada más sensible, sin embargo generalmente se realiza solo en hospitales de referencia y en centros de investigación, ya que requiere un equipamiento y entrenamiento relativamente sofisticados, esta técnica ha tenido algunas modificaciones a lo largo del tiempo, como ITS1-PCR-RFLP, que es un

método muy apropiado para la identificación de especies de *Leishmania* (WHO, 2010; Mohammadiha, 2017).

3.2 Epidemiología

Las distintas formas de leishmaniasis afectan a 98 países de regiones tropicales y subtropicales del planeta, principalmente a los habitantes de las poblaciones más pobres. Se estima que en el mundo 350 millones de personas están expuestas al riesgo de infección y se reportan alrededor de 2 millones de nuevos casos anualmente. Estudios epidemiológicos recientes demuestran que ocurren de 200 a 400 mil nuevos casos de leishmaniasis visceral y de 700 mil a 1,2 millones de leishmaniasis cutánea anualmente (Buffet. P, 2008; WHO, 2010; Teixeira y col, 2013).

El 90% de los casos de leishmaniasis visceral se concentran principalmente en la India, Bangladesh, Etiopía, Kenia, Sudán y Brasil (Teixeira y col, 2013), mientras que la mayor parte de los casos cutáneos aparece en el suroeste de Asia y norte de África (Alvar, 2001). En el viejo mundo, *L. major* y *L. aethiopica* causan leishmaniasis cutánea zoonótica, el riesgo puede aumentar con el inicio de proyectos agrícolas y la ampliación de los sistemas de irrigación. Las infecciones por *L. infantum* son comunes en todo el perímetro del mediterráneo, existen focos en Oriente medio y el sur de Asia. La leishmaniasis en la cuenca mediterránea es de transmisión zoonótica, mientras que en la India y África es antroponótica. En el Nuevo Mundo la leishmaniasis visceral se debe a la transmisión zoonótica de *L. infantum*, y su epidemiología se asemeja a la de esa enfermedad en la cuenca mediterránea. (WHO, 2010).

En América, las leishmaniasis cutánea y mucosa se presentan en 20 países, siendo endémicas en 18 de ellos. En el período entre 2001-2015 se notificaron 843.931 casos nuevos, con un promedio anual de 56.262 casos (WHO web site, 2017). *L. braziliensis* es la especie más extendida, aunque también están presentes otras especies en zonas específicas; *L. guyanensis* en el norte de la cuenca amazónica, *L. panamensis* en Panamá y en ciertas regiones de Colombia, o *L. mexicana* en Yucatán y en Belice (Buffet. P, 2008).

En las Américas, los casos humanos de LV están presentes en 12 países, pero el 96% de los casos son reportados en Brasil. A nivel regional la leishmaniasis visceral se clasifica en tres escenarios epidemiológicos: países con la transmisión en expansión (Argentina, Brasil y Paraguay), países con transmisión estable o controlada (Colombia y Venezuela) y países con transmisión esporádica (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Bolivia, Guyana y México) (WHO web site).

La co-infección *Leishmania*-VIH ha surgido como una nueva entidad biomédica; las personas co-infectadas presentan elevadas tasas de recidiva y mortalidad. A finales de los años 90, la mitad de los pacientes infectados con *L. infantum* también estaban infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Buffet. P, 2008). Hasta ahora treinta y cinco países han informado de estos casos (WHO web site, 2018). Actualmente se han descrito tasas elevadas de co-infección en Brasil, Etiopía y el estado indio de Bihar (WHO web site, 2018). El tratamiento antirretroviral reduce la progresión de la enfermedad, retrasa las recidivas y aumenta la supervivencia de los pacientes infectados (WHO web site, 2018).

En Venezuela, las manifestaciones más frecuentes son la leishmaniasis cutánea y la mucocutánea (Hirst y Stapley, 2000). Mediante técnicas moleculares se han identificado

casos de leishmaniasis cutánea en las distintas áreas endémicas del país como: los valles del sistema montañoso de la Costa, la depresión de Yaracuy, algunas regiones de los llanos y de los Andes, el sur del Orinoco, la zona montañosa y boscosa de Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Miranda y Sucre, además de los estados Carabobo y Aragua (Rodríguez y col, 2001, 2002). La leishmaniasis visceral en Venezuela se ha descrito por zonas, una zona central que comprende los estados Aragua, Carabobo, Guárico, Cojedes y Yaracuy; una Occidental conformada por los estados Falcón, Lara, Portuguesa, Trujillo y Zulia y una zona Oriental constituida por los estados Nueva Esparta, Sucre, Anzoátegui y Monagas (Zerpa y col., 2003). El Instituto de Biomedicina es Centro de Referencia para casos de leishmaniasis a nivel nacional (Zerpa, 2005). Los datos recolectados por esta institución indican que el número total de casos a nivel nacional, en el año 2016, fue de 2059 para leishmaniasis cutánea, procedentes principalmente de los estados Carabobo, Lara, Miranda, Sucre, Táchira, Trujillo, Yaracuy y 34 de leishmaniasis visceral, procedentes principalmente de los estados Carabobo, Guárico y Sucre. (Informe anual Servicio autónomo Instituto de Biomedicina “Jacinto Convit”, 2016).

3.3 Tratamiento y desarrollo de vacunas

Las drogas usadas en los actuales momentos como primera línea para el tratamiento de las leishmaniasis fueron desarrolladas hace más de 60 años (Haldar, 2011). El tratamiento de elección es principalmente con antimoniales pentavalentes; el antimoniato de meglumina (8.1% de antimonio) y el estibogluconato de sodio (10% de antimonio). Su vía de administración es intravenosa, aunque han sido usados en forma tópica para el tratamiento de las formas cutáneas. Presentan efectos colaterales frecuentes como vómitos, náuseas,

cefaleas, letargo, entre otros; y efectos graves, menos frecuentes, como cardiotoxicidad o hepatotoxicidad, que en el peor de los casos pueden llevar a la muerte (WHO, 2010).

El tratamiento con anfotericina B, es uno de los más frecuentes, es un antibiótico poliénico que se administra en infusión intravenosa, las reacciones secundarias suelen ser fiebre alta y escalofríos, la nefrotoxicidad es común y puede llevar a la interrupción del tratamiento, un efecto grave pero poco frecuente es la miocarditis y la hipopotasemia. En la actualidad, se administra principalmente la formulación liposomal, la cual tiene menor toxicidad y mayor eficacia (WHO, 2010).

La paromomicina, el isetionato de pentamidina, la miltefosina y los derivados azólicos, son otras drogas usadas en el tratamiento de la leishmaniasis. La paramomicina es un antibiótico aminoglucosídico que se administra vía intramuscular, Tienen efecto sinérgico con los antimoniales, por lo que se suelen utilizar asociados, o bien como terapia aislada de segunda elección en las formas viscerales (Alvar, 2001), lo más frecuente es que se genere dolor en el lugar de la inyección, un porcentaje bajo sufre nefrotoxicidad, hepatotoxicidad o tetania. El isetionato de pentamidina, se administra vía intramuscular o infusión intravenosa, tiene efectos adversos graves como diabetes mellitus, hipoglucemia grave y miocarditis. La miltefosina, es el medicamento contra las leishmaniasis de más reciente desarrollo, es un alquilfosfolípido que estimula los linfocitos T y la acción microbida de los macrófagos, con expresión de citoquinas Th1 (INF- γ) pero, a diferencia de los antimoniales, su actividad no es T-dependiente, por lo que podría ser un buen candidato para el tratamiento de los enfermos coinfectados por Leishmania-VIH, tiene como ventaja especial su administración oral (Alvar, 2001), produce con frecuencia efectos gastrointestinales

como vómitos y diarrea, los menos frecuentes son alergia cutánea e insuficiencia renal, es un compuesto potencialmente teratógeno, por lo que no se debe usar en mujeres embarazadas ni en edad de procrear a menos que se logre garantizar su anticoncepción (WHO, 2010).

Actualmente no existe ninguna vacuna de uso general contra las leishmaniasis, pero si algunos candidatos que han intentado de alguna manera acercarse a ese fin. La leishmanización por ejemplo, es un proceso que se basa en la inoculación intradérmica de promastigotes virulentos de *L. major*, de cultivos frescos, para lograr protección frente a efectos más graves en la infección natural; se realiza a voluntarios de alto riesgo de contagio (refugiados, militares desplegados), negativos a VIH, la desventaja es que puede llegar a producir lesiones cutáneas graves (WHO, 2010).

Existen vacunas candidatas, que se conocen como de primera y de segunda generación, las primeras, se hicieron con extractos de parásitos o parásitos muertos, principalmente destinadas a la prevención de la leishmaniasis cutánea, una de estas fue producida en Venezuela, utilizando promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos y administrada con BCG como adyuvante. Los resultados con estas vacunas han sido no concluyentes con respecto a profilaxis, pero positivos en aplicaciones terapéuticas (Cabrera y col, 2000; WHO, 2010). Las vacunas de segunda generación, consisten en proteínas recombinantes o ADN del parásito, numerosos antígenos definidos, administrados en combinación con distintos adyuvantes han sido capaces de proteger animales de experimentación. De estas, Leish-111+MPL-SE, ha llegado a ensayos clínicos (Coler y col, 2007). Otra aproximación ha sido la creación de leishmanias modificadas genéticamente, las cuales causan síntomas muy leves

de la enfermedad, y se probó que inducen en ratones respuestas protectoras frente a parásitos vivos (WHO, 2010; Dey y col, 2013).

Debido a que aún no existe una vacuna determinada como efectiva para la leishmaniasis, el tratamiento sigue siendo la administración de drogas, que como se mencionó anteriormente presentan numerosos efectos secundarios y resistencia por parte del parásito, es por ello que resulta muy importante la construcción de otros tipos de tratamientos que solo se desarrollaran al investigar nuevos blancos terapéuticos.

4. Esfingosina quinasa y esfingosina 1 fosfato

Hasta hace unos años se pensaba que los esfingolípidos solo participaban en la composición de la estructura de las membranas celulares, con el paso del tiempo se ha descubierto que algunos de ellos, como la esfingosina 1 fosfato (S1P) y la ceramida 1 fosfato (C1P), cumplen importantes funciones en la señalización celular. Particularmente, la S1P ha despertado gran interés debido a su participación en numerosos procesos biológicos, como: regulación de la homeostasis de calcio, supresión o inducción de la apoptosis, proliferación, supervivencia, formación de fibras, placas de adhesión focal, migración celular y fagocitosis. Además del primer rol descrito, como primer mensajero intracelular, involucrado en la liberación de Ca^{+2} desde reservorios intracelulares, la S1P es transportada al exterior celular, donde actúa como un agonista extracelular. Existen cinco receptores de superficie celular, acoplados a proteínas G, específicos para la S1P, llamados S1PR 1-5 (Maceyka y col, 2002; Spiegel y Milstien, 2002). La activación de estos receptores desempeña un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos como desarrollo vascular y neural, función

cardiaca e inmunidad, por lo que la desregulación de la S1P o los cambios en los niveles de expresión de algunos de estos receptores se encuentran asociados a numerosas patologías, como: aterosclerosis, cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedad cardiovascular y esclerosis múltiple (Orr Gandy y Obeid, 2013; Spiegel y Milstien, 2002).

La S1P es producida por fosforilación en el grupo hidroxilo primario de la esfingosina, en una reacción catalizada por las enzimas esfingosina quinasas (SKs) (Orr Gandy y Obeid, 2013). En mamíferos existen dos isoformas de esfingosina quinasas (SK1 y SK2), las cuales aunque son codificadas por genes diferentes, son altamente homologas, ambas poseen cinco dominios conservados; la SK1 es mucho más pequeña que la SK2, posee un segmento central adicional y una cola N-terminal extendida que incluye un motivo de translocación al núcleo, tiene varias regiones transmembrana predichas y un dominio de unión a SH3 rico en prolina (Spiegel y Milstien, 2002). La localización subcelular de la SK1 determina el resultado de la señalización de la S1P. Mientras que SK1 reside predominantemente en el citosol, se ha demostrado su traslocación a la membrana plasmática después de la fosforilación por ERK (Spiegel y Milstien, 2002), presumiblemente con el fin de posicionar SK1 en estrecha proximidad con su sustrato, la esfingosina. En comparación con la SK1, la SK2 muestra diferentes patrones de localización subcelular y, además del citosol, ha sido detectada en el ER, el núcleo y las mitocondria (Orr Gandy y Obeid, 2013). Además de la señalización intracelular, la S1P también es capaz de señalizar "de adentro hacia afuera"; la S1P producida en el interior celular, puede ser transportada al exterior a través de la familia de transportadores ABC y del transportador *Spinster 2* (*spns2*). Una vez exportada, puede

actuar de forma autocrina o de manera paracrina, activando los receptores S1P en la membrana celular.

Las SKs presentan una actividad basal importante, involucrada en el metabolismo de los esfingolípidos, pero su actividad puede ser incrementada luego de la activación por estímulos extracelulares, numerosos y de naturaleza diversa, sin embargo los mejor caracterizados son: los factores de crecimiento, agonistas muscarínicos, citoquinas, vitamina D3, S1P, entre otros (Orr Gandy y Obeid, 2013; Spiegel y Milstien, 2002).

Luego de conocer la variedad e importancia de los procesos celulares en los que ha sido descrita la participación de la S1P, es sencillo imaginar el impulso a nivel científico asociado al conocimiento y control de los mecanismos que promueven su síntesis y degradación. Desde la aprobación en el año 2010 del uso del fingolimod (FTY720), un análogo de la esfingosina, sustrato de la SK2, para el tratamiento de las recaídas de esclerosis múltiple (Hernandez y col, 2017), ha aumentado considerablemente el interés en el estudio del eje SKs/S1P como potencial blanco para el desarrollo de fármacos contra numerosas patologías.

III. Antecedentes

En 2003, Malik y col, demostraron que *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), interfiere con la maduración del fagosoma en macrófagos, lo que favorece su viabilidad intracelular al prevenir el desarrollo de un fagolisosoma con propiedades bactericidas; un mecanismo asociado a la inhibición del aumento de la concentración de Ca^{+2} citosólico, necesario para la fusión de organelos. Estos autores demostraron también que es la inhibición de la actividad esfingosina quinasa por la bacteria la responsable directa de estos cambios, conclusión a la que llegaron basándose en el hecho que la internalización de Mtb muerta inducía el aumento de la producción de S1P por el macrófago, más no así las bacterias vivas, y que el aumento de la concentración intracelular de Ca^{+2} inducido por las Mtb muertas era inhibido por el compuesto D, L threo-dihidroesfingosina (DHS), un inhibidor selectivo y competitivo de la actividad SK. Los autores demostraron, mediante microscopía confocal que los macrófagos que internalizaron Mtb muertas, mostraban una co-localización entre fagosomas y lisosomas, mientras que aquellos que internalizaron Mtb vivas no lo hacían, fenómeno que podía ser inhibido mediante la preincubación con el inhibidor de las SK, N,N-dimetilesfingosina (DMS) (Malik y col, 2003).

En 2005, Thompson y col, demostraron que Mtb vivas inhiben la traslocación de la enzima SK1 desde el citosol a la periferia de los fagosomas durante su internalización por macrófagos humanos. Los autores observaron, mediante microscopía confocal que la SK1 del macrófago, es traslocada de manera progresiva y transitoria a la periferia del fagosoma durante la fagocitosis de Mtb muertas, perlas de látex, o la bacteria *Staphylococcus aureus*,

esta acumulación transcurre entre los 5 y 20 min posteriores al inicio de la internalización, para luego revertir, un fenómeno que se ve acompañado por un aumento en la actividad SK en la fracción de membranas del macrófago, pero no ocurre durante la internalización de Mtb vivas. Los investigadores proponen que Mtb vivas interfieren con la activación de la SK y su translocación a la membrana del fagosoma, donde se encuentra su sustrato, con el fin de inhibir su maduración, lo cual representa un mecanismo de supervivencia para la bacteria (Thompson y col, 2005).

La S1P, actúa como segundo mensajero intracelular y también como un agonista extracelular, donde puede tener una función paracrina o autocrina, esta última afirmación con base en el conocimiento que se tiene acerca de la existencia de receptores de membrana que corresponden a este lípido y que permiten la activación de vías de señalización dentro de la célula.

En 2004, Garg y col, demostraron que la S1P induce la actividad antimicrobiana en macrófagos, conduciendo a la destrucción tanto de la especie poco patogénica *Mycobacterium smegmatis* (Msm) como la muy patogénica *Mycobacterium tuberculosis*. Estos autores lograron una reducción significativa de la carga de micobacterias en los pulmones y el bazo de ratones infectados con Mtb, y más notablemente en los pulmones de ratones infectados con Msm, luego del tratamiento con S1P. Adicional a esto, observaron una reducción de la actividad granulomatosa en los pulmones de ratones infectados con Mtb, con un predominante infiltrado de macrófagos sin evidencias de necrosis, lo que sugiere que la S1P puede reducir el daño tisular de la respuesta inmune a la vez que

aumenta la actividad antimicrobiana (Garg y col 2004). El mismo grupo en 2006 demostró la presencia de menores niveles del metabolito S1P en muestras de lavado bronco alveolar de pacientes con tuberculosis con respecto a individuos con patologías pulmonares de otro origen, además se observó inhibición del crecimiento de las microbacterias en cultivo luego del tratamiento *ex vivo* con S1P de la población de células presentes en el lavado broncoalveolar de los pacientes, constituida principalmente por macrófagos alveolares (Garg y col, 2006).

En 2009, Greco y col, encontraron que distintos lisofosfolípidos, entre ellos la S1P, protegen a una línea celular de epitelio alveolar, de la citotoxicidad inducida por *Mycobacterium tuberculosis* y mejoran la actividad antimicrobiana. Esta actividad está directamente asociada a la maduración del fagosoma, mediada por Ca^{+2} y dependiente de fosfolipasa D. Los autores llegaron a estas conclusiones por sus observaciones mediante microscopia confocal; donde al tratar a las células infectadas con S1P se produce un aumento en el porcentaje de co-localización de marcadores lisosomales con fagosomas, lo que sugiere fusión de organelos, maduración de fagosomas y desarrollo de actividad microbicida mediada por los lisofosfolípidos en el pulmón, una función protectora ante patógenos (Greco y col, 2009).

En 2010, Prakash y col, enfocaron su investigación en el rol de la SK en la infección de macrófagos murinos RAW 264.7 con *Mycobacterium smegmatis*. Los autores lograron demostrar que, luego de 4 horas de infección, las células son capaces de destruir a nivel intracelular a la bacteria, sin embargo, la inhibición de la actividad SK, con el compuesto

DHS, o el silenciamiento del gen que codifica SK1, utilizando ARN de interferencia (siARN), favorece su proliferación, un fenómeno asociado a la disminución de la expresión de proteínas relacionadas con la activación del macrófago, como: el factor de transcripción NFκB, la citoquina activadora de los macrófagos TNF-α y la enzima iNOS, responsable de la producción del óxido nítrico, importante mecanismo microbicida. Para comprobar esto, los autores demostraron que la sobreexpresión de la SK confería resistencia al macrófago frente a la infección, debido a la mejora en la producción de óxido nítrico (Prakash y col, 2010).

Leishmania es internalizada en el macrófago básicamente por el mecanismo de endocitosis, inmediatamente es ubicada en un compartimiento limitado por una membrana, originada por la membrana plasmática del macrófago, este fagosoma, es sometido a un cambio o maduración, que involucra la fusión con organelos endocíticos, formando finalmente lo que se conoce como vacuola parasitófora (Antoine y col, 1998; Podinovskaia y Descoteaux, 2015). En la membrana de la vacuola parasitófora, se han encontrado proteínas como LAMP-1 y LAMP-2, que son principalmente localizadas en lisosomas, así como otras moléculas presentes en vacuolas endocíticas, además las vacuolas parasitoforas, exhiben un pH ácido y numerosas hidrolasas activas, por lo que se comenzó a relacionar a la maduración directamente con el proceso de fusión de la vacuola con los lisosomas (Antoine, 1998; Podinovskaia y Descoteaux, 2015).

En 2002, Courret y col, utilizando microscopia confocal lograron demostrar que la fusión del fagosoma con endosomas luego de la infección con *Leishmania amazonensis* y *Leishmania*

major requiere el mismo tiempo independientemente de si es fagocitada la forma amastigote o promastigote. Sin embargo, la vacuola característica de cada especie se forma en un tiempo más corto cuando la forma internalizada es un amastigote que cuando es un promastigote. Esto sugiere, que el parásito puede ocasionar retraso o aceleración en la fusión dependiendo de los requerimientos para alcanzar el ambiente óptimo para la supervivencia del morfotipo causante de la infección (Courret y col, 2002).

Como se mencionó anteriormente, se ha estado discutiendo acerca de los ambientes más favorables para las distintas formas del parásito *Leishmania*, apoyando esta idea, Moradin y Descoteaux en 2012, publicaron las características de la célula y algunos de los mecanismos que ha desarrollado el microorganismo para modificar el entorno a favor de su supervivencia, además relacionan a *Mycobacterium tuberculosis* y promastigotes de *Leishmania* en cuanto a la utilización de mecanismos comunes para evitar su destrucción por acción del macrófago; uno de ellos es la exclusión de la V-ATPasa lo cual evita la acidificación del fagosoma, por otra parte, ambos microorganismos evitan el establecimiento del complejo NADPH oxidasa, lo que impide la producción de especies reactivas de oxígeno promoviendo su supervivencia (Moradin y Descoteaux, 2012).

En 2014, resultados obtenidos en nuestro laboratorio, mediante microscopía confocal, permitieron establecer que promastigotes vivos de *L. mexicana* interfieren con la traslocación de la enzima SK2 a la periferia de los fagosomas nacientes. La internalización de promastigotes muertos por fijación o perlas de latex induce la acumulación progresiva y transitoria de la enzima SK2 en la periferia de los fagosomas, lo cual no ocurre durante la

internalización de promastigotes vivos (Rincón, 2014). Estos hallazgos apuntan a un rol de la enzima SK2 en el proceso de maduración natural de los endosomas y sugieren que la inhibición de la actividad de esta enzima podría ser un mecanismo de supervivencia de la forma promastigote de *Leishmania mexicana* dentro del macrófago, algo similar al fenómeno descrito para *Mycobacterium tuberculosis*.

IV. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el rol de la actividad SphK del macrófago en la maduración del fagosoma durante la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Objetivos específicos

1. Comparar la capacidad de macrófagos múridos de efectuar la maduración de los fagosomas durante la internalización de: promastigotes vivos y promastigotes fijados de *Leishmania mexicana*.
2. Determinar si la inhibición de la actividad SphK interfiere con la maduración del fagosoma durante la internalización de promastigotes fijados.
3. Establecer si la adición de S1P externa permite restituir la capacidad del macrófago de efectuar la maduración de los fagosomas cargados con parásitos vivos

V. Materiales y Métodos

Todos los procedimientos de cultivo se realizaron bajo condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica clase IIA.

1. Cultivo de macrófagos múridos J774

La línea de macrófagos múridos J774 fue mantenida en cultivo en medio RPMI 1640 o medio IMDM (donde así se indique), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) inactivado, 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina y 100 mM HEPES (RPMI sup o IMDM sup), en incubación a 37° C, en atmósfera 5% CO₂ y 10% de humedad.

2. Cultivo de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Los parásitos de la especie *Leishmania mexicana* (cepa de referencia internacional MHOM/BZ/1982/BEL21Bel21) fueron extraídos de una lesión en el cojinete plantar de un hámster infectado y cultivados en medio bifásico agar-sangre inicialmente, luego de lo cual fueron transferidos a frascos de cultivo de 25 mL en medio Scheneider's suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (Sch Sup). El cultivo fue mantenido a temperatura ambiente, hasta que la población alcanzó la fase estacionaria.

3. Cultivo de macrófagos múridos J774 sobre laminillas e internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Los macrófagos fueron cosechados a partir de cultivos, recuperando las células en suspensión y despegando las adheridas al fondo del frasco mediante el uso de un rastrillo para células (*cell scraper*). La suspensión celular obtenida se centrifugó a 250 g, a 15° C,

durante 10 minutos, luego de lo cual el sedimento se resuspendió en 2 ml de medio RPMI suplementado. El conteo de macrófagos se realizó en cámara de Malassez en presencia del colorante de exclusión azul tripano. Se colocaron laminillas cubreobjetos estériles en el fondo de placas de cultivo de 6 pozos y se sembraron 5×10^5 macrófagos/pozo en un volumen de 4 mL de medio RPMI sup. Las células fueron incubadas por 24 hr a 37° C en atmósfera 5% CO₂ y 10% humedad.

Los promastigotes de *Leishmania mexicana* obtenidos de un cultivo en fase estacionaria, fueron lavados tres veces por centrifugación a 2.100 x g por 10 min en medio RPMI no suplementado y contados en cámara de Mallassez. Una alícuota de los parásitos fue fijada por 20 min en paraformaldehído al 4% en PBS y luego lavada dos veces por centrifugación a 2500 x g por 10 min en medio RPMI suplementado. Finalmente, los parásitos vivos y muertos por fijación fueron agregados a los pozos correspondientes de las placas de macrófagos, en una relación de 10 por célula, e incubados a temperatura ambiente, por tiempos de: 30 min, tanto para los parásitos vivos como los fijados, para la evaluación de la traslocación de la enzima SK2, o de 2 horas en el caso de parásitos vivos y 3 horas en el caso de los fijados, para la evaluación de la maduración de los fagosomas. Finalizada la incubación, se realizaron dos lavados con medio RPMI no suplementado para eliminar los parásitos no internalizados.

Con la intención de establecer si la traslocación de la SK2 observada durante la internalización de los promastigotes fijados en los experimentos que sirvieron de antecedente a este trabajo era solo consecuencia del hecho que los parásitos estuvieran muertos o estaba relacionada con la opsonización realizada a los mismos (diferencia con

respecto a los parásitos vivos), macrófagos J774 cultivados sobre laminillas cubre objeto fueron incubados durante 30 min con: parásitos muertos por fijación, previamente opsonizados con suero de ratón no inactivado durante 1 hora, o con parásitos fijados no opsonizados, posterior a lo cual se realizó el marcaje inmunofluorescente de la SK2 y su observación por microscopía confocal.

4. Marcaje inmunofluorescente de la enzima esfingosina quinasa 2 de macrófagos múridos luego de la internalización de promastigotes de *L. mexicana* vivos o fijados

Luego de la internalización de los parásitos vivos y muertos por fijación por los macrófagos, las laminillas fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, lavadas tres veces con PBS y permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 al 0,25 % en PBS (PBST) durante 10 min. Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados mediante incubación con PBST-BSA 1% durante 30 min, luego de lo cual se realizó el marcaje de la enzima SK2 utilizando un anticuerpo primario policlonal de tipo IgY, producido en gallina, contra la enzima SK2 humana, diluido en solución de bloqueo (1:100), durante 1 h. Seguidamente, se realizaron tres lavados con PBST por 5 min y la incubación con un anticuerpo secundario anti IgY de gallina producido en cabra asociado al fluoróforo DyLight 594 (longitud de onda de absorción: 590 nm; longitud de onda emisión: 617 nm), diluido en solución de bloqueo (1:1000), durante 1 h. Luego de realizar tres lavados con PBST por 5 min, las laminillas fueron incubadas con la sonda DAPI (longitud de onda de absorción: 350 nm; longitud de onda emisión: 470 nm) a una concentración de 545 nM para el marcaje de los núcleos de las células y kinetoplastos de los parásitos. Finalmente, se realizaron tres lavados de 5 min

con PBS, se fijó con paraformaldehído de la misma manera descrita anteriormente y se montaron las laminillas sobre láminas porta-objeto en medio de preservación Vectashield (Vector). La visualización de las laminillas y el registro de las imágenes se realizaron mediante microscopía confocal de barrido laser (microscopio Olympus FV 1000), en el Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, UCV, con la orientación del Lic. Hector Rojas. Las diluciones utilizadas para el anticuerpo primario y secundario fueron estandarizadas en experimentos previos en nuestro laboratorio.

5. Evaluación de la acidificación de los fagosomas de los macrófagos luego de la internalización de los parásitos

Para la evaluación de la acidificación de los fagosomas, previo a la internalización de los promastigotes por los macrófagos cultivados sobre laminillas, los parásitos fueron marcados con el compuesto fluorescente verde CFSE (*Cell trace*, Invitrogen), y los macrófagos con el marcador de lisosomas *Lysotracker Red* (Invitrogen).

Macrófagos J774 fueron sembrados sobre laminillas cubreobjeto en placas de 96 pozos a una densidad de 5×10^5 macrófagos/pozo, en un volumen de 4 mL de medio RPMI sup, e incubadas por 24 hr a 37° C en atmósfera 5% CO₂ y 10% humedad. Transcurridas 24 h, se agregó a cada pozo el compuesto *Lysotracker Red*, a una concentración de 50 nM, y se incubó durante 2 h a 37° C en atmósfera 5% CO₂ y 10% humedad. Finalizada la incubación, se realizaron dos lavados con medio RPMI suplementado.

Paralelamente, cien millones (1×10^8) de promastigotes de *L. mexicana*, en fase estacionaria de crecimiento, fueron incubados con *Cell trace*, a la concentración 25 µM, en un volumen de 0,5 ml de medio RPMI sin SFB, en oscuridad, durante 15 min a 30° C (baño de María).

Finalizada la incubación se detuvo el marcaje agregando al tubo, 5 veces el volumen de medio RPMI sup, se centrifugó la suspensión a 2100 x g, por 10 min, a 15° C y se realizaron dos lavados más con 2,5 ml de medio RPMI suplementado. Los parásitos fueron resuspendidos en 500 µL de medio RPMI suplementado, y una alícuota de la suspensión fue fijada en paraformaldehído al 4% (como se describió en 3). Los parásitos vivos y fijados se reservaron en oscuridad hasta el momento de agregarlos a los macrófagos.

Finalizado el marcaje de los macrófagos y los parásitos, se agregaron a los pozos correspondientes los promastigotes de *L. mexicana* marcados, vivos o muertos por fijación, en una relación de 10 parásitos por célula. Los macrófagos fueron incubados con los parásitos a temperatura ambiente, por tiempos de 2 horas en el caso de los parásitos vivos y 3 horas en el caso de los fijados. Transcurridos esos tiempos, se realizaron dos lavados con medio RPMI no suplementado para eliminar los parásitos no internalizados.

Con el propósito de determinar el posible rol de la actividad de SK durante el proceso de acidificación de los fagosomas, los macrófagos que internalizaron parásitos fijados fueron incubados durante 1 hora y 30 min con concentraciones crecientes (5 y 50 µM) del inhibidor general de la actividad esfingosina quinasa DMS; y a fin de determinar si la adición externa del producto de las SKs, es capaz de restablecer las condiciones requeridas para la maduración del fagosoma, los macrófagos que internalizaron los parásitos vivos fueron incubados con concentraciones crecientes (0,5 y 5 µM) de S1P durante 1,5 horas. Como control, los pozos de concentración cero recibieron los vehículos en los cuales fueron disueltos estos compuestos a la máxima concentración utilizada.

Finalizada la incubación, se procedió a lavar las laminillas una vez con PBS, fijarlas durante 20 min en una solución de paraformaldehído al 4 % en PBS, lavarlas nuevamente tres veces con PBS y montarlas sobre láminas portaobjeto con el medio de montaje Vectashield (Vector), para su observación y registro mediante microscopía confocal.

6. Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno por los macrófagos luego de la internalización de los parásitos

Macrófagos J774 fueron sembrados en el fondo de placas de cultivo de 24 pozos, a una densidad de 8×10^5 , en un volumen de 1600 μL de medio IMDM suplementado, e incubados durante 24 h, a 37°C , en atmósfera 5% CO_2 y 10% humedad. Promastigotes vivos y muertos por fijación fueron agregados a los pozos correspondientes de las placas de macrófagos, en una relación de 10 parásitos por célula, e incubados a temperatura ambiente, por tiempos de 2 horas en el caso de parásitos vivos y 3 horas en el caso de los fijados. Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados con medio IMDM no suplementado para eliminar los parásitos no internalizados, se agregaron 600 μL de una solución de azul de nitro-tetrazolio (NBT) 375 $\mu\text{g/ml}$, en medio IMDM, y se incubó durante 30 minutos.

Con el propósito de determinar el posible rol de la actividad de SK en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), los macrófagos que internalizaron parásitos fijados fueron incubados con concentraciones crecientes (0; 12,5; 25 y 50 μM) del inhibidor general de la actividad esfingosina quinasa, DMS, durante 3 horas, a 37°C , 5% CO_2 y 10 % de humedad.; y a fin de determinar si la adición externa del producto de las SKs, es capaz de aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno, los macrófagos que internalizaron los parásitos vivos fueron incubados con concentraciones crecientes (0; 0,5;

5 y 25 μM) de S1P durante 3 horas a 37° C, 5% CO_2 y 10 % de humedad. Como control positivo, macrófagos sanos fueron estimulados con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* 0127:B8, Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Finalizada la incubación con la DMS o S1P, se realizó la determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno mediante el método colorimétrico descrito por Rook y col, en 1985, con adaptaciones de Rainard, 1986. El ensayo del NBT es utilizado para medir aniones superóxido (O_2^-) liberados por macrófagos durante el estallido oxidativo; el NBT reacciona con iones superóxido para formar un derivado de diformazán reducido que puede ser medido por espectrofotometría, el cual, sirve como un marcador de la capacidad redox de los fagocitos estimulados, reflejando la actividad de la NADPH oxidasa.

Se verificó que las células siguieran adheridas y se retiró el medio de los pozos. Posteriormente se realizaron dos lavados con 800 μl de PBS, seguidos de dos lavados con 400 μl de metanol puro, para eliminar el NBT no reducido. Se dejó secar el excedente de metanol y se agregaron 240 μl de KOH 2 M, con la finalidad de lisar las membranas celulares, y 280 μl de DMSO, que permite disolver los cristales de diformazán, luego de lo cual se incubó la placa durante 10 min en agitación, protegida de la luz. Finalizada la incubación, se transfirieron 200 μl de cada pozo (por duplicado) a una placa de 96 pozos y se leyó en un lector de microplacas (Model 680 Microplate Reader, Bio-Rad) a una absorbancia de 655 nm. La concentración de ROS en las muestras fue calculada por comparación de los valores de DO con una curva estándar generada con concentraciones crecientes de NBT.

7. Evaluación de la producción de óxido nítrico por los macrófagos luego de la internalización de los parásitos

Macrófagos J774 fueron sembrados en el fondo de placas de cultivo de 24 pozos, a una densidad de 8×10^5 , en un volumen de 800 μ L de medio IMDM sup, e incubados durante 24 h, a 37° C, en atmósfera 5% CO₂ y 10% humedad. Promastigotes de *L. mexicana* vivos y muertos por fijación fueron agregados a los pozos correspondientes de las placas de macrófagos, en una relación de 10 parásitos por célula, e incubados a temperatura ambiente, por tiempos de 2 horas en el caso de parásitos vivos y 3 horas en el caso de los fijados. Finalizada la incubación, se realizaron dos lavados con medio RPMI no suplementado, para eliminar los parásitos no internalizados.

Con el propósito de determinar el posible rol de la actividad de SK en la inducción de producción de NO, los macrófagos que internalizaron parásitos fijados fueron incubados con concentraciones crecientes (12.5, 25 y 50 μ M) del inhibidor general de la actividad esfingosina quinasa, DMS, durante 3 h, a 37° C, 5% CO₂ y 10% de humedad; y a fin de determinar si la adición externa del producto de las SKs, es capaz de aumentar la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos, aquellos que internalizaron los parásitos vivos fueron incubados con concentraciones crecientes (0.5 ,5 y 25 μ M) de S1P durante 3 h, a 37° C, 5% CO₂ y 10% de humedad.

Como control, los pozos de concentración cero recibieron los vehículos en los cuales fueron disueltos estos compuestos a la máxima concentración utilizada, para el control positivo, macrófagos sanos fueron estimulados con interferón- γ (IFN- γ), a una concentración de 100

U/ml. Finalizada la incubación, se recuperó el sobrenadante de los pozos y se conservó a -70° C hasta la determinación de la concentración de óxido nítrico producido.

La concentración de óxido nítrico (NO) producida por los macrófagos luego de la internalización de parásitos vivos o fijados, tratados o no, se estimó mediante el método de Griess (Griess, 1864), el cual permite cuantificar la acumulación de nitritos, uno de los productos de degradación estables del NO. Para ello, se mezclaron en una microplaca de 96 pozos volúmenes iguales (100 μ L) de sobrenadante y de reactivo de Griess (1% sulfanilamida y 0.1% N-(naftil) etilen-diamino-dihidrocloruro, en 5% Ácido fosfórico), luego de lo cual la placa fue incubada a temperatura ambiente, en oscuridad durante 10 min. La sulfanilamida reacciona con el nitrito en la muestra para formar una sal de diazonio de color amarilla, la cual reacciona con el naftil etilendiamina, para dar un producto azo de color púrpura. Se determinó la DO a una absorbancia de 492 nm en un lector de microplacas (CPD Reader 212-Biolatin). La concentración de nitritos en las muestras fue calculada por comparación de los valores de DO con una curva estándar generada con concentraciones crecientes de NaNO_2 .

8. Análisis de los resultados

Para el análisis de la distribución de la fluorescencia y medición de los valores de colocalización en las imágenes de microscopía confocal se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (ρ) el programa ImageJ (versión 1.47, National Institutes of Health). Para el análisis de la producción de NO y ROS se calcularon y representaron gráficamente las medias $\pm$ desviaciones estándares de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó el test t de Student de una cola, para muestras no pareadas.

VI. Resultados

1. Localización de la SK2 de macrófagos múridos J774 durante la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos y muertos por fijación

Macrófagos múridos J774 fueron incubados durante 30 min con promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos o muertos por fijación (opsonizados o no con suero de ratón), luego de lo cual se procedió a determinar la localización sub-celular de la enzima SK2 mediante inmunomarcaje fluorescente.

Se pudo observar que durante la internalización de promastigotes muertos por fijación, la SK2 (rojo) se acumula en la periferia del fagosoma donde está siendo internalizado el parásito, independientemente de si los parásitos han sido previamente opsonizados o no con suero de ratón no inactivado (**figuras 1 y 2**). Por el contrario, en el caso de la internalización de los promastigotes vivos, tal como había sido demostrado en trabajos previos de nuestro laboratorio, no se detecta traslocación de la enzima, la cual permanece en una distribución citoplasmática difusa (**figura 3**).

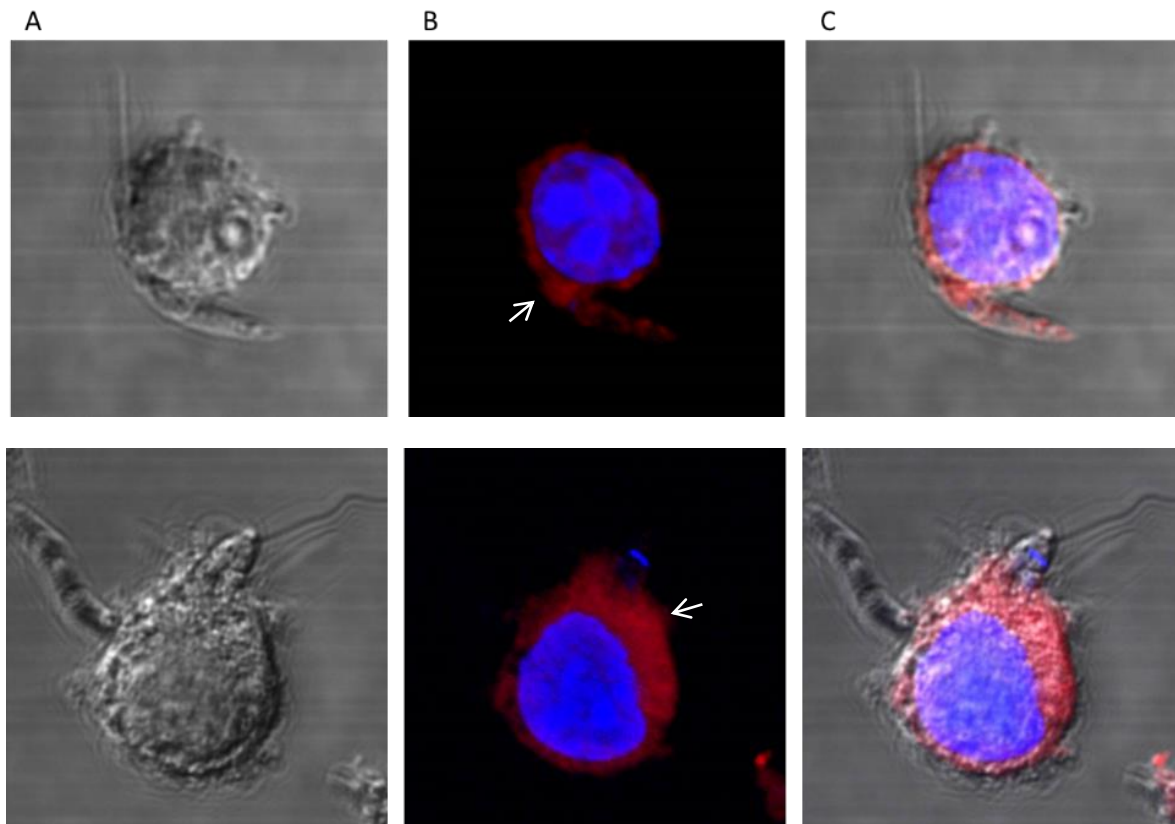


Figura 1. Localización subcelular de la SK2 en macrófagos múridos J774 durante la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación opsonizados con suero de ratón. Se observan promastigotes, fijados y opsonizados con suero de ratón, internalizados por macrófagos luego de 30 min. A) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC); B) inmunomarcaje fluorescente de la SK2 del macrófago (Dylight 594: rojo) y tinción del núcleo del macrófago y kinetoplasto del parásito (DAPI: azul); C) DIC + inmunomarcaje fluorescente de la SK2 del macrófago (Dylight 594: rojo) y tinción del núcleo del macrófago y kinetoplasto del parásito (DAPI: azul). Las flechas señalan las zonas de acumulación de la SK2.

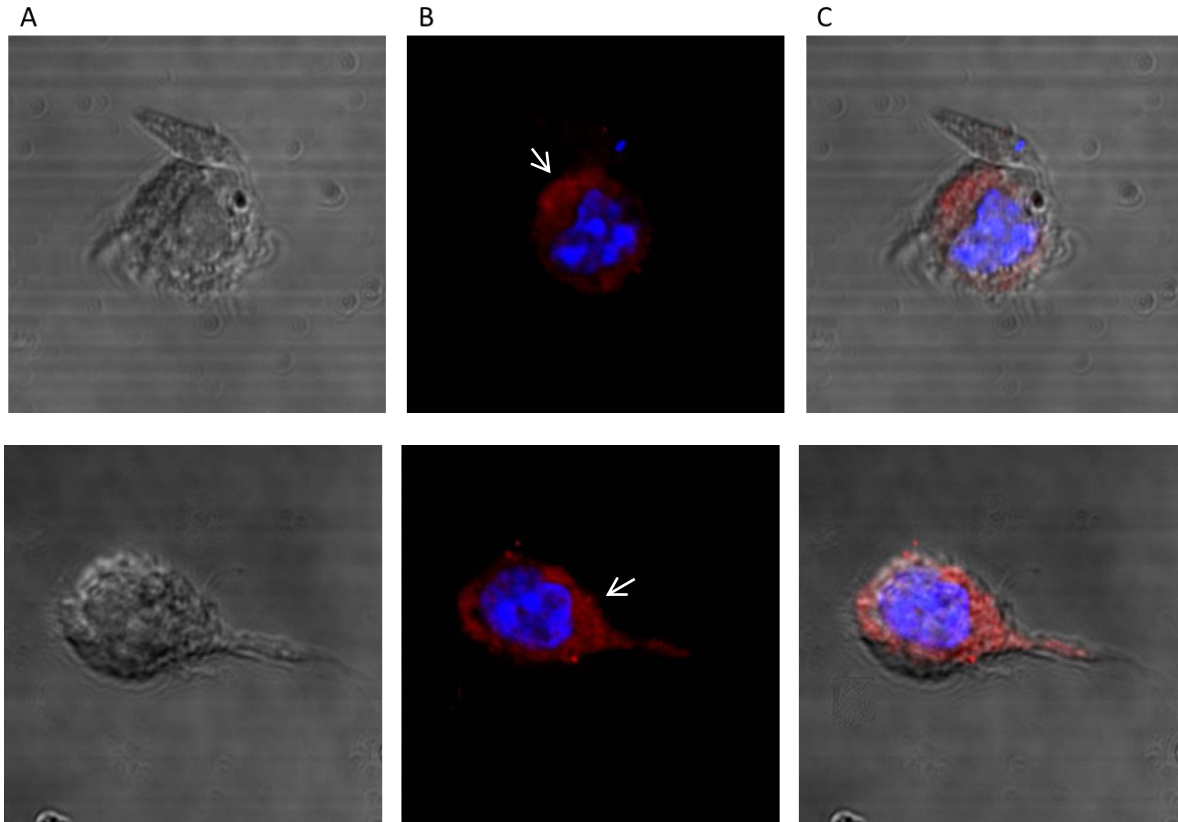


Figura 2. Localización subcelular de la SK2 en macrófagos múridos J774 durante la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación no opsonizados. Se observan promastigotes fijados, no opsonizados, internalizados por macrófagos luego de 30 min. A) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC); B) inmunomarcaje fluorescente de la SK2 del macrófago (Dylight 594: rojo) y tinción del núcleo del macrófago y kinetoplasto del parásito (DAPI: azul); C) DIC + inmunomarcaje fluorescente de la SK2 del macrófago (Dylight 594: rojo) y tinción del núcleo del macrófago y kinetoplasto del parásito (DAPI: azul). Las flechas señalan las zonas de acumulación de la SK2.

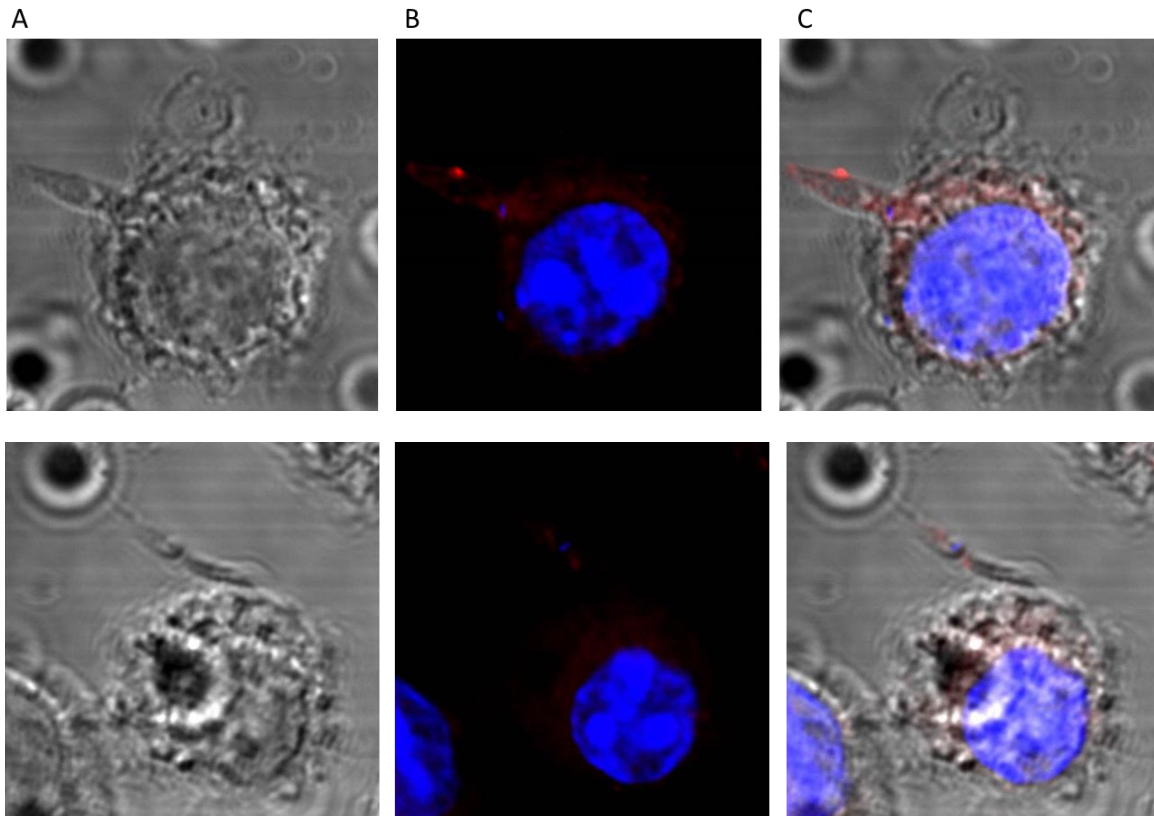


Figura 3. Localización subcelular, de la SK2 en macrófagos múridos J774 durante la internalización de promastigote de *Leishmania mexicana* vivos. Se observan promastigotes vivos, internalizados por macrófagos luego de 30 min. A) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC); B) inmunomarcaje fluorescente de la SK2 del macrófago (Dylight 594: rojo) y tinción del núcleo del macrófago y kinetoplasto del parásito (DAPI: azul); C) DIC + inmunomarcaje fluorescente de la SK2 del macrófago (Dylight 594: rojo) y tinción del núcleo del macrófago y kinetoplasto del parásito (DAPI: azul).

2. Comparación de la capacidad de macrófagos múridos de efectuar la maduración de los fagosomas luego de la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos y muertos por fijación

Con el propósito de determinar la posible inhibición de la capacidad de la célula hospedadora de efectuar la maduración de los fagosomas, por parte de los promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos, se evaluó comparativamente la acidificación de estos

compartimientos, la producción de ROS y la producción de NO por los macrófagos muridos J774 luego de la internalización de promastigotes vivos y muertos por fijación.

Macrófagos J774, previamente marcados con *Lysotracker Red*, fueron incubados durante 3 h con promastigotes de *Leishmania mexicana*, vivos, o muertos por fijación (no opsonizados), marcados con el compuesto fluorescente verde CFSE.

Los macrófagos que internalizaron los promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación mostraron una coloración roja difusa, por acción del *Lysotracker Red* unido a zonas de bajo pH, y tanto los parásitos como sus vacuolas parasitóforas, una coloración entre verde y ligeramente amarilla, sugestiva de una posible co-localización entre ambos fluoróforos (**figura 4**). El análisis mediante el coeficiente de correlación de Pearson arrojó un valor promedio de 0,55, lo cual corresponde a una colocación moderada de los fluoróforos. Durante la internalización de promastigotes vivos, los macrófagos presentan una coloración roja difusa correspondiente al marcaje con *Lysotracker Red*, y los parásitos internalizados una coloración verde intensa debida al marcaje con CFSE, (figura 4). El análisis de correlación a través del coeficiente de Pearson, reveló un valor promedio de 0,21; lo cual confirma la baja colocación observada. El análisis estadístico reveló una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0,01$).

En la **figura 5**, se representa la producción de especies reactivas de oxígeno por macrófagos que internalizaron promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos o muertos por fijación. Se pudo observar una producción de ROS 21% menor por los macrófagos que habían internalizado promastigotes vivos con respecto a los que internalizaron los promastigotes

mueritos por fijación. La diferencia de los niveles de este metabolito entre los grupos resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

La **figura 6**, muestra la diferencia en la producción de óxido nítrico, entre los mismos grupos. La producción de NO por los macrófagos que habían internalizado promastigotes vivos resultó ser 19% menor a la de aquellos que internalizaron los promastigotes mueritos por fijación. La diferencia de los niveles de este metabolito entre los grupos también resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

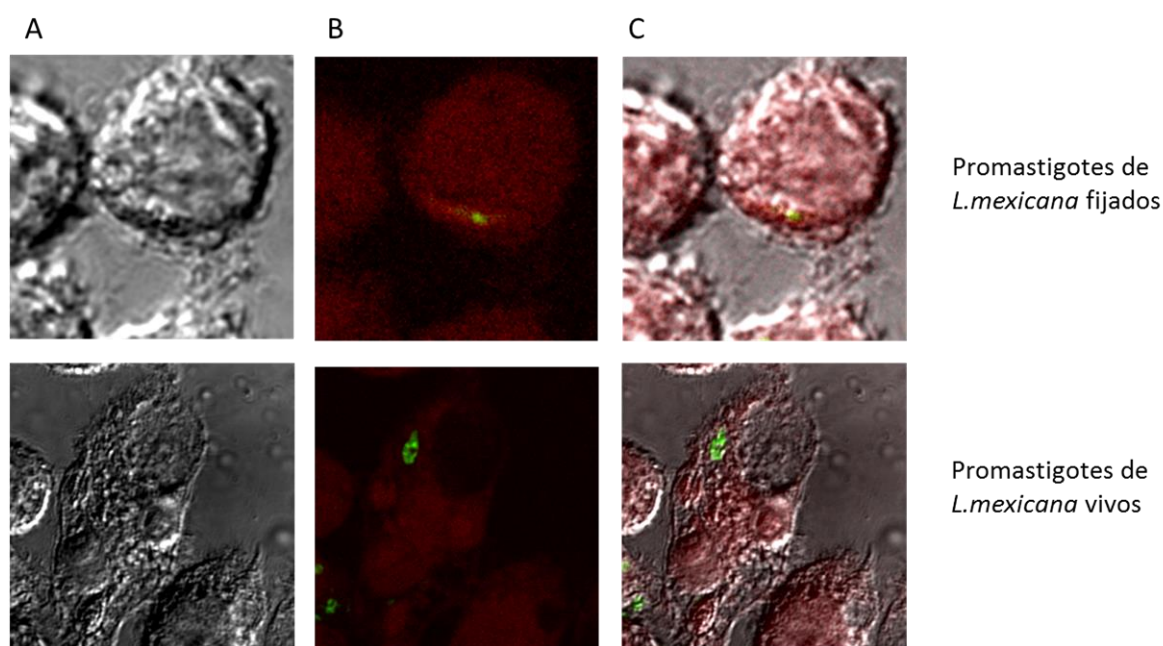


Figura 4 Acidificación de los fagosomas de los macrófagos durante la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos y mueritos por fijación. Promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos y mueritos por fijación, marcados con el compuesto CFSE, fueron internalizados durante 2 y 3 h, respectivamente, por macrófagos mueritos J774 marcados con el compuesto *Lysotracker red*. A) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC); B Marcaje fluorescente de macrófagos con *Lysotracker red* (rojo) y marcaje fluorescente de promastigotes de *Leishmania mexicana* con el compuesto CFSE (verde); C) DIC + Marcaje fluorescente de macrófagos con *Lysotracker red* y marcaje fluorescente de promastigotes de *Leishmania mexicana* con el compuesto CFSE

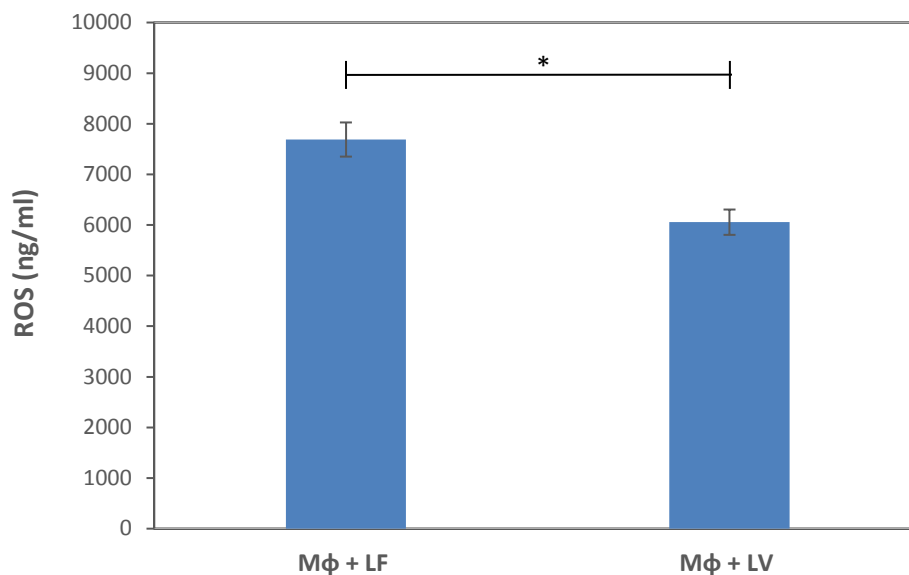


Figura 5. Producción de especies reactivas de oxígeno por macrófagos J774, luego de la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos y muertos por fijación. Los macrófagos fueron incubados con promastigotes vivos durante 2h y con promastigotes fijados durante 3 h. **Mφ**: Macrófagos; **LF**: Promastigotes de *L. mexicana* fijados; **LV**: Promastigotes de *L. mexicana* vivos. Test *t* de Student * ($p < 0,05$).

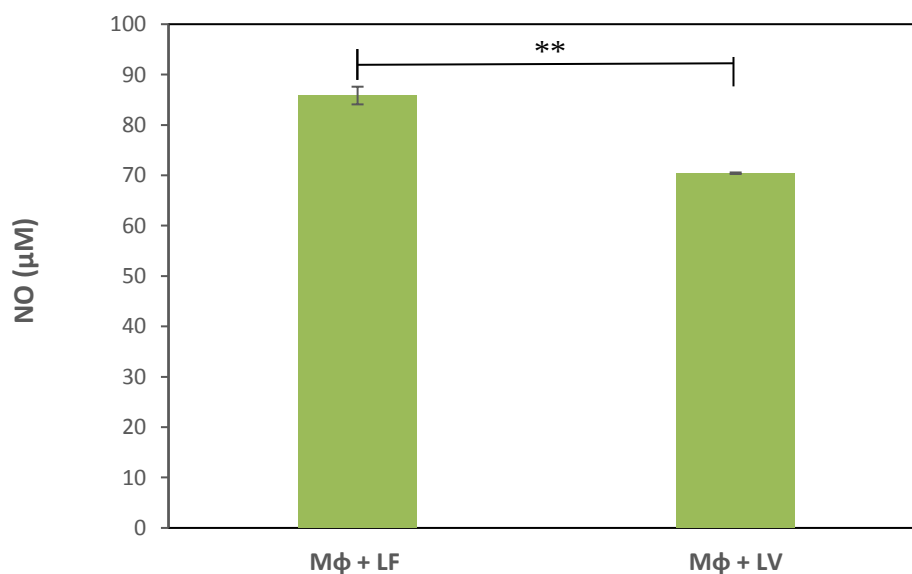


Figura 6. Producción de óxido nítrico por macrófagos J774, luego de la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos y muertos por fijación. Los macrófagos fueron incubados con promastigotes vivos durante 2h y con promastigotes fijados durante 3 h. **Mφ**: Macrófagos; **LF**: Promastigotes de *L. mexicana* fijados; **LV**: Promastigotes de *L. mexicana* vivos. Test *t* de Student ** ($p < 0,01$).

3. Efecto de la inhibición de la actividad SK sobre la maduración de los fagosomas de los macrófagos

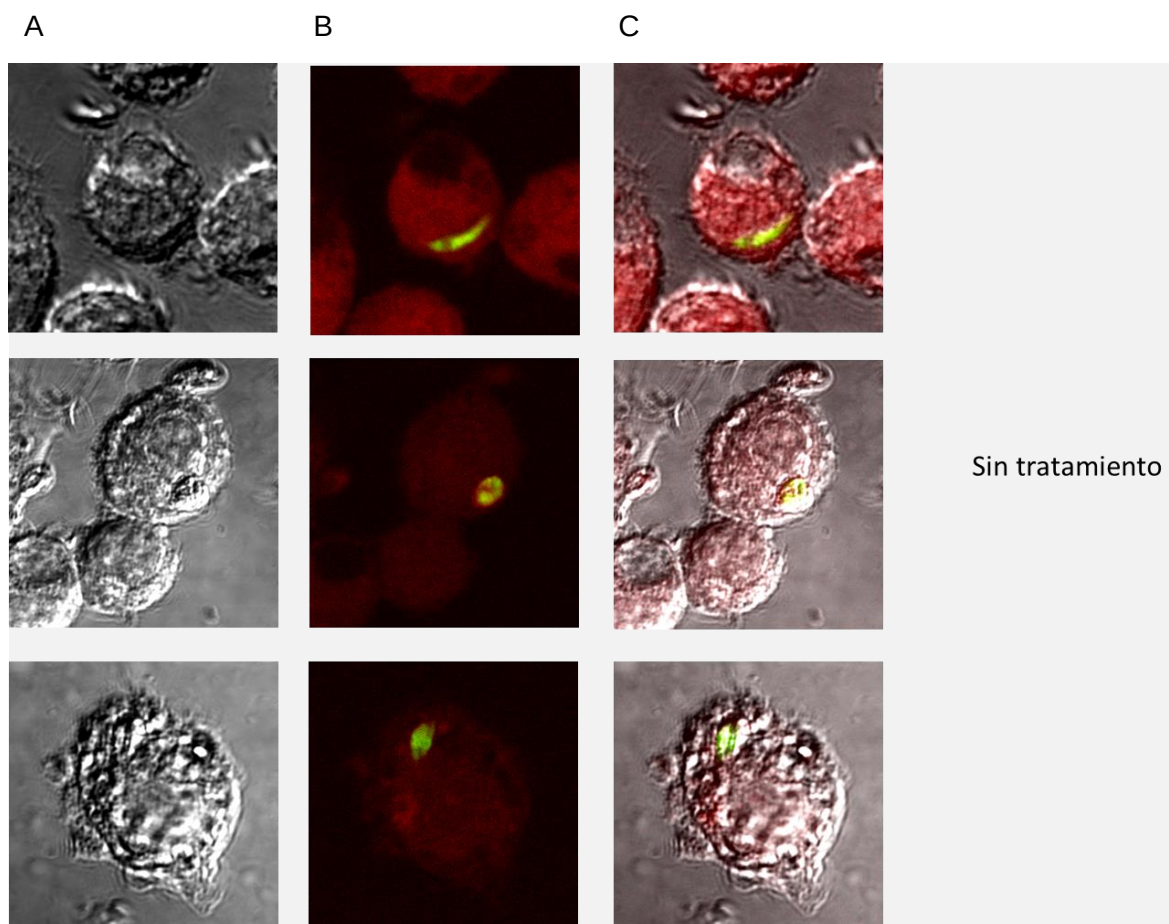
Con el propósito de determinar el posible rol de la actividad de SK durante el proceso de maduración de los fagosomas, se evaluó la acidificación de estos compartimientos, la producción de ROS y la producción de NO por los macrófagos murinos J774 luego de la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación, en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor general de la actividad SK, DMS.

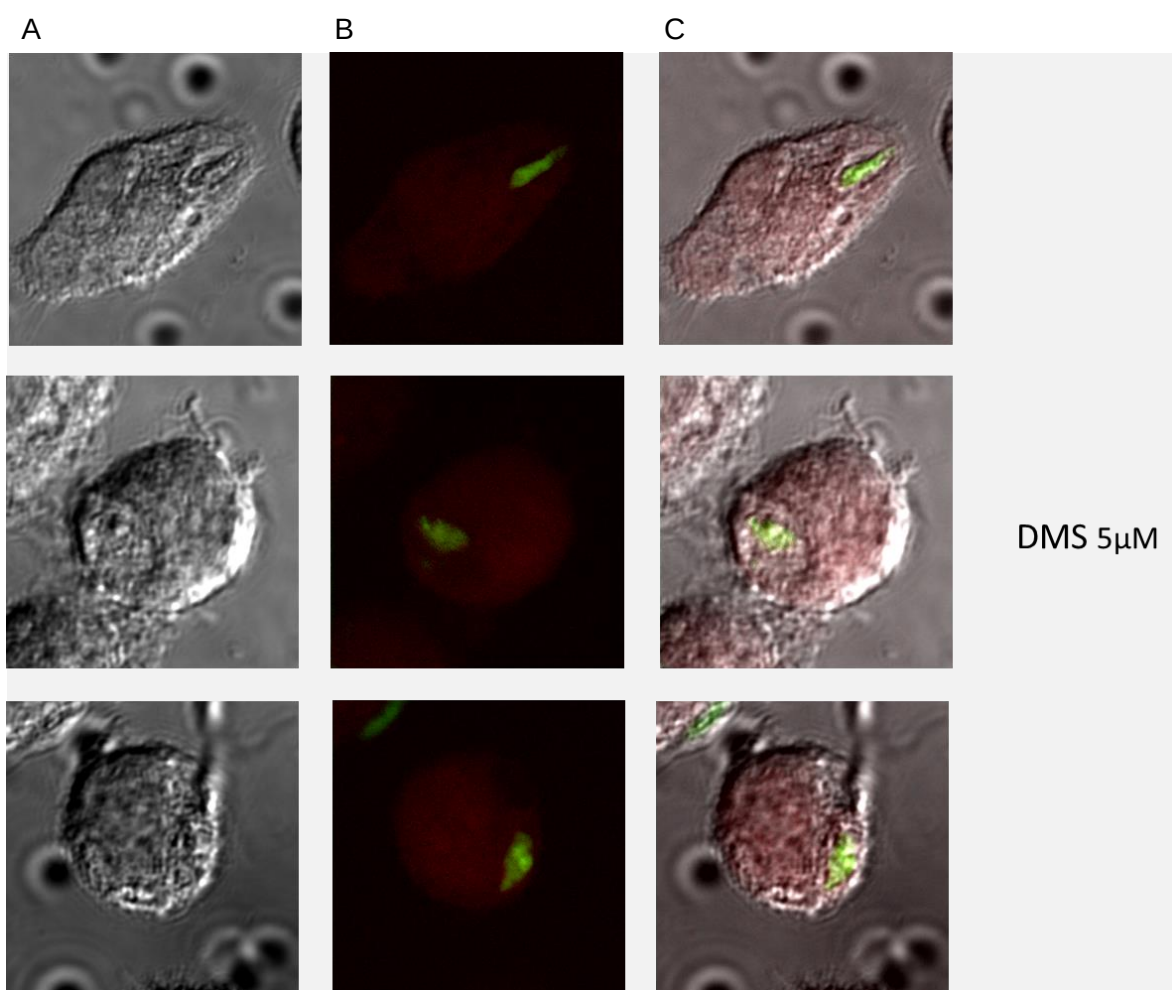
3.1. Efecto de la inhibición de la actividad SK sobre la acidificación de los fagosomas

Macrófagos J774, previamente marcados con *Lysotracker Red*, fueron incubados durante 3 h con promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación, no opsonizados, marcados con el compuesto fluorescente verde CFSE, luego de lo cual fueron incubados durante 1,5 h adicionales en presencia de 5 y 50 μ M DMS.

Se observó que durante la internalización de promastigotes muertos por fijación en ausencia de tratamiento, los macrófagos presentaron una coloración roja difusa, debido al marcaje con *Lysotracker Red*, y tanto los parásitos como sus vacuolas parasitóforas, una coloración entre verde y ligeramente amarilla, sugestiva de una posible co-localización entre ambos fluoróforos (**figura 7**). El análisis de la colocalización mediante el coeficiente de correlación de Pearson arrojó un valor promedio de 0,55. Al evaluar los macrófagos tratados con concentraciones crecientes de DMS, se observaron parásitos completamente verdes y macrófagos marcados con una coloración roja difusa, tanto en el caso de la menor concentración utilizada, 5 μ M (**figura 7**), como de la mayor, 50 μ M (**figura 7**). El análisis de

la colocalización mediante el coeficiente de correlación de Pearson arrojó en la menor concentración un valor promedio de 0,43 y en la mayor concentración un valor promedio de 0,26. Existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo sin tratamiento y aquel con la mayor concentración, Test t ($p < 0,01$)





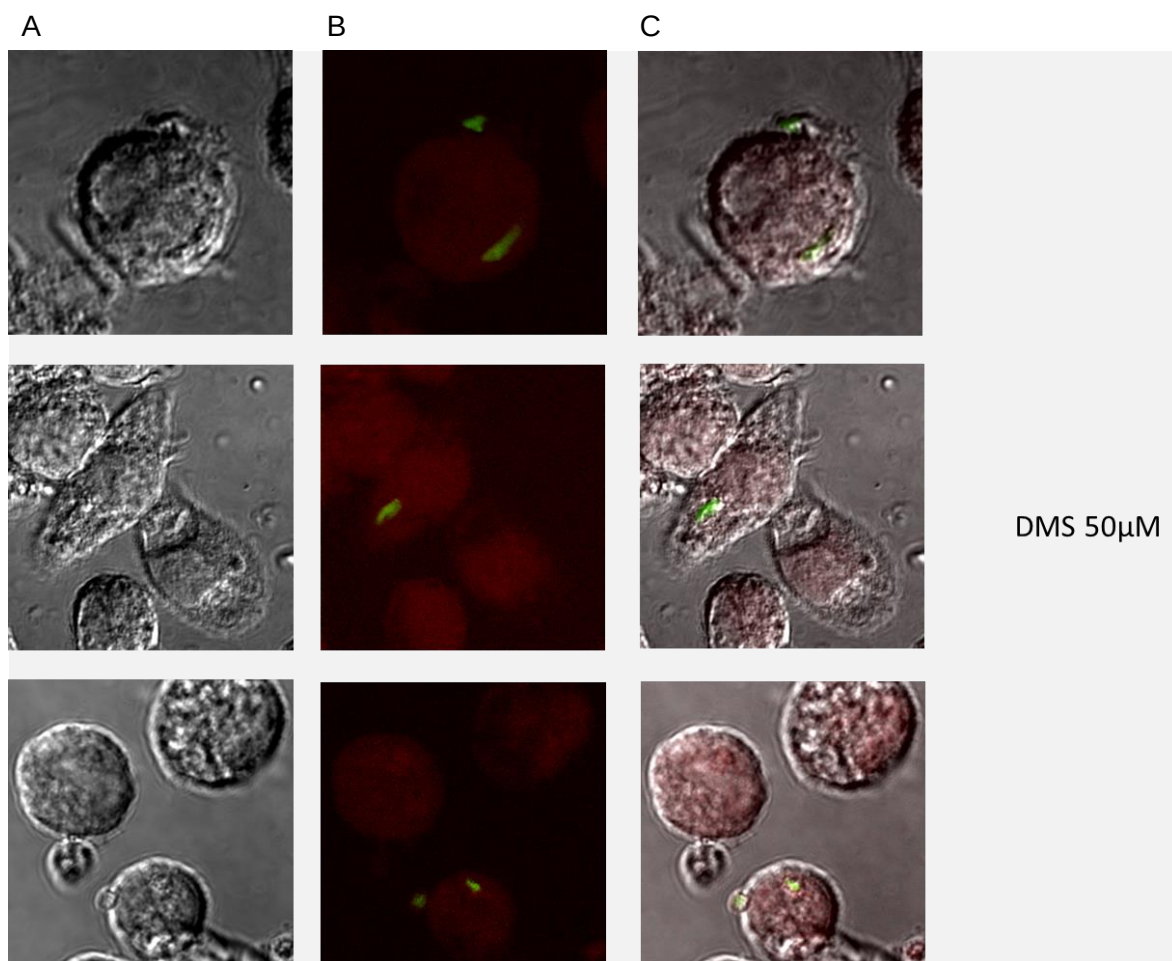


Figura 7. Efecto de la inhibición de la actividad SK sobre la acidificación de los fagosomas de los macrófagos durante la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación. Promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación, marcados con el compuesto CFSE, fueron internalizados durante 3 h por macrófagos múridos J774 marcados con el compuesto *Lysotracker red*, en presencia o ausencia del inhibidor general de las SKs, DMS. A) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC); B) Marcaje fluorescente de macrófagos con *Lysotracker red* (rojo) y marcaje fluorescente de promastigotes de *Leishmania mexicana* con el compuesto CFSE (verde); C) DIC + Marcaje fluorescente de macrófagos con *Lysotracker red* y marcaje fluorescente de promastigotes de *Leishmania mexicana* con el compuesto CFSE.

3.2. Efecto de la inhibición de la actividad SK sobre la producción de ROS

Macrófagos J774 fueron incubados durante 3 h con promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación, no opsonizados, luego de lo cual fueron incubados durante 30 min con el compuesto NBT y 3 h adicionales en presencia de 12,5; 25 y 50 μ M DMS.

En la **figura 8**, se pueden observar los valores de producción de ROS por los macrófagos incubados con promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación. Los resultados muestran que ocurre una disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno por parte de los macrófagos como consecuencia del tratamiento, la cual parece ser dependiente de la concentración, pues a medida que aumenta la concentración del inhibidor, tiende a disminuir la cantidad de ROS producida. La disminución en porcentaje de la producción de ROS, calculada respecto al control valorado como 100%, fue de: 10% cuando se utilizó una concentración de 12,5 μ M; 18% en el caso de 25 μ M; y 26% en el caso de 50 μ M, la mayor concentración del inhibidor DMS evaluada. En todos los casos las diferencias de producción de ROS obtenidas respecto al control fueron estadísticamente significativas. El control positivo, en el que los macrófagos fueron estimulados con LPS, resultó en una producción de ROS superior a todos los grupos experimentales.

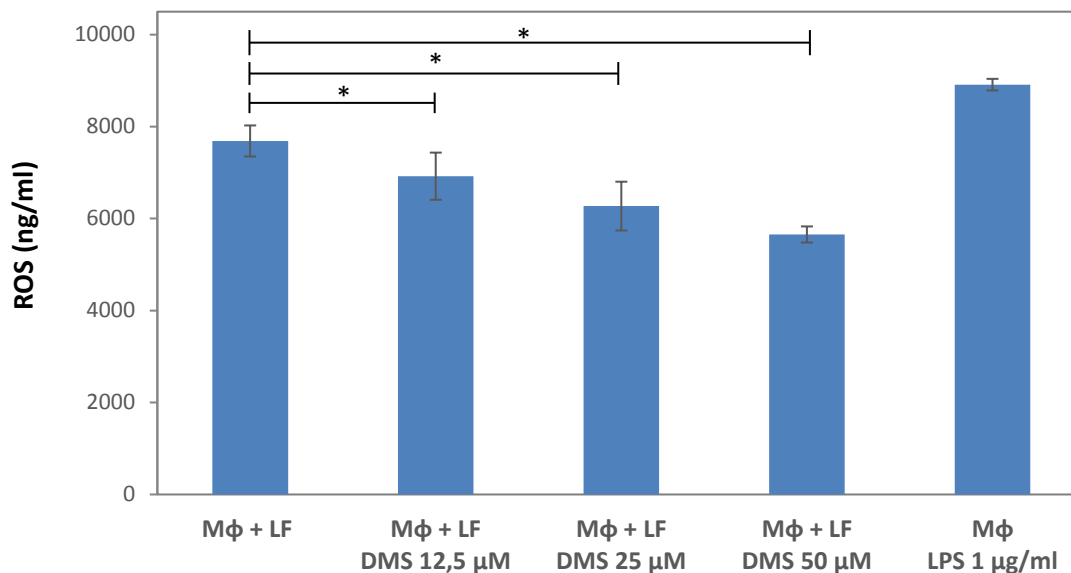


Figura 8. Efecto de la inhibición de la actividad SK sobre la producción de ROS por macrófagos J774 luego de la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación. Los macrófagos fueron incubados con promastigotes fijados durante 3h y luego tratados con concentraciones crecientes de DMS durante 3 h. **Mφ**: macrófagos; **LF**: promastigotes de *L. mexicana* fijados; **LPS**: Lipopolisacárido. Test *t* de Student * ($p < 0,05$).

3.3. Efecto de la inhibición de la actividad SK sobre la producción de óxido nítrico

Macrófagos J774 fueron incubados durante 3 h con promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación, no opsonizados, luego de lo cual fueron incubados durante 3 h en presencia de 12,5; 25 y 50 μM DMS.

En la **figura 9**, se exponen valores de producción de NO por los macrófagos incubados con promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación. Los resultados muestran que ocurre una disminución estadísticamente significativa en la producción de NO por parte de los macrófagos como consecuencia del tratamiento con la concentración 50 μM, no así en el caso de las concentraciones menores. Así mismo el control positivo, en el que los

macrófagos fueron estimulados con INF- γ , mostró una producción de óxido nítrico superior a todos los grupos experimentales.

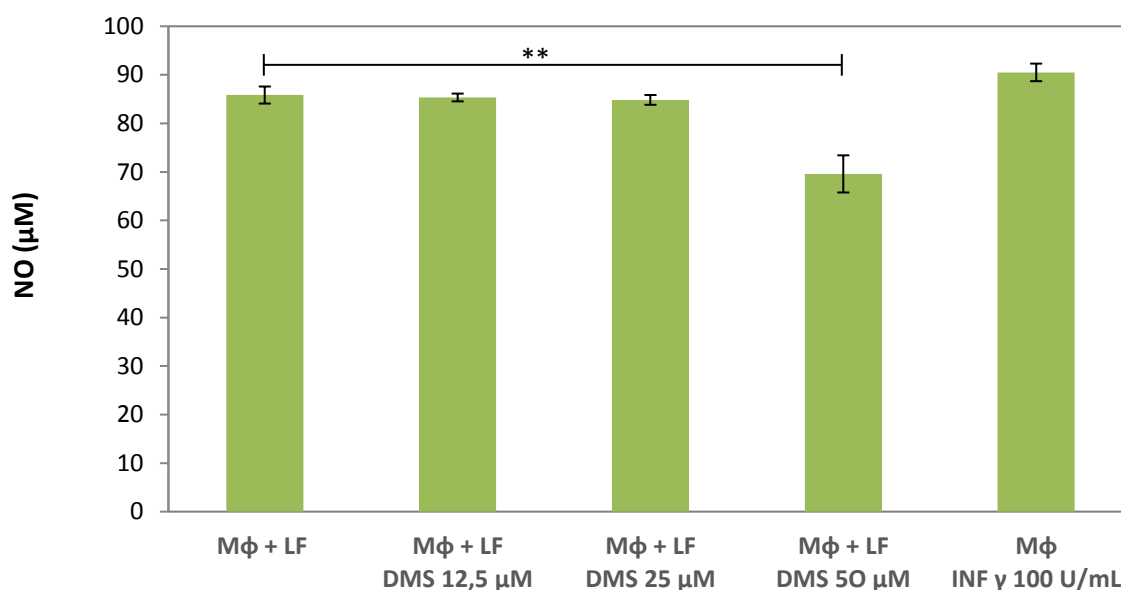


Figura 9. Efecto de la inhibición de la actividad SK sobre la producción de óxido nítrico por macrófagos J774 luego de la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación. Los macrófagos fueron incubados con promastigotes fijados durante 3h y luego tratados con concentraciones crecientes de DMS durante 3 h **Mφ**: macrófagos; **LF**: promastigotes de *L. mexicana* fijados; **INF- γ** : Interferon gamma. Test *t* de Student ** ($p < 0,01$).

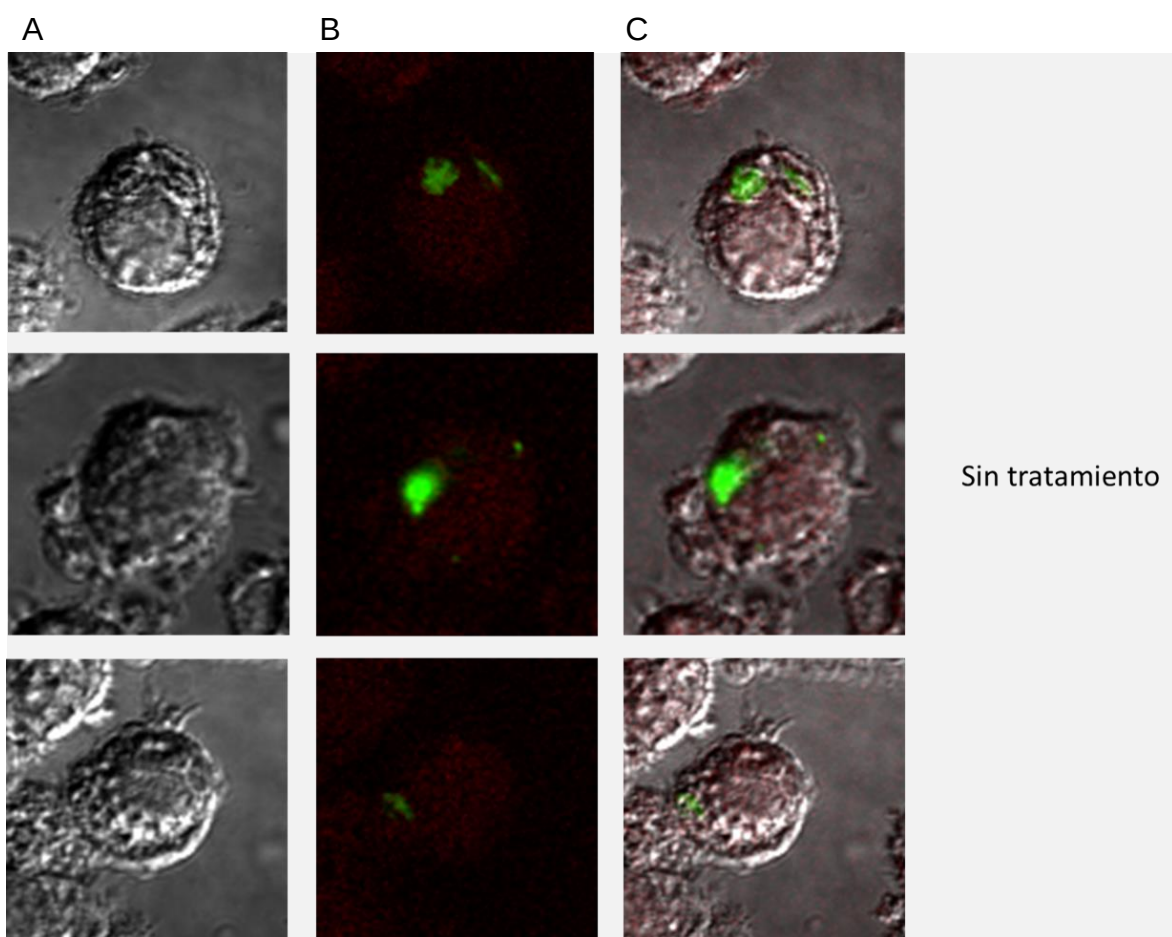
4. Efecto de la esfingosina-1-fosfato sobre la maduración de los fagosomas

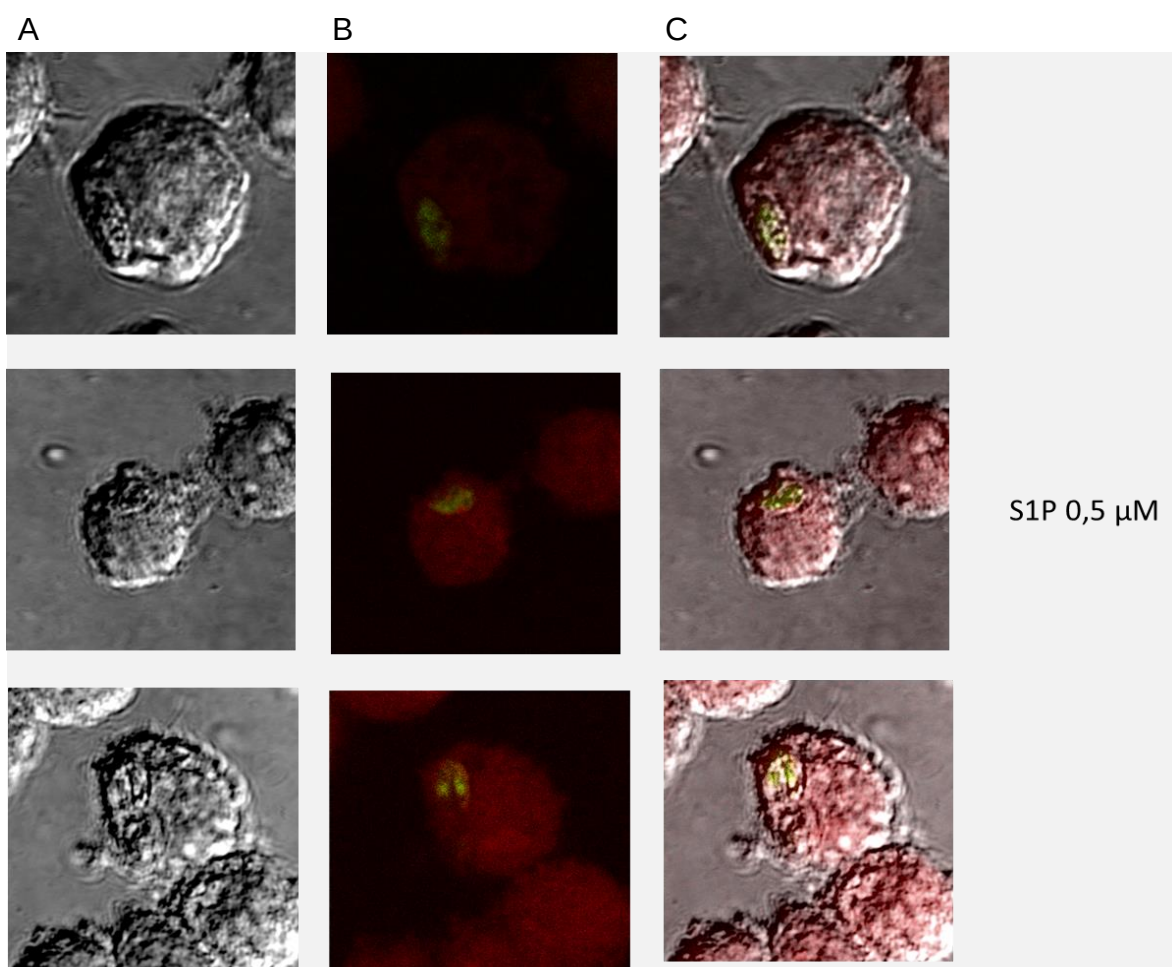
A fin de determinar si la adición externa del producto de las SKs, es capaz de restituir la capacidad del macrófago de efectuar la maduración de los fagosomas, se evaluó la acidificación de estos compartimientos, la producción de ROS y la producción de NO por los macrófagos murinos J774 luego de la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos en presencia de concentraciones crecientes de S1P.

4.1. Efecto de la esfingosina-1-fosfato sobre la acidificación de los fagosomas

Macrófagos J774 previamente marcados con *Lysotracker Red*, fueron incubados durante 2 h con promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos, marcados con el compuesto fluorescente verde CFSE, luego de lo cual fueron incubados durante 1,5 h adicionales en presencia de 0,5 y 5 μ M S1P.

Se pudo observar que durante la internalización de promastigotes vivos sin tratamiento, los macrófagos presentan una coloración roja difusa por acción del *Lysotracker Red* unido a zonas de bajo pH, y los parásitos internalizados una coloración verde debida al marcaje con CFSE, (**figura 10**), el análisis de colocalización a partir del coeficiente de Pearson, reveló un valor promedio de 0,21. Al evaluar concentraciones crecientes de la S1P, se observó una coloración amarilla, tanto en el parásito como en su vacuola parasitófora, indicativa de la co-localización de ambos fluoróforos (**figuras 10**), la cual fue intensa y generalizada en el caso de la mayor concentración evaluada, 5 μ M, con un valor promedio de coeficiente de Pearson de 0,80 con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control sin tratamiento (**figura 10**) Test *t* ($p < 0,01$), y menor, o indistinguible de la observada en los macrófagos sin tratamiento, el caso de la concentración más baja, 0.5 μ M (**figura 5**), con un valor promedio de coeficiente de Pearson de 0,22, no significativo respecto al grupo control.





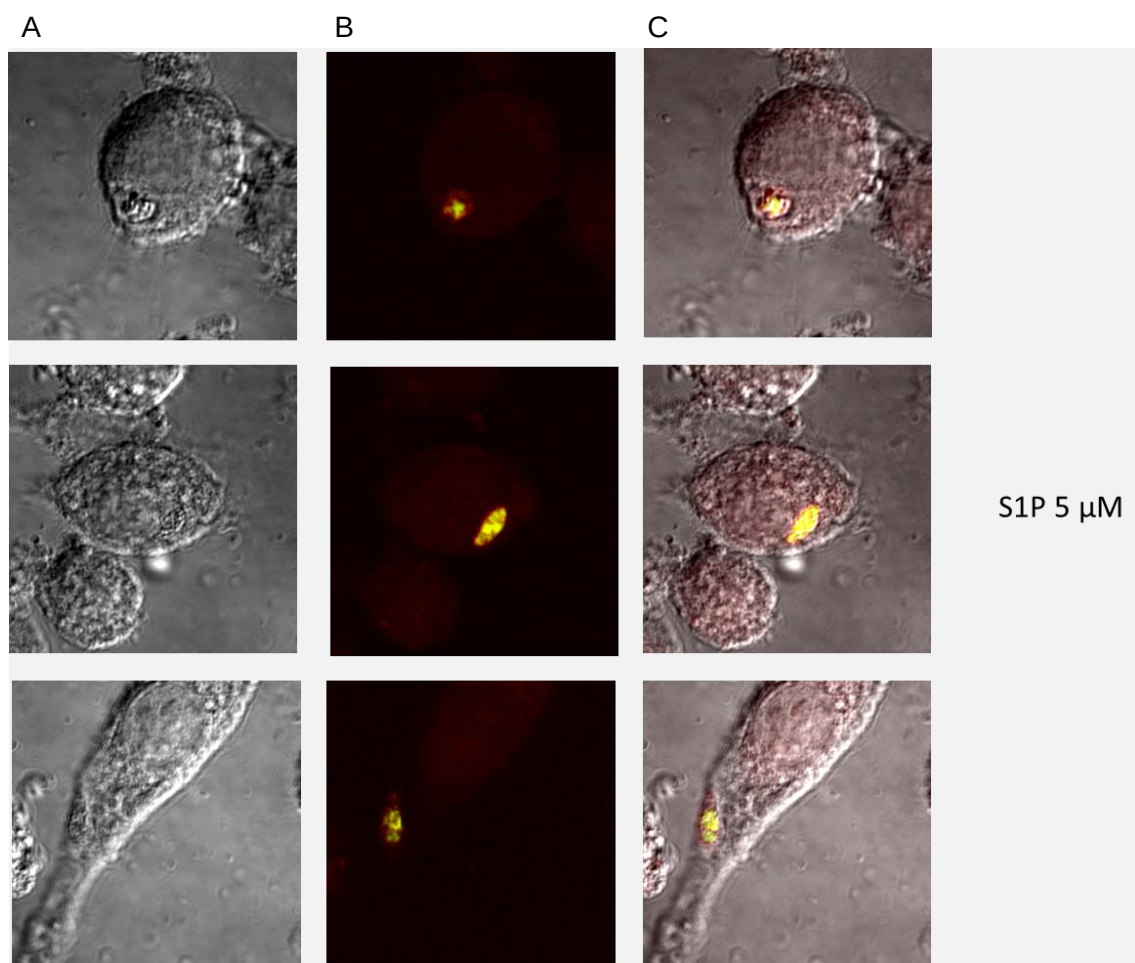


Figura 10. Efecto del producto de las SKs sobre la acidificación de los fagosomas de los macrófagos durante la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos. Promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos, marcados con el compuesto CFSE, fueron internalizados durante 2 h por macrófagos múridos J774 marcados con el compuesto *Lysotracker red*, en presencia o ausencia del producto de las SKs, S1P. A) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC); B) Marcaje fluorescente de macrófagos con *Lysotracker red* (rojo) y marcaje fluorescente de promastigotes de *Leishmania mexicana* con el compuesto CFSE (verde); C) DIC + Marcaje fluorescente de macrófagos con *Lysotracker red* y marcaje fluorescente de promastigotes de *Leishmania mexicana* con el compuesto CFSE.

4.2. Efecto de la esfingosina-1-fosfato sobre la producción de ROS

Macrófagos J774 fueron incubados durante 2 h con promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos, luego de lo cual fueron incubados durante 3 h en presencia de 0,5; 5 y 25 μ M S1P.

En la **figura 11** se muestran los valores de producción de especies reactivas de oxígeno por los macrófagos incubados con promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos. Los resultados indican que ocurre una variación en la producción de ROS en presencia del tratamiento, aumentando la producción de manera dependiente de la concentración de S1P.

El porcentaje de aumento de la producción ROS en los casos en que se agregó tratamiento respecto al control, valorado como 0%, fue de 7% cuando se utilizó la concentración de S1P 0,5 μ M; 11% en el caso de 5 μ M y 18% más en el caso de la mayor concentración evaluada, 25 μ M. En todos los casos las diferencias de producción de ROS obtenidas respecto al control fueron estadísticamente significativas. El control positivo, en el que los macrófagos fueron estimulados con LPS, mostró una producción de ROS superior a todos los grupos experimentales.

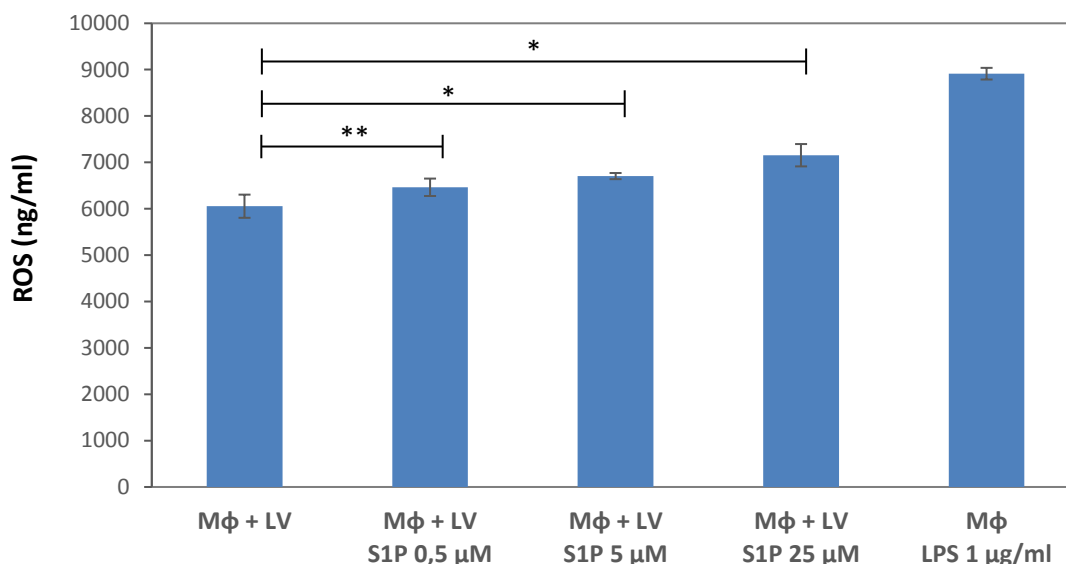


Figura 11. Efecto de la S1P sobre la producción de especies reactivas de oxígeno por macrófagos J774, luego de la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos. Los macrófagos fueron incubados con promastigotes vivos durante 2h y luego tratados con concentraciones crecientes de S1P durante 3 h **Mφ**: macrófagos; **LV**: promastigotes de *L. mexicana* vivos; **LPS**: Lipopolisacárido. Test *t* de Student * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

4.3. Efecto de la esfingosina-1-fosfato sobre la producción de óxido nítrico por los macrófagos

Macrófagos J774 fueron incubados durante 2 h con promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos, luego de lo cual fueron incubados durante 3 h en presencia de 0,5; 5 y 25 μM S1P y se realizó la estimación de la producción de óxido nítrico por estas células, mediante la determinación de la concentración de nitritos en el sobrenadante.

En la **figura 12** se muestran los valores de producción de NO por los macrófagos incubados con promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos. Los resultados indican que la producción de NO en presencia de las concentraciones 0,5 y 25 μM de S1P no difiere significativamente de la observada en ausencia de tratamiento. Sin embargo, a la concentración de 5 μM es

significativamente diferente al basal. Así mismo el control positivo, en que los que macrófagos sanos fueron estimulados con $\text{INF-}\gamma$, reveló una producción de óxido nítrico superior a todos los grupos experimentales.

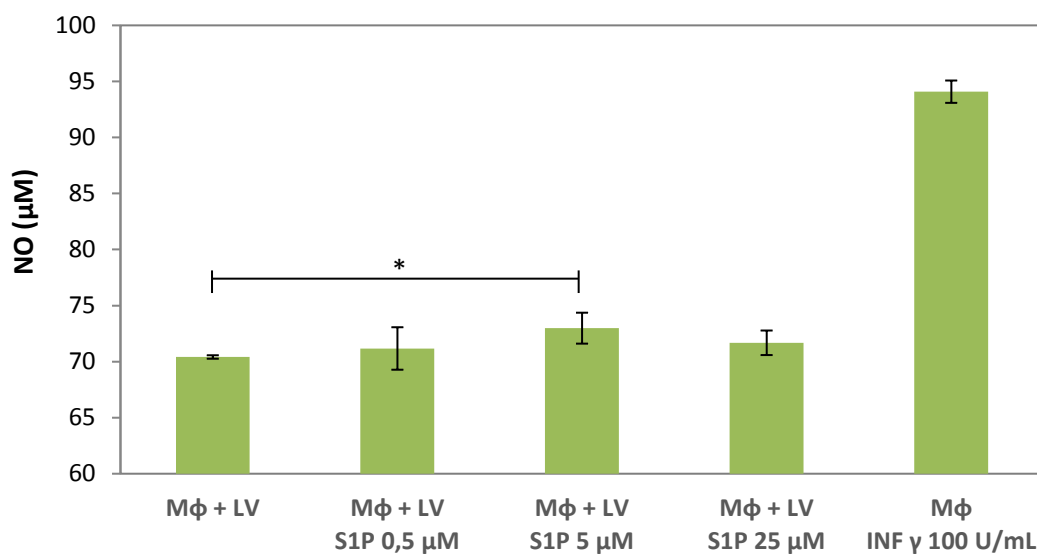


Figura 12. Efecto de la S1P sobre la producción de óxido nítrico por macrófagos J774, luego de la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos. Los macrófagos fueron incubados con promastigotes vivos durante 2h y luego tratados con S1P durante 3 h. **Mφ**: macrófagos; **LV**: promastigotes de *L. mexicana* vivos; **INF-γ**: Interferon gamma. Test *t* de Student * ($p < 0,05$).

VII. Discusión

En este trabajo se profundiza en el estudio del rol de las enzimas SKs del macrófago durante la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron la inhibición de la traslocación de la enzima SK2 de macrófagos murinos J774 por promastigotes vivos de este parásito a la periferia de los fagosomas en formación (Rincón, 2014).

Los resultados del presente estudio confirman que los promastigotes vivos de *Leishmania mexicana* inhiben la traslocación de la enzima SK2 a la periferia de la vacuola parasitófora. Además, demuestran que su traslocación es independiente de la opsonización de los promastigotes fijados con suero de ratón, lo cual constituía una diferencia importante con respecto al tratamiento de los parásitos vivos, tanto en los experimentos previos realizados en nuestro laboratorio (Rincon, 2014), como en los trabajos publicados por otros investigadores que trabajaron con *Mycobacterium tuberculosis* (Thompson y col, 2005). Fue importante establecer, antes de continuar con la investigación, si la opsonización desempeñaba algún rol en el fenómeno observado, ya que ha sido demostrado que esta puede conducir a variaciones en los mecanismos moleculares convocados, incluyendo diferencias en los elementos citoesqueléticos que median la ingestión, en la maduración de las vacuolas y en las respuestas inflamatorias (Aderem y Underhill, 1999).

En 2003, Malik y col, demostraron que *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), interfiere con la maduración del fagosoma durante su internalización por macrófagos. Estos autores observaron, mediante microscopía confocal, que los macrófagos que internalizaban Mtb

muertas mostraban una co-localización entre fagosomas y lisosomas, fenómeno que podía ser impedido por la incubación con el inhibidor de las SK, DMS, mientras que en aquellos que internalizaban Mtb vivas no se observaba colocolización. Esto los llevó a postular que Mtb interfiere con la acidificación de los fagosomas como mecanismo de supervivencia a través de la inhibición de la actividad SK (Malik y col, 2003).

En correspondencia con las observaciones de Malik y colaboradores, en nuestro trabajo, se observó una co-localización moderada ($p = 0,55$) entre fagosomas y lisosomas en macrófagos que habían internalizado promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación, correspondiente a una acidificación leve, pero mayor a la observada en los macrófagos que habían internalizado promastigotes vivos ($p = 0,22$).

La co-localización observada en los macrófagos que internalizaros los parásitos fijados disminuyó significativamente luego del tratamiento con 50 μ M del inhibidor de la actividad SK, DMS ($p = 0,26$), de manera similar a lo reportado por Malik y colaboradores en la internalización de Mtb. Lo cual evidencia la participación de la actividad SK en el proceso de acidificación de los fagosomas durante la internalización de los promastigotes de *L. mexicana* muertos por fijación.

Garg y colaboradores en 2004, demostraron que la adición del producto de las SKs, S1P, es capaz de restituir la actividad antimicrobiana en macrófagos infectados con *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis*, conduciendo a la destrucción de estos microorganismos (Garg y col, 2004). Con base en estos datos, y en el hecho de que *Mycobacterium tuberculosis* utiliza mecanismos de supervivencia dentro de la célula hospedadora similares a los de *Leishmania*, se evaluó el efecto de la S1P sobre la

acidificación de los fagosomas donde estaban siendo internalizados promastigotes vivos de *L. mexicana*. En este caso se observaron resultados similares a los obtenidos por los investigadores mencionados, en macrófagos tratados con la concentración más alta de S1P, 5 μ M, se observó una fuerte colocalización entre los fagosomas donde estaban siendo internalizados los parásitos y los lisosomas ($p = 0,80$), la cual fue mayor a la observada en el grupo control ($p = 0,21$). Sin embargo, no se encontró una diferencia entre la concentración más baja, 0,5 μ M, ($p = 0,22$) y el grupo sin tratamiento, lo cual difiere de lo observado por Garg y col (2004), quienes reportan un efecto dependiente de la concentración. El hecho de que se presente la colocalización a la mayor concentración evaluada, permite sugerir que la S1P puede estar restituyendo la capacidad perdida del macrófago para acidificar el fagosoma, proceso en el adquieren propiedades microbidas al fusionarse con lisosomas (Kaye y col, 2011; Teixeira y col, 2013).

Con base en los conocimientos que se tienen en cuanto a la interferencia de *Leishmania* sobre el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa como mecanismo de evasión (Lodge y Descoteaux, 2006), y a los antecedentes sobre la participación de la actividad esfingosina quinasa en la activación de este proceso durante la infección de los macrófagos por Mtb (Malik y col, 2003; Thompson y col, 2005; Garg y col 2004; Greco y col, 2009; Prakash y col, 2010), se decidió comparar la producción de NO por macrófagos que habían internalizado promastigotes de *L. mexicana* vivos y muertos por fijación, y evaluar el rol de la actividad SK en este modelo de infección.

En nuestro trabajo, se observó una menor producción de ROS por los macrófagos que habían internalizado promastigotes vivos con respecto a los que internalizaron a los

parásitos muertos por fijación. A fin de determinar el posible rol de la actividad SK en la activación de la producción de ROS inducida por la internalización de los parásitos muertos por fijación, se evaluó el efecto de concentraciones crecientes del inhibidor de las SKs, DMS, sobre este proceso. En este caso se observó una disminución, dependiente de la concentración, en la producción de ROS. De manera recíproca, se evidenció un incremento en la producción de ROS, por los macrófagos que internalizaban promastigotes vivos, al ser tratados con concentraciones crecientes del producto de las SKs S1P. Estos resultados sugieren que los promastigotes de *L. mexicana* vivos interfieren con la activación de este mecanismo, como estrategia de supervivencia dentro del macrófago, a través de la inhibición de la actividad SK.

La vía a través de la cual las SKs participan en la activación del ensamblaje del complejo NADPH oxidasa aún no ha sido completamente dilucidada. Sin embargo, se sabe que la actividad de las SKs, está asociada al aumento de la concentración de Ca^{+2} citosólico, necesario para la fusión de organelos (Malik y col, 2003). Por otra parte, Chang y col. en 2007, demostraron que el tratamiento de macrófagos con el lípido ácido lisofosfatídico (LPA), precursor del ácido fosfatídico (PA) induce un aumento en la producción de ROS en macrófagos J774; y Garg y colaboradores en 2004, demostraron que al tratar macrófagos que internalizaban *Mycobacterium tuberculosis* con concentraciones crecientes de S1P, aumenta la producción de PA y en general los mecanismos microbicidas del macrófago. Anteriormente Desai y col en 1992, habían demostrado que la S1P induce el aumento de PA en fibroblastos (Desai y col, 1992). De esta manera, si la S1P promueve el aumento en la

producción de ROS al incrementar la producción de PA, se confirma que este mecanismo microbicida, es regulado por la actividad SK.

Basados en los conocimientos que se tienen respecto a la inhibición de la producción del óxido nítrico, principal mecanismo leishmanicida del macrófago, por algunas especies de *Leishmania* como mecanismo de supervivencia (Liew y col, 1990), y en el hecho de que la producción de este compuesto ocurre concomitantemente al fenómeno de maduración del fagosoma, se evaluó comparativamente la producción de este metabolito por los macrófagos luego de la internalización de promastigotes de *L. mexicana* vivos y muertos por fijación, y se determinó el efecto del inhibidor general de la actividad esfingosina quinasa, DMS, y del producto de su actividad, S1P, sobre su producción.

Pudimos observar que la internalización de los promastigotes vivos de *L. mexicana* inhibe casi por completo la producción de NO por los macrófagos, en comparación con los que internalizaron promastigotes muertos por fijación. La inhibición de la actividad SK, mediante el tratamiento con la concentración 50 μ M del inhibidor general DMS, causó una disminución significativa en la producción de NO por los macrófagos que habían internalizado los promastigotes muertos por fijación, poniendo en evidencia la importancia de las enzimas SKs en la inducción de este importante mecanismo leishmanicida. En cuanto al efecto de la adición exógena del producto de las SKs sobre la restitución de la capacidad de los macrófago que internalizaron promastigotes vivos de producir NO, los resultados resultan aparentemente contradictorios, ya que no se observaron cambios en los macrófagos tratados con la menor y mayor concentración de S1P evaluada (0,5 y 25 μ M), pero si se pudo evidenciar un incremento significativo a la concentración intermedia de 5

μM. Éste último resultado concuerda con lo observado por Prakash y col en 2010, en macrófagos infectados con *Mycobacterium smegmatis*; estos autores demostraron la participación de la enzima SK1 en la vía de señalización que activa la producción de óxido nítrico por parte del macrófago, al silenciar la expresión de SK1 con ARN de interferencia, observaban una disminución en la producción de NO, mientras lo contrario ocurría al sobreexpresar la enzima (Prakash y col, 2010). Esto, de alguna manera, es análogo a lo realizado en este trabajo, pues la inhibición farmacológica de la actividad de las SKs con la concentración 5 μM DMS inhibió la producción de NO, mientras su producto, S1P, la estimuló. Los resultados obtenidos a la máxima concentración evaluada, 25 μM, podrían explicarse considerando las diferentes vías de acción de la S1P.

La S1P, como ya se mencionó, ejerce su papel a través de dos vías, una intracelular y otra extracelular. A nivel intracelular, principalmente se conoce por promover la liberación de calcio desde reservorios intracelulares, un hecho que ha sido demostrado es indispensable para la fusión de organelos y maduración de fagosomas (Mattie y col, 1994; Malik y col, 2003), ahora se sabe que está involucrada en otras vías de señalización, participa como estimuladora de proteínas asociadas a migración celular, regulación del citoesqueleto, transcripción de genes, respiración mitocondrial y otras que aún no han sido estudiadas a profundidad (Maceyka y col, 2012). A nivel extracelular, su reconocimiento por diferentes receptores específicos, le permite ejercer una función autocrina o paracrina que desempeña un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos, como: desarrollo vascular y neural, función cardíaca e inmunidad (Orr Gandy y Obeid, 2013; Spiegel y Milstien, 2002). Con base a este rol dual, sugerimos que los resultados observados sobre la

producción de NO a las concentraciones 0,5 y 5 μM podrían ser debidos a un efecto extracelular de la S1P sobre los receptores de membrana, mientras que el observado a la concentración 25 μM involucraría tanto la vía extracelular como la intracelular, ya que ha sido demostrado que concentraciones de S1P superiores a 10 μM , promueven su traslocación al interior celular, aumentando directamente el pool intracelular del compuesto (Alvarez y col. 2010), sin que el efecto sea mediado por su interacción los receptores de membrana. A nivel intracelular, la S1P desencadena cascadas de señalización distintas, que podrían estar causando una reversión del efecto observado a la concentración de 5 μM donde la acción solo es extracelular.

Recientemente, Mohd y colaboradores demostraron que el tratamiento de macrófagos (diferenciados a partir de la línea de monocitos humanos THP-1) infectados por *L. donovani*, con distintas concentraciones de S1P, causa una disminución en la carga parasitaria (Mohd y col, 2018). Estos investigadores explican el fenómeno a través de parámetros distintos a los evaluados en nuestro estudio; según sus observaciones, el comportamiento natural durante la infección está asociado a una disminución en la expresión de dos receptores de la S1P (S1pr2 y S1pr3) por los macrófagos y a la fosforilación de ERK1/2, asociada a la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. El tratamiento con la S1P revierte estos cambios y causa un aumento en la fosforilación de p38, asociado a la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 (Mohd y col, 2018). Sin embargo, es posible que los efectos tempranos de la S1P sobre la maduración del fagosoma, como los observados en nuestro trabajo, puedan haber contribuido a la disminución de la carga parasitaria observada en este estudio.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo ponen de manifiesto la importancia del eje SK/S1P en la regulación de los eventos que conducen a la maduración del fagosoma durante la internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* por macrófagos murinos J774. Dado que la línea de macrófagos J774 se originó a partir de ratones BALB/c, cepa susceptible a la infección por parásitos de las especies de *Leishmania* causantes de lesiones cutáneas, sería interesante determinar si el mismo comportamiento ocurre en macrófagos provenientes de cepas de ratones resistentes a la infección, como la C57Bl/6.

Este estudio se alinea con la nueva estrategia propuesta por Lamotte y colaboradores en 2017 para el desarrollo de fármacos contra las leishmaniasis, enfocada en la eliminación del parásito, indirectamente, a través de la intervención sobre mecanismos de interacción hospedador-parásito, a fin de eliminar las condiciones permisivas promovidas por sus mecanismos de supervivencia intracelular. Los fármacos dirigidos a moléculas del hospedador, al ser éstas más estables desde el punto de vista evolutivo que las del parásito, serían menos susceptibles al desarrollo de resistencia (Lamotte y col. 2017). De este surgen las enzimas esfingosina quinasas como posibles blancos de estudio en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las leishmaniasis.

VI. Conclusiones

1. La internalización de promastigotes de *Leishmania mexicana* muertos por fijación por los macrófagos múridos J774 induce la maduración de los fagosomas, representada por la acidificación de estos compartimientos, la producción de ROS y la producción de NO.
2. Los promastigotes vivos de *Leishmania mexicana* interfieren con la maduración de los fagosomas que los albergan al inhibir su acidificación, la producción de ROS y la producción de NO.
3. La inhibición de la actividad SK impide la maduración de los fagosomas en los macrófagos que internalizan promastigotes de *Leishmania mexicana* fijados, al evitar su acidificación y el aumento en la producción de ROS y NO.
4. La adición de S1P externa, permite restituir la capacidad del macrófago de efectuar la maduración de los fagosomas cargados con promastigotes de *Leishmania mexicana* vivos, induciendo, a determinadas concentraciones, la acidificación de estos compartimientos, así como el aumento en la producción de ROS y NO.

X. Referencias

- Aderem, A., Underhill, D. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:593–623
- Alvar, J. 2001. Las Leishmaniasis: De La Biología al Control. Editorial: Laboratorio Intervet, S.A., segunda edición, Salamanca, España.
- Alvarez, S., Harikumar, K., Hait, N., Allegood J., Strub, G., Kim, E., Maceyka, M., Jiang, H., Cheng Luo, C., Kordula, T., Milstien, S., Spiegel, S., 2010. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature*, **465**: 1084-1089.
- Antoine, JC., Prina, E., Lang, T., Courret, N. 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbor Leishmania in murine macrophages. *Trends In Microbiology.* **6(10)**:392-401
- Antoine JC., Lang T., Prina E., Courret N., Hellio R., 1999. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of Leishmania-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. *Journal of Cell Science* . **112**, 2559-2570
- Buffet, P., 2008. Leishmaniasis: informaciones para su control y tratamiento. Grupo Serge Lasky, Francia.
- Bobadilla, K., Rivas, B., Sada, E., Torres, M., 2008. Biogénesis del fagolisosoma micobacteriano y su papel en el procesamiento y presentación del antígeno. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* **22(1)**: 56-62.
- Cabrera, M., Blackwell, JM., Castes, M., Trujillo, D., Convit, J., Shaw, MA., 2000. Immunotherapy with live BCG plus heat killed Leishmania induces a T helper 1-like response in American cutaneous leishmaniasis patients. *Parasite Immunol.* **2000(22)**:73-79
- Chang, C., Lin, M., Hsu, H., Yao, C., Hwang, S., Pan, C., Hsu, C., Lee, H. 2007 Lysophosphatidic acid-induced interleukin-1b expression is mediated through Gi/Rho and the generation of reactive oxygen species in macrophages. *J Biomed Sci* **15**:357–363 DOI 10.1007/s11373-007-9223-x
- Charest, H y Matlashewski, G., 1994 Developmental Gene Expression in Leishmania donovani: Differential Cloning and Analysis of an Amastigote-Stage Specific Gene. *Molecular And Cellular Biology* . **14(5)**: 2975-2984
- Coler, R., Goto, Y., Bogatzki, L., Raman, V., Reed, S. 2007. Leish-111f, a Recombinant Polyprotein Vaccine That Protects against Visceral Leishmaniasis by Elicitation of CD4+ T Cells. *Infect Immun.* **75(9)**: 4648–4654

Convit, J., Ulrich, M., Perez, M., Hungc, J., Castillo, J., Rojas, H., Viquez, A., Araya, L., De Lima, H., 2005. Atypical cutaneous leishmaniasis in Central America: possible interaction between infectious and environmental elements. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **99**, 13—17.

Courret, N., Fréhel, C., Gouhier, N., Pouchelet, M., Prina, E., Roux, P., Antoine, J., 2002. Biogenesis of Leishmania-harboured parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *Journal of Cell Science*. **115**: 2303-2316

Dagger, F., Bengio, C., Martinez A y Ayesta, C., 2017. Leishmania mexicana differentiation involves a selective plasma membrane autophagic-like process. *Cell Stress and Chaperones*. doi: 10.1007/s12192-017-0864-z. [Epub ahead of print]

Desai, N., Zhang, H., Olivera, A., Mattie, M., Spiegel, S. 1992. Sphingosine- 1-phosphate, a Metabolite of Sphingosine, Increases Phosphatidic Acid Levels by Phospholipase D Activation. *The Journal Of Biological Chemistry*. **261 (32)**: 23122-23128

Dey, R., Dagur, P., Selvapandivan A., McCoy, P., Salotra, P., Duncan, R., Nakhasi, H. 2013. Live Attenuated Leishmania donovani p27 Gene Knockout Parasites Are Nonpathogenic and Elicit Long-Term Protective Immunity in BALB/c Mice. *J Immunol* . **190**: 2138-2149

Facultad de medicina, Universidad Central de Venezuela. Academia Biomédica Digital VITAE. 2007. Disponible en URL: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=39&n=1165&m=8&e=1229> (Consulta 22 de diciembre 2017)

Garg, SK., Santucci, MB., Panitti, M., Pucillo, L., Bocchino, M., Okajima, F., Bisen, PS., Saltini, C., Fraziano, M., 2006. Does sphingosine 1-phosphate play a protective role in the course of pulmonary tuberculosis? *Clin Immunol*. **121(3)**:260-4.

Garg, S.K., Volpe, E., Palmieri, G., Mattei, M., Galati, D., Martino, A., Piccioni, M.S., Valente, E., Bonano, E., De Vito, P., Baldini, P. M., Spagnoli, L.G., Colizzi, V., Fraziano, M. 2004. Sphingosine 1-phosphate induces antimicrobial activity both in vitro and in vivo. *JID*. **189**: 2129-2138.

Greco, E., Santucci, M.B., Sali, M., De Angelis, F.R., Papi, M., De Spirito, M., Delogu, G., Colizzi, V., Fraziano, M. 2009. Natural lysophospholipids reduce Mycobacterium tuberculosis induced cytotoxicity and induce anti-mycobacterial activity by a phagolysosome maturation-dependent mechanism in A549 type II alveolar epithelial cells. *Immunology* **129**: 125-132.

Green, S., Scheller, L., Marletta, M., Seguin, M., Klotz, F., Slayter M., Nelson, B., Nacy, C., 1994. Nitric Oxide: Cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Elsevier Science*. **43**: 87-94

Griess, J. P. 1864. On a new series of bodies in which nitrogen is substituted for hydrogen. *Phil. Trans. R. S. (Lond.)* **154**: 667—731.

Guevara, J., 2016. Servicio autónomo Instituto de Biomedicina “Dr Jacinto Convit”, Estadística de Leishmaniasis cutánea en Venezuela Historico año 1990-2016. Caracas, Venezuela.

Guevara, J., 2016. Servicio autónomo Instituto de Biomedicina “Dr Jacinto Convit”, Estadística de Leishmaniasis visceral en Venezuela Historico año 1990-2016. Caracas, Venezuela.

Haldar, A.; Sen, P., Roy, S., 2011. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *Molecular Biology International*. Doi:10.4061/2011/571242

Henriques ,C. Atella, G., Bonilha VL., de Souza W., 2002. Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitophorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res* **(2003) 89**: 123–133

Hernández, R., Sánchez, P., García, E., Carreón, E., Meca, J. 2017. Leishmaniasis cutánea agresiva en paciente con esclerosis múltiple tratada con fingolimod. *Neurología*. Doi: 10.1016/j.nrl.2017.01.021.

Hirst, S., Stapley, L. 2000. Parasitology: the dawn of a new millennium. *Parasitol. Today*. **16(1)**:1-3

Kaye, P., Scott, P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature reviews, Microbiology*. **9**: 604-615.

Lamotte, S., Spath, G., Rachidi, N., Prina, E. 2017 The enemy within: Targeting host–parasite interaction for antileishmanial drug discovery. *PLoS Negl Trop Dis* **11(6)**: e0005480. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005480>

Liew, FY., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, RM., Moncada, S. 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*. **144(12)**:4794-7.

Lodge, R., Descoteaux, A., 2006. Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. *Eur. J. Immunol*. **36**: 2735–2744

Maceyka, M., Payne SG., Milstien, S y col. 2002. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. **1585**: 193–201.

Maceyka, M., Harikumar, K., Milstien, S., Spiegel S. 2012. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol*. **22(1)**: 50–60. doi:10.1016/j.tcb.2011.09.003.

Malik, Z.A., Thompson, C.R., Hashimi, S., Porter, B., Iyer, S.S., Kusner, D.J. 2003. Cutting Edge: Mycobacterium tuberculosis blocks Ca²⁺ Signaling and Phagosome Maturation in Human Macrophages Via Specific Inhibition of Sphingosine Kinase. *J Immunol* **170**: 2811-2815.

Mattie, M., Brooker, G., Spiegel, S. 1994. Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway.

Ministerio de Salud y Desarrollo Social. 2002. Anuarios Epidemiológicos 1994-2002. Caracas, Venezuela.

Ministerio de Salud y Desarrollo Social. 2004 .Departamento de Informática. Instituto de Biomedicina. Caracas, Venezuela.

Mohammadiha,A., Dalimi,A., Mahmoodi, M., Parian, M., Pirestani, M., Mohebal, M. 2017.The PCR-RFLP-Based Detection and Identification of the Leishmania Species Causing Human Cutaneous Leishmaniasis in the Khorasan-Razavi Province, Northeast of Iran. *J Arthropod Borne*. **11(3)**: 383–392.

Mohd A., Atahar H., Rahat A., Shams T., Farha N., Mohammad Z., Abdur R. 2018. Sphingosine-1 phosphate signaling in *Leishmania donovani* infection in macrophages. *PLoS Negl Trop Dis* **12(8)**: e0006647. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006647>

Moradin, N., Descoteaux, A. 2012. Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. **Sep. 2**:121 - .

Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology. 9th edition. 2019. Garland Science Publishing. New York.

Organización Mundial de la Salud. 2017. Leishmaniasis. Disponible en URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/> (Consulta noviembre de 2017)

Organización Mundial de la Salud. 2018. Leishmaniasis. Disponible en URL: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (Consulta junio de 2018)

Orr Gandy, KA., Obeid, LM. 2013. Targeting the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate pathway in disease: review of sphingosine kinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. **1831(1)**:157-66.

Podinovskaia, M., Descoteaux, A. 2015. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol*. **10(1)**, 111–129.

Prakash, H., Lüth, A., Grinkina, N., Holzer, D., Wadgaonkar, R., Perez, A., Anes, E., Kleuser, B. 2010. Sphingosine Kinase 1 regulates Mycobacterium smegmatis infection in macrophages. *Plos One*. **5(5)**:e10657.

Rincón, M., 2014. Cambios en la localización sub-celular de las enzimas esfingosina quinasas y su sustrato en macrófagos móridos infectados con Leishmania mexicana. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Rodríguez, N., Cardona, M., Zerpa, O., Barrios, M. 2001. Aplicación de herramientas moleculares en el diagnóstico y caracterización de Leishmania spp. En áreas endémicas de Venezuela. *Bol. Malaria Sanam. Amb*. **41**: 21-26.

Rodriguez, N., De Lima, H., Aguilar, C., Rodriguez, A., Barker, D., Convit, J. 2002. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **96 (1)**: 105-109

Spiegel, S., Milstien, S. 2002. Sphingosine 1-Phosphate, a key cell signaling molecule. *Jour Biol Chem.* **227(29)**: 25851-25854.

Teixeira, D., Benchimol, M., Rodrigues, J., Crepaldi, P., Paolucci, P., De Souza, W. 2013. Atlas Didático. Ciclo de Vida da Leishmania. Fundación CECIERJ, Consorcio CEDERJ. Primera Edición, Río de Janeiro, Brazil.

Thompson, C.R., Iyer, S.S., Melrose, N., VanOosten, R., Johnson, K., Pitson, S.M., Obeid, L.M., Kusner, D.J. 2005. Sphingosine Kinase 1 (SK1) Is Recruited To Nascent Phagosomes in Human Macrophages: Inhibition of SK1 Translocation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **174**: 3551-3561.

Ulrich, M. 2004. Epidemiología y diagnóstico de la leishmaniasis. Ponencia en el Curso Latinoamericano del Instituto de Biomedicina. Caracas, Venezuela.

World Health Organization Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. 22–26 March 2010. Control of Leishmaniasis. WHO Technical Report Series 949, Suiza.

Zerpa, O., Ulrich, M., Borges, R., Rodríguez, V., Centeno, M., Negrón, E., & Convit, J, 2003. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Revista Panamericana de Salud Pública*, **13**: 239-245.

Zerpa, O. 2005. Terapia de leishmaniasis. Ponencia en el 1º Congreso Internacional de Terapéutica. Caracas, Venezuela.