



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO DE ODONTOLOGÍA – HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

UNIDAD DE MEDICINA EXPERIMENTAL

**CÉLULAS TH17 Y NEUTRÓFILOS EN LEISHMANIASIS  
CUTÁNEA CAUSADA POR *L. mexicana***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. en C. CLAUDIA PATRICIA PEDRAZA ZAMORA

**TUTORA**

DRA. INGEBORG BECKER FAUSER

FACULTAD DE MEDICINA

**COMITÉ TUTORAL**

DRA. ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS

FACULTAD DE MEDICINA

Ciudad de México

Abril de 2017.

Este proyecto fue financiado por PAPIIT IN217515 y CONACyT 221405.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud de la UNAM, por la oportunidad de aprendizaje y crecimiento académico que ofrece el programa.

Al CONACyT, por su apoyo financiero durante la realización del Doctorado.

A mi tutora, la Dra. Ingeborge Becker por su apoyo y confianza durante la realización de este proyecto.

Al grupo de laboratorio de Inmunoparasitología del Hospital General de México: Norma Salaiza, Rocely Cervantes, José Sotero Delgado, Edith Fernández, Adriana Ruiz y Jaime Zamora, por su gran apoyo técnico en todos los procedimientos experimentales.

En la Facultad de Medicina, a Ivonne Grisel Sánchez por su apoyo técnico en inmunohistoquímica y a María José Gómora, por su apoyo en la microscopía confocal.

## DEDICATORIA

*A María Zamora González,*

*Mi gran amiga, fiel compañera y adorada madre,  
por sus grandes enseñanzas y su inmenso amor incondicional  
que me brindó siempre y que tras 7 años de su partida,  
me sigue haciendo la misma falta.*

*A Luis Pedraza Hígareda,*

*Mi gran apoyo y fuente de fortaleza y sabiduría,  
de quien siempre he recibido grandes enseñanzas  
y el amor que un buen padre sabe dar.*

## ÍNDICE

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	7
2. RESUMEN .....	8
3. ABSTRACT .....	9
4. INTRODUCCIÓN.....	10
5. ANTECEDENTES.....	12
a. LEISHMANIASIS.....	12
b. <i>LEISHMANIA</i> .....	12
- Biología de <i>Leishmania</i> .....	12
- Morfología de <i>Leishmania</i> .....	13
- Desarrollo de <i>Leishmania</i> en el vector .....	13
c. EPIDEMIOLOGÍA.....	15
- Epidemiología en México .....	16
d. RESERVORIOS.....	17
e. FACTORES DE RIESGO .....	17
f. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	18
- Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) .....	19
- Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) .....	20
- Leishmaniasis mucocutánea (LMC) .....	20
- Leishmaniasis visceral (LV) o kala-azar .....	21
- Leishmaniasis dérmica post-kala-azar (PKDL) .....	22
g. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	23
h. MÉTODOS DIAGNÓSTICO.....	23
i. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS.....	25
- Leishmaniasis cutánea aguda.....	25
- Leishmaniasis cutánea crónica.....	26
j. TRATAMIENTO.....	26
k. RESPUESTA INMUNE FRENTE A <i>Leishmania</i> .....	27
l. NEUTRÓFILOS.....	29
- Morfología del neutrófilo.....	29

- Origen, Diferenciación y Maduración. ....	30
- Tipos de Neutrófilos y plasticidad de los neutrófilos...	31
- Funciones. ....	31
- Serin proteasas, serpinas y supervivencia. ....	34
- La movilización y el tráfico. ....	34
- Interacción neutrófilo-patógeno. ....	35
- Interacciones neutrófilos- células inmunes. ....	35
- Los neutrófilos en la inflamación aguda. ....	36
- Los neutrófilos en enfermedades crónicas y lesiones de tejidos. ....	36
m. CÉLULAS T. ....	37
- Generalidades. ....	37
- Origenm Diferenciación y Maduración ....	37
- Activación de células T ....	38
- Clasificación ....	38
- Células T CD4 ....	39
- Células Th17. ....	40
- Interleucina-17 (IL-17) ....	40
- Células Th17 y su interacción con otras células en Leishmaniasis. ....	41
n. CÉLULAS Th17 Y NEUTRÓFILOS EN LEISHMANIASIS....	42
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ....	44
7. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA. ....	45
8. HIPÓTESIS. ....	46
9. OBJETIVOS. ....	46
10. METODOLOGÍA. ....	47
MODELOS Y MUESTRAS DE ESTUDIO. ....	47
INFECCIÓN. ....	47
Infecciones <i>in vivo</i> . ....	47
Desarrollo de la lesión. ....	48
OBTENCIÓN DE MUESTRAS. ....	48

<b>FIJACIÓN E INCLUSIÓN DE TEJIDOS PARA IHQ..</b> .....	<b>48</b>
<b>DISGREGACIÓN DE TEJIDOS.</b> .....	<b>.49</b>
Disgregación de células de bazo .....	49
Disgregación de células de oreja. ....	.49
<b>CITOMETRÍA DE FLUJO.</b> .....	<b>50</b>
<b>INMUNOHISTOQUÍMICA.</b> .....	<b>.50</b>
Tejidos murinos empleados como controles .....	.50
Muestras experimentales .....	.51
Inmunohistoquímica en tejidos parafinados (CD3, CD4, IL-17) y congelados (NIMP-R14) .....	.51
Inmunofluorescencia .....	.51
<b>ELISA.</b> .....	<b>52</b>
<b>PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS:</b> .....	<b>.52</b>
Análisis de datos. ....	52
Variables. ....	53
<b>PRUEBAS ESTADÍSTICAS</b> .....	<b>.53</b>
ANOVA .....	.53
Análisis de correlación. ....	.54
<b>ANÁLISIS Y OBTENCIÓN DE IMÁGENES.</b> .....	<b>.55</b>
<b>11. RESULTADOS.</b> .....	<b>.55</b>
<b>12. DISCUSIÓN.</b> .....	<b>.73</b>
<b>13. CONCLUSIONES.</b> .....	<b>.79</b>
<b>14. ARTÍCULO IMPRESO.</b> .....	<b>.81</b>
<b>15. REFERENCIAS.</b> .....	<b>95</b>
<b>16. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.</b> .....	<b>.101</b>

## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>CD</b>	Células Dendríticas.
<b>CPA</b>	Célula Presentadora de Antígenos.
<b>FOXP3</b>	Regulador maestro miembro de la familia de proteínas FOX.
<b>G-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos.
<b>H/E</b>	Tinción de hematoxilina y eosina.
<b>LCL</b>	Leishmaniasis cutánea localizada.
<b>LCD</b>	Leishmaniasis cutánea difusa.
<b>LMC</b>	Leishmaniasis mucocutánea.
<b>LV</b>	Leishmaniasis visceral.
<b>MHC</b>	Complejo principal o mayor de histocompatibilidad.
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa.
<b>NK</b>	Células asesinas naturales ó células NK.
<b>NKT</b>	Células T asesinas naturales.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>PGE2</b>	Prostaglandina 2 (Dinoprostona).
<b>PRRs</b>	Receptores de reconocimiento de patrón (Pattern-recognition Receptors).
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno.
<b>TCR</b>	Receptor de Linfocitos T.
<b>TGF-beta</b>	Factor de crecimiento transformante beta.
<b>TNF-beta</b>	Factor de necrosis tumoral beta.
<b>Treg</b>	Células T Reguladoras.
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular endotelial.

## **RESUMEN**

La leishmaniasis cutánea, causada por *Leishmania mexicana*, se asocia a una importante respuesta inflamatoria. En este trabajo se analizó la cinética de las células Th17 y neutrófilos en lesiones de lóbulo de la oreja causadas por *Leishmania mexicana* durante un periodo de 90 días en ratones susceptibles (BALB/c) y ratones semi-resistentes (C57BL/6) infectados con 100,000 promastigotes de *Leishmania mexicana*. El tejido fue disgregado y las células de las lesiones fueron extraídas y cuantificadas por citometría de flujo, mientras que su distribución en los tejidos en relación con los parásitos se analizó por inmunohistoquímica. Nuestros resultados muestran que en ratones BALB/c, tanto las células Th17 como los neutrófilos aumentan concomitantemente y a niveles significativamente más altos en el día 90 post-infección, en comparación con los de ratones semi-resistentes C57BL/6. Nuestros resultados proporcionan nueva evidencia sobre dos tipos de células implicadas importantemente en la inflamación crónica durante la infección por *Leishmania mexicana*, como resultado del reclutamiento de neutrófilos junto con la diferenciación de células Th17, que permanecen en el sitio de infección durante de la fase tardía de la misma. Concluimos que los niveles más elevados de células Th17 y neutrófilos durante lesiones crónicas inflamatorias en ratones BALB/c participan en su mayor susceptibilidad hacia una evolución progresiva de la enfermedad, mientras que la respuesta más controlada de estas células en ratones C57BL/6 posiblemente se relaciona con su mayor resistencia a la infección.

## **ABSTRACT**

Cutaneous leishmaniasis, caused by *Leishmania mexicana*, is associated with an important inflammatory response. In this work we analyzed the kinetics of Th17 cells and neutrophils in ear lobe lesions caused by *Leishmania mexicana* over a 90 day period in a susceptible mouse strain (BALB/c) and in a semi-resistant strain (C57BL/6) infected with  $1 \times 10^5$  promastigotes of *Leishmania mexicana*. The tissue was desegagated, the lesion cells were extracted and quantified by flow cytometry, while their tissue distribution in relation to the parasites was analyzed by immunohistochemistry. Our results showed that in BALB/c mice, both Th17 cells and neutrophils increased concomitantly with higher levels at day 90 post-infection, compared to the C57BL/6 semi-resistant mice. Our results provide new evidence indicating that two types of cells are importantly involved in chronic inflammation during infection by *Leishmania mexicana* as a result of the recruitment of neutrophils together with the differentiation of Th17 cells, that are still present at the site of infection during the late phase. We conclude that the higher levels of Th17 cells and neutrophils during chronic inflammatory lesions in BALB/c mice participate in their increased susceptibility towards a progressive evolution of the disease, whereas the more controlled response of these cells in C57BL/6 mice is possibly related to their increased resistance to the infection.

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias con una amplia distribución mundial, causada por alguna de las especies de *Leishmania*, un protozoo intracelular obligado que infecta macrófagos de piel y vísceras del hombre y de diversos mamíferos. La OMS considera que la leishmaniasis constituye una de las ocho enfermedades tropicales de mayor importancia, con 12 millones de personas infectadas alrededor del mundo en los 88 países. Es una enfermedad zoonótica con una distribución mundial, causada por *Leishmania spp.*<sup>1</sup> En México se presentan 400 nuevos casos cada año y la enfermedad se distribuye en al menos 17 estados del país. Existen más de 20 especies diferentes de *Leishmania* transmitidas por más de 90 especies de vectores<sup>1,2</sup> Dependiendo de la especie infecciosa de *Leishmania*, puede desarrollarse una de las tres formas clínicas: 1) Leishmaniasis Cutánea (LC) que a su vez se divide en Leishmaniasis cutánea "localizada" (LCL) y "difusa" (LCD); 2) Leishmaniasis Mucocutánea (LMC); y 3) Leishmaniasis Visceral (LV) que puede derivar en una complicación denominada leishmaniasis dérmica post kala-azar.<sup>3</sup> La leishmaniasis cutánea es el cuadro clínico más común.<sup>1</sup> En México y en varias regiones de Centroamérica, *Leishmania mexicana* es la principal especie causante de LCL y LCD en humanos y animales.<sup>4-8</sup>

La leishmaniasis es transmitida por la picadura de dípteros pilosos pertenecientes al género *Lutzomyia* en el Continente Americano y *Phlebotomus spp* en el viejo Continente. La hembra adquiere el parásito al ingerir sangre con macrófagos infectados de hospederos vertebrados, y en el intestino del insecto, el parásito inicia un proceso de metaciclologénesis para migrar hacia la faringe y poder ser transmitido nuevamente.<sup>1,9</sup>

La respuesta inmune llevada a cabo después de la infección por *Leishmania* es compleja y está mediada por respuestas innatas y adaptativas. Una vez dentro del huésped mamífero, se induce la rápida fagocitosis que es una estrategia clave inicial para la supervivencia del parásito<sup>10-13</sup> y está principalmente ejecutada por CD, macrófagos y neutrófilos.<sup>14,15</sup> Los neutrófilos son células de corta vida que desempeñan un papel central en el "aclaramiento" temporal del parásito, ya que

ofrecen un refugio transitorio seguro a los parásitos y permiten posteriormente su entrada directa en los macrófagos mediante la expresión de marcadores apoptóticos en la superficie de los neutrófilos.<sup>16,17</sup> La fagocitosis del parásito conduce a la activación subsecuente de las células T CD4 +, que se diferencian en uno de los subtipos de células T: Th1, Th2, Th17 o Tregs (Zhu, 2010) en respuesta a la infección parasitaria.<sup>10</sup> El modelo Th1/Th2, inicialmente propuesto por Mossman y Coffman,<sup>18</sup> fue confirmado en modelos de ratones mostrando que las células Th1 con altos niveles de IFN- $\gamma$  activan mecanismos antimicrobianos en macrófagos, controlando así la infección como se observó en ratones C57BL/6. Por el contrario, las células T CD4+ Th2 están predominantemente presentes en ratones BALB/c, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre las funciones leishmanicidas de los macrófagos contra *Leishmania* y agravando la infección.<sup>11,19,20</sup> El descubrimiento del tercer grupo de células T cooperadoras-efectoras (Th17) ha abierto una nueva visión sobre la inmunopatogenia de las infecciones por *Leishmania*. Las células Th17 producen una variedad de citocinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-17A/F, la citocina más característica de este subtipo celular, que estimula la producción de otras citocinas y quimiocinas como CXCL8 (IL-8), un importante quimioatrayente para neutrófilos.<sup>21,22</sup>

En las leishmaniasis, la función de las células Th17 sigue siendo controversial debido a los resultados contradictorios obtenidos en muestras humanas, modelos murinos y estudios *in vitro*. Para aclarar más la participación de las células Th17 y neutrófilos en las infecciones por *Leishmania* en huéspedes con diferentes fondos genéticos, se estudió y analizó estos grupos de células durante un periodo de tres meses en ratones BALB /c y C57BL/6 infectados con *Leishmania mexicana*.

El objetivo de este estudio fue evaluar la cinética de aparición de células Th17 y neutrófilos desde las 24 horas hasta 90 días post-infección en leishmaniasis cutánea causada por *L. mexicana* en dos diferentes cepas murinas, una susceptible (BALB/c) y otra semiresistente (C57BL/6). La evaluación se realizó de manera cuantitativa a través de citometría de flujo y cualitativamente mediante inmunohistoquímica por técnica de peroxidasa e inmunofluorescencia para analizar la distribución de neutrófilos, células CD4+/ IL17+, parásitos y NETs en los tejidos infectados del lóbulo de la oreja.

## **ANTECEDENTES**

### **LEISHMANIASIS**

La Leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias causadas por varias especies de protozoarios del género *Leishmania* cuya severidad varía desde lesiones cutáneas hasta serios desfiguramientos faciales y corporales, e incluso infecciones sistémicas fatales que pueden llevar a la muerte.<sup>10, 23</sup>

### **LEISHMANIA**

#### **Biología de *Leishmania***

*Leishmania* es un protozooario intracelular obligado que infecta macrófagos de piel y vísceras del hombre y de diversos mamíferos. La enfermedad es transmitida por la picadura de dípteros pilosos pertenecientes al género *Phlebotomus* en el Viejo Continente y *Lutzomyia* en el Continente Americano. La hembra adquiere el parásito al ingerir sangre con macrófagos infectados de hospederos vertebrados. En el intestino del díptero el parásito inicia un proceso de maduración y diferenciación que dura de 4 a 25 días en el cual los amastigotes se diferencian en promastigotes procíclicos que se adhieren al epitelio intestinal mediante la molécula lipofosfoglicano (LPG) y que más tarde durante la metaciclogénesis del parásito, éste se transforma en promastigote metacíclico infectivo permitiendo su desprendimiento del epitelio intestinal y migración a la faringe y cavidad bucal de la mosca. Al picar nuevamente, el insecto regurgita al parásito y se transmite al hospedero vertebrado. El parásito es fagocitado por macrófagos de la piel, células de Langerhans o monocitos circulantes y una vez dentro de los fagolisosomas de las células, los promastigotes se diferencian a amastigotes que proliferan intensamente por fisión binaria provocando el rompimiento de la célula y la infección a células vecinas para que puedan diseminarse localmente hacia membranas mucosas y persistir en la piel o llegar a órganos internos.<sup>2,9,23,24</sup>

Existen 20 diferentes especies conocidas del género *Leishmania* transmitidas por al menos 30 especies de vectores que infectan al hombre y dependiendo de la especie generan distintas respuestas patológicas y tres cuadros clínicos:

Leishmaniasis Cutánea (LC, LCL-localizada y LCD-difusa), Leishmaniasis Mucocutánea (LMC) y Leishmaniasis Visceral (LV).<sup>2,10,23,25</sup>

### **Morfología de *Leishmania***

*Leishmania* es un protozooario intracelular obligado dimórfico que se localiza en macrófagos y células fagocíticas en hospederos mamíferos.

El promastigote (metacíclico) representa la forma infectiva, es elongado (figura 1), extracelular, se desarrolla y multiplica en el

tracto digestivo de los insectos transmisores. Mide de 10 a 20  $\mu\text{m}$ , sin contar la longitud de un único flagelo, cuyo tamaño oscila entre 15 - 25  $\mu\text{m}$ ; presenta un gran núcleo central, ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas y una mitocondria. El cinetoplasto aparece como una banda granular electrodensa dentro de la extensión de la mitocondria, localizado a 1 - 2  $\mu\text{m}$  del extremo anterior del parásito, de donde emerge el flagelo. El axonema que se origina en el cuerpo basal está contenido dentro del bolsillo flagelar.

El amastigote intracelular, la forma replicativa, redondo u oval, reside y se multiplica en fagolisosomas dentro de fagocitos mononucleares de los hospederos, aunque se ha documentado la presencia de amastigotes en neutrófilos y fibroblastos en lesiones de piel.<sup>26</sup> Mide de 2 a 4  $\mu\text{m}$ ; con tinción Giemsa se aprecian un gran núcleo y un cinetoplasto pequeño, ambos de color púrpura, y un filamento delgado que une cinetoplasto y cuerpo basal, éste último apenas un punto visible. El cinetoplasto es una subestructura de la gran mitocondria, con DNA único y se encuentra asociado estrechamente al bolsillo flagelar y al cuerpo basal del flagelo.<sup>27</sup>

### **Desarrollo de *Leishmania* en el vector**

El desarrollo biológico de *Leishmania* en los flebotominos vectores es complejo. Después de la entrada de las formas de amastigotes de *Leishmania*, su ciclo de desarrollo continúa pasando por un proceso de división y de transformación, que va desde promastigotes procíclicos, nectomonas, leptomonas, haptomonas,

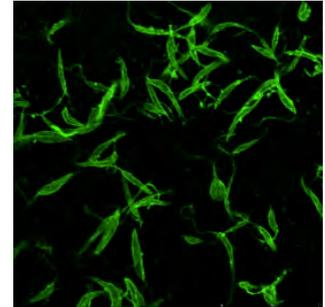


Figura 1. Promastigotes de *L. mexicana* en el día 5 de cultivo, marcados en FITC con anti-LPG. Imagen obtenida del laboratorio de Inmunoparasitología, UME, Hospital General de México-UNAM. Tomada a 40X.

paramastigotes, hasta la formación de promastigotes metacíclicos infectivos. Estos últimos son transmitidos por la picadura de los flebotominos infectados a otro huésped mamífero (figura 2).

Los parásitos, en forma de amastigotes y adquiridos por los mosquitos no se encuentran generalmente en la circulación periférica, sino en la propia piel, dentro de los fagolisosomas de los macrófagos y otros fagocitos<sup>28,29</sup> y su captación es asistida por la acción de corte de las piezas bucales del vector en forma de sierra, las cuales insertan en la piel y las agitan para producir una herida en la que fluye la sangre de los capilares superficiales, por lo tanto, estos flebotominos son considerados “pool feeders”.<sup>30</sup>

Posteriormente para poder completar su ciclo de vida en el insecto, *Leishmania* tiene que desarrollar estrategias adaptativas para sobrevivir a los mecanismos de defensa del mosquito.<sup>31</sup> En la primera etapa los amastigotes se transforman en promastigotes móviles con flagelos (promastigote procíclico), una forma replicativa débilmente motil, que se

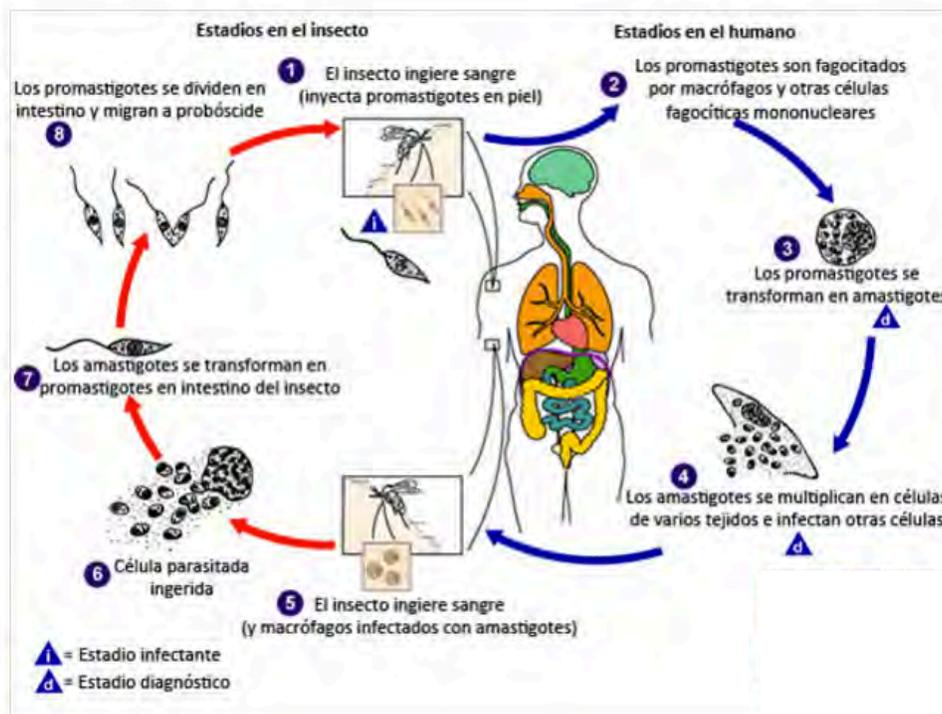


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania*. El insecto ingiere sangre con macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania*; posteriormente en el intestino del insecto, los amastigotes se transforman en promastigotes metacíclicos infectivos los cuales serán regurgitados e inoculados, infectando finalmente al nuevo hospedero.. Fuente: CDC (modificada).

multiplica en el bolo sanguíneo, el cual está confinado por la matriz peritrófica que encierra la sangre que se digiere hacia dentro,<sup>32</sup> para posteriormente ralentizar su replicación y diferenciarse en promastigotes nectomonados alargados, móviles y migratorios capaces de liberarse del bolo para moverse hacia el intestino medio anterior y mediar la fase de establecimiento y persistencia. Posteriormente los promastigotes se transforman en leptomonados, reanudando la replicación y secretando el gel secretor de promastigote (PSG), que es clave en la transmisión. Finalmente, algunos de los leptomonáceos se diferencian en promastigotes metacíclicos que son los estadios mamíferos infecciosos.<sup>9,24</sup>

## **EPIDEMIOLOGÍA**

La leishmaniasis constituye una de las ocho enfermedades tropicales de mayor importancia para la OMS.<sup>33</sup> De acuerdo a la OMS, la leishmaniasis ha sido clasificada como emergente e incontrolable resultando en dos millones de nuevos casos cada año (1.5 millones para Leishmaniasis cutánea [figura 3] y 300 000 para LV [figura 4]).<sup>1,10</sup>

Su distribución mundial está limitada por la presencia del vector en climas cálidos. La enfermedad es endémica en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo y está considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las enfermedades tropicales desatendidas.<sup>27</sup> Alrededor del mundo existen 12 millones de personas infectadas, amenazando a 350 millones de personas más en los 88 países donde prevalece la enfermedad. Sin embargo, esta cifra corresponde solamente al registro obligatorio proveniente de 32 de los 88 países con Leishmaniasis. Además cabe mencionar que 77 de estos son países en vías de desarrollo como es el caso de México.<sup>1,2</sup>

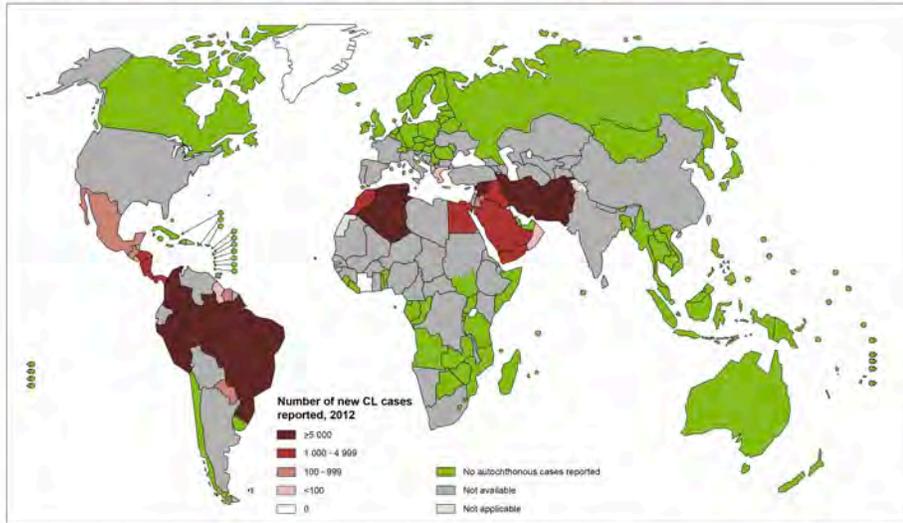


Figura 3. Distribución de casos de LC en el mundo en el 2012.  
Fuente de la imagen: World Health Organization.

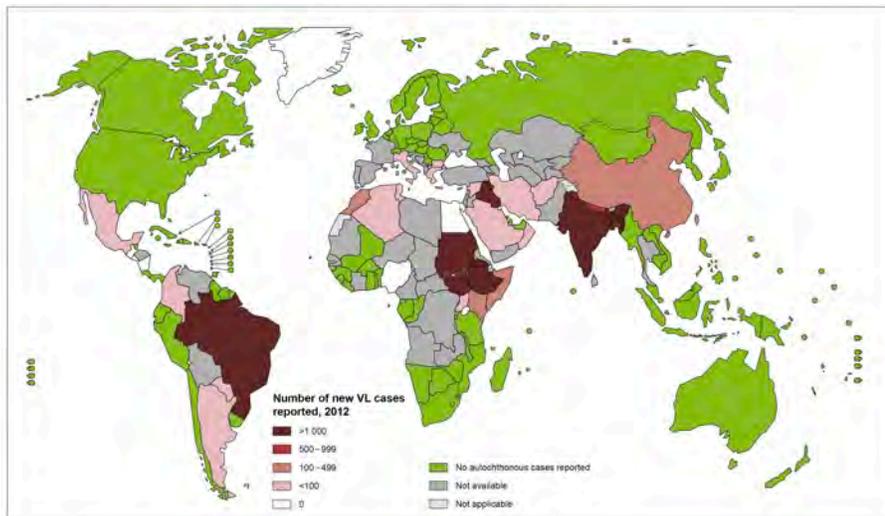


Figura 4: Figura 3. Distribución de casos de LV en el mundo en el 2012.  
Fuente de la imagen: World Health Organization.

### Epidemiología en México

En México la leishmaniasis se remonta a la época prehispánica, sin embargo ésta fue descrita por primera vez en 1912 en Yucatán y en fechas actuales se estima que anualmente se presentan 400 nuevos casos cada año. La enfermedad se distribuye en al menos 17 estados. Los estados afectados van desde Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, Hidalgo y San Luis Potosí por el norte. Yucatán y Quintana Roo por el sureste, por el Golfo se involucran Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Campeche y por

el Pacífico Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco y Nayarit. También afecta estados mediterráneos como San Luis Potosí, Morelos, Puebla e Hidalgo.<sup>2,23</sup>

En México, la mayoría de los casos corresponden a LCL, principalmente en el sureste y en el foco sur y norte del país. Los casos de LCD tienen menor frecuencia y se localizan en ambos focos (sur y norte), con la excepción de Yucatán y Quintana Roo. En los dos tipos de LC la especie identificada ha sido *Leishmania mexicana*. Respecto a la LMC se han detectado casos en los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas y Oaxaca, causados aparentemente por *L. braziliensis*. En cuanto a la LV, existe un foco en la cuenca del río Balsas, entre los estados de Guerrero, Puebla y Morelos, causados por *L. chagasi* y otro foco en Chiapas.<sup>27</sup>

## **RESERVORIOS**

Las leishmaniasis son parasitosis consideradas como zoonosis, donde pequeños mamíferos silvestres y cánidos domésticos son reservorios importantes. En algunas zonas endémicas el hombre se ha convertido en el reservorio principal (para LV y posiblemente LCD). En las zonas de LV el perro es un importante reservorio, a diferencia de las áreas endémicas de las otras variedades clínicas donde roedores, marsupiales y otros mamíferos son los principales reservorios.

En México, existen varios estudios en los que se demuestra la presencia importante de diferentes especies de *Leishmania* en perros: *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. infantum* en Quintana Roo y Yucatán;<sup>4</sup> y *Leishmania infantum* (Sin. *L. chagasi*) en Chiapas.<sup>34,35</sup>

Los perros tienen una función social y como reservorios debido a su estrecha relación con el humano, tanto en áreas rurales como urbanas. Es importante que los médicos veterinarios zootecnistas adviertan sobre el riesgo a los dueños de animales de compañía y les ofrezcan medidas de prevención, entre ellas, el uso de repelentes de moscos y garrapatas.<sup>36</sup>

## **FACTORES DE RIESGO**

### **Condiciones socioeconómicas**

Las malas condiciones de vivienda y las deficiencias de saneamiento de los hogares aumenta el riesgo de leishmaniasis ya que pueden promover el desarrollo de los lugares de cría y reposo de los flebótomos y aumentar su acceso a la población humana. Los flebótomos se ven atraídos por el hacinamiento, ya que constituye una buena fuente de ingesta de sangre.

### **Malnutrición**

Las dietas bajas en proteínas, hierro, vitamina A y zinc aumentan el riesgo de que la infección progrese hacia el kala-azar.<sup>37</sup>

### **Cambios ambientales**

Los cambios ambientales que pueden influir en la incidencia de la leishmaniasis son, entre otros, la urbanización, la integración del ciclo de transmisión en el hábitat humano y la incursión de las explotaciones agrícolas y los asentamientos en las zonas boscosas.<sup>37,38</sup>

### **Cambio climático**

El calentamiento global y la degradación del suelo afectan en muchos aspectos a la epidemiología de la leishmaniasis: los cambios de temperatura, precipitaciones y humedad pueden tener efectos importantes en los vectores y los reservorios animales, al alterar su distribución e influir en las tasas de supervivencia y el tamaño de la población; las sequías, las hambrunas y las inundaciones que se producen como consecuencia del cambio climático pueden llevar a desplazamientos masivos y la migración de personas hacia zonas de transmisión de la leishmaniasis, y la desnutrición puede debilitar la inmunidad de las poblaciones afectadas.<sup>1,37</sup>

## **CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

Las características clínicas varían de acuerdo al cuadro clínico presentado. La leishmaniasis se divide en 4 formas clínicas.

- Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o úlcera de los chicleros.
- Leishmaniasis cutánea difusa (LCD).
- Leishmaniasis mucocutánea (LMC) o espundia.
- Leishmaniasis visceral (LV) o Kala-azar.

## Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

La leishmaniasis cutánea es la forma de la infección con mayor distribución a nivel mundial. Un tercio de los casos ocurre en cada una de las siguientes regiones epidemiológicas: Las Américas, el Mediterráneo, y en Asia, desde el Medio Este hasta Asia Central.<sup>39</sup> Los principales agentes causales en América son *Leishmania mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. Existen casos autóctonos en Texas, EUA, y se considera endémica en toda Latinoamérica, hasta el norte de Argentina, con las excepciones de Chile y Uruguay.<sup>8</sup>

La LCL es conocida en México como "úlceras de los chicleros" debido a que fue encontrada en trabajadores que extraían la goma del árbol del chicle, y con frecuencia se observaba afectando el pabellón auricular, de curso progresivo y mutilante. Se considera un problema de salud pública debido a su amplia distribución geográfica y porque puede llegar a producir lesiones destructivas e incluso discapacitantes.<sup>23</sup>



Figura 5. Lesiones crónicas desarrolladas en áreas corporales expuestas que muestran úlceras únicas con importante destrucción tisular. Imágenes obtenidas de WHO y CDC respectivamente.



Figura 6. Lesión en oreja 4 meses de evolución. Jalisco, México. Imagen: Dra. Teresa Uribarren Berrueta, Facultad de Medicina, UNAM.

En México predominan las úlceras únicas en áreas corporales expuestas (cara, tronco, extremidades) (figuras 5 y 6). El período de incubación varía de una a doce semanas, aunque puede ser más prolongado. La lesión inicial es una pápula que evoluciona a un nódulo eritematoso, pruriginoso e indoloro, acompañada hasta en un 30% de los casos de adenopatía regional, con un diámetro de 1 - 10 cm y que se ulcera en un lapso de 1 a 3 meses. La úlcera característica es redondeada, de borde elevado y bien definido, indurado, cubierta por una costra amarillenta; cuando ésta se

desprende revela un fondo de tejido de granulación limpio. Es posible que aparezcan lesiones satélites. Con alguna frecuencia existe infección secundaria, con lesiones

purulentas y dolorosas. En ocasiones no hay ulceración y se aprecian en su lugar lesiones vegetantes o verrucosas. El cuadro tiende a curar espontáneamente a corto o largo plazo, dejando como secuela una cicatriz visible como una placa atrófica y discrómica con telangiectasias. Es importante hacer notar que cuando afecta pabellones auriculares se produce una úlcera crónica, progresiva, de fondo exudativo, generalmente indolora, que puede ser mutilante sin el tratamiento adecuado.

### **Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD)**

La leishmaniasis causada por especies dermatrópicas puede diseminarse en pacientes inmunocomprometidos. Se caracteriza por lesiones nodulares con gran número de parásitos, diseminadas prácticamente en todo el tegumento, con excepción del cuero cabelludo, regiones inguinal y axilar, genitales externos, plantas y palmas, aunque se han reportado excepciones (figura 7). La enfermedad es de curso crónico, se presentan resistencias a los tratamientos y recaídas.<sup>40</sup> Se asocia a recaídas, infecciones bacterianas secundarias.

La respuesta inmune predominante, no protectora, es de tipo Th2.<sup>2</sup>



Figura 7. Lesiones cutaneas difusas o diseminadas. Imagen obtenida de WHO: Leishmaniasis.

### **Leishmaniasis mucocutánea (LMC)**

Este síndrome es conocido como espundia en Sudamérica. Las manifestaciones clínicas se presentan muchos meses o años después de haberse resuelto la enfermedad cutánea; se deben a metástasis de lesiones cutáneas, aunque en un porcentaje de los casos no es posible identificar la lesión primaria.

Las lesiones se inician principalmente en mucosa nasal, simulando en el inicio una rinitis. Se aprecia inflamación de la mucosa e hipertrofia vascular, con ulceración posterior que llega a comprometer el tabique nasal cartilaginoso (figura 8). El progreso

de la enfermedad es crónico. Puede involucrar el labio superior, paladar, pilares, úvula, epiglotis, cuerdas vocales, hipofaringe, laringe y tráquea.

Los cuadros severos se asocian a dificultad para respirar, deglutir; también se presenta disfonía, afonía e incluso asfixia.

La infección secundaria es frecuente y complica el cuadro. Presenta resistencia a la quimioterapia específica. No es usual en niños, pero cuando ocurre la mortalidad es alta. Las lesiones presentan escasos parásitos.

La respuesta inmune predominante es de tipo Th1.<sup>41</sup>



Figura 8. Lesiones mucocutáneas donde se aprecia la importante destrucción tisular que afecta principalmente mucosa nasa y tejidos bucales circundantes. WHO/TDR.

### **Leishmaniasis visceral (LV) o kala-azar**

Más del 90% de los casos de leishmaniasis visceral a nivel mundial se presentan en seis países: India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía y Brasil. Los agentes etiológicos pertenecen al complejo *L. donovani*. Se estiman unos 400 000 casos nuevos al año, y se considera que 1 de cada 10 pacientes fallece debido a la enfermedad.

En México, los estados en los cuales se han detectado casos de LV son Chiapas, Puebla y Guerrero (la cuenca del Balsas). Los reportes de LV corresponden a *L. chagasi*, principalmente en Chiapas y Guerrero, y se identificó *L. mexicana* en pacientes inmunocomprometidos en Tabasco.

La infección puede ser asintomática, aguda o crónica. En países en desarrollo, los niños con algún grado de desnutrición y los sujetos VIH positivos son la población en mayor riesgo de adquirir la enfermedad progresiva.

El tiempo de incubación es de meses hasta a años. La aparición de signos y síntomas es habitualmente insidioso, y en ocasiones, en el sitio de la agresión se desarrolla un nódulo, permanente, como único signo inicial. Los cuadros agudos son menos frecuentes.



Cuando se manifiesta la enfermedad, es grave, y la mortalidad sin tratamiento es del 100%.<sup>42,43</sup>

Figura 9. Paciente con leishmaniasis visceral presentando hepatomegalia en un estado avanzado (izquierda) y con síndrome de desgaste con anemia (derecha). WHO/TDR.

Los signos y síntomas en niños son: fiebre, palidez, anorexia, pérdida de peso, deficiencia en el crecimiento, tos, vómito, diarrea y epistaxis; esplenomegalia masiva acompañada de hepatomegalia, linfadenopatías, a veces generalizadas, sangrado gingival, equimosis y petequias en extremidades. Los hallazgos de laboratorio indican trombocitopenia, anemia normocítica normocrómica, leucopenia, hipoalbuminemia, hipergammaglobulinemia (por la activación policlonal de células B). La anemia se encuentra hasta en el 90% de los pacientes (figura 9).<sup>44</sup>

### **Leishmaniasis dérmica post-kala-azar (PKDL)**

Esta complicación suele presentarse entre los 6 meses y 3 años posteriores al tratamiento en el 10% de los casos de leishmaniasis visceral. Las lesiones consisten en una erupción macular, maculopapular y nodular (figura 10). Habitualmente inicia en cara y se disemina a tronco y extremidades, de acuerdo a su severidad. En ocasiones se autolimita, pero en una buena parte de los casos requiere tratamiento, ya que puede persistir por años. Su alta mortalidad se relaciona con el inmunocompromiso e infecciones secundarias.<sup>3</sup>

Figura 10. Paciente con post-kala-azar mostrando lesiones maculares, nodulares y diseminadas. Imagen obtenida de WHO/TDR.



## **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.**

En el caso de la leishmaniasis visceral, se deben descartar: paludismo, tuberculosis miliar, brucelosis, fiebre tifoidea, histoplasmosis, toxoplasmosis, hepatitis, desnutrición, linfoma, leucemia, entre otros.

Por otra parte, impétigo, picaduras infectadas de mosquitos, lupus vulgar, lepra, sífilis, cáncer de piel, lesiones causadas por amibas de vida libre y otras patologías, pueden simular un cuadro de leishmaniasis cutánea.<sup>45</sup>

## **MÉTODOS DIAGNÓSTICO.**

Existen varias técnicas de diagnóstico, sin embargo algunas de ellas presentan ciertos inconvenientes, tales como serología que por su complicación y costo económico hacen que sean reservadas para casos especiales o para su aplicación en investigación. Por lo tanto el diagnóstico habitual de la leishmaniasis cutánea se fundamenta en tres pilares:

1. La sintomatología.
2. Los exámenes microscópicos: localización de parásitos en frotis, punción-aspiración con aguja fina y análisis de biopsias de las lesiones.
3. Comportamiento de la respuesta inmunitario celular: test de Montenegro.

### **Clínica**

El polimorfismo clínico es extraordinario, lo que obliga a plantear diagnósticos diferenciales a veces complejos. No obstante, en las zonas endémicas, particularmente, puede existir, en las formas típicas, una certeza diagnóstica muy razonable, a pesar de lo cual suele ser recomendable hacer una confirmación con uno o más de los otros métodos.

### **Diagnóstico parasitológico**

Es el procedimiento más sencillo y útil, cuando es positivo. Consiste en el examen microscópico de frotis de exudado de la lesión o de la extensión tras punción-aspiración con aguja fina de la misma, para comprobar la existencia de amastigotes. La tinción con Giemsa del frotis permite observar los amastigotes en color azul claro, con un núcleo y un quinetoplasto puntiforme, ambos de color púrpura, en el interior del citoplasma de la célula fagocítica.<sup>46,47</sup>

## **Histopatología**

Existe una correlación entre la presentación clínica, a su vez mediatizada por la inmunidad celular del paciente y los hallazgos histológicos: la existencia de gran número de amastigotes y muchos histiocitos sin otras células inflamatorias indica una mala respuesta inmunitaria, un número moderado o escaso de amastigotes suele asociarse a necrosis o formación de granulomas y es sintomático de una inmunidad celular adecuada.

## **Prueba de Montenegro o de la leishmanina**

Consiste en la inyección intradérmica de una suspensión preparada con amastigotes muertos con fenol y se utiliza para valorar la respuesta inmunitaria celular. A las 48 y 72 h se hace la lectura de la reacción inflamatoria.

La positividad indica una infección activa o pasada. Es positivo en leishmaniasis cutánea localizada y en leishmaniasis mucocutánea, y negativa en la leishmaniasis cutánea localizada muy reciente, leishmaniasis diseminada y leishmaniasis tras kala-azar.<sup>48</sup>

## **Otros procedimientos diagnósticos**

Otros procedimientos diagnósticos se utilizan de modo más restringido con fines de investigación o para casos más concretos en la práctica clínica:

1. Estudio *in vitro* de la proliferación de linfocitos T en presencia de antígenos de *Leishmania*, que consiste en poner en contacto una muestra de sangre periférica (una punción en un dedo es suficiente) y se cultiva en presencia de un extracto de amastigotes.
2. La identificación de especies de *Leishmania* puede tener utilidad clínica en casos especiales, como en el caso de viajeros infectados en zonas endémicas. El uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de género o especie específicos de *Leishmania*, permite la identificación en frotis, cultivos, o biopsias, pero debido a su coste se restringe, en principio, a la investigación.
4. La PCR es un método útil y de mayor sensibilidad que la microscopía convencional en la detección de parásitos, en particular cuando éstos son escasos, como ocurre en las lesiones antiguas. Esta técnica permite además la identificación de especie

basados en el ADN del cinetoplasto. A pesar de su indudable utilidad, todavía es una técnica costosa, por lo que su aplicación sigue estando restringida.<sup>49</sup>

## CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

### Leishmaniasis cutánea aguda

Inicialmente hay un infiltrado dérmico denso y difuso compuesto fundamentalmente por histiocitos, linfocitos y células plasmáticas con «cuerpos de Russel» eosinofílicos, que indican producción de inmunoglobulinas. También se encuentran neutrófilos y eosinófilos, generalmente escasos. Los amastigotes pueden verse en el interior de los macrófagos y también en el espacio extracelular (figura 11-A). La ulceración es frecuente y en ocasiones pueden verse focos de necrosis dérmica. Conforme avanza la lesión, se van formando granulomas epitelioides inicialmente en la dermis superior, que pueden ocupar toda la dermis. Pueden verse células gigantes de tipo Langerhans y el número de células plasmáticas aumenta, mientras que el número de amastigotes disminuye y su presencia sólo se puede apreciar en la mitad de los casos de evolución tardía de la leishmaniasis cutánea aguda.

La epidermis suele presentar hiperqueratosis y acantosis (figura 11-B), a veces con hiperplasia pseudoepiteliomatosa, aunque ocasionalmente aparezca paraqueratosis y atrofia. La hiperqueratosis folicular con formación de espigones córneos no es infrecuente y también puede producirse degeneración hidrópica de la capa basal. Infrecuentemente pueden verse microabscesos intraepidérmicos de neutrófilos, o amastigotes en el interior de los queratinocitos (figura 11-C).<sup>50,51</sup>

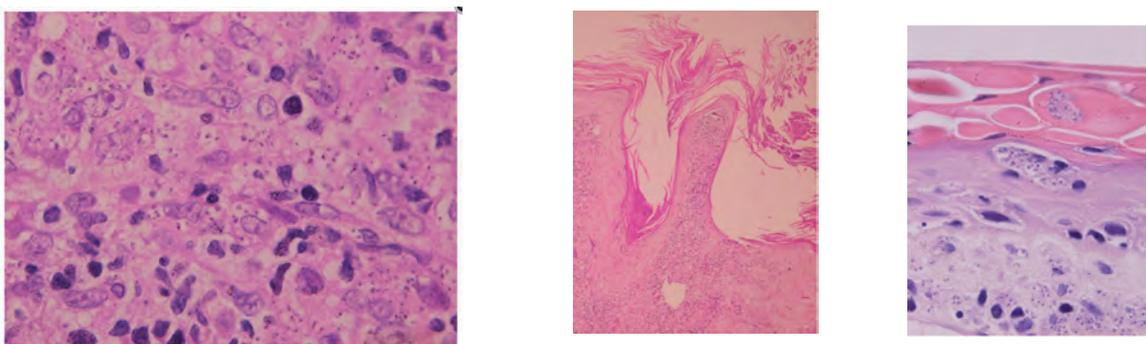


Figura 11. Hallazgos histológicos de leishmaniasis cutánea aguda mostrando amastigotes intracelulares (izquierda), hiperqueratosis (centro) y amastigotes intradérmicos(derecha). Imagen tomada de Leishmaniasis cutánea, García-Almagro, 2005.

### **Leishmaniasis cutánea crónica**

Las formas comunes no presentan grandes diferencias con los estadios tardíos de la leishmaniasis cutánea aguda. El componente granulomatoso se hace más predominante y hay más células plasmáticas, mientras que los amastigotes son más difíciles de encontrar. La dermis está ocupada en todo su grosor por un denso infiltrado difuso o nodular compuesto por granulomas epitelioides bien organizados, rodeados por linfocitos y con la presencia ocasional de eosinófilos y células plasmáticas. El infiltrado puede estar junto a la epidermis, en cuyo caso puede aparecer hiperplasia pseudoepiteliomatosa, o dejar una banda de dermis respetada con una epidermis normal. En algún caso puede tener lugar una reacción liquenoide con atrofia epidérmica, hiperqueratosis folicular y degeneración hidrópica focal de la capa basal, acompañada de pérdida de pigmento de los melanófagos dérmicos. La atrofia y pérdida de folículos pilosebáceos es frecuente y hay una pérdida de fibras elásticas que se corresponde con el aspecto cicatricial de las lesiones en la sintomatología. Habitualmente no hay presencia de amastigotes en las lesiones.<sup>50,51</sup>

La histopatología de la leishmaniasis cutánea difusa es similar a la de la lepra lepromatosa, como lo es la sintomatología. La dermis está ocupada por un infiltrado de macrófagos vacuolados, dispuestos en un patrón difuso y sin formación de granulomas. Los amastigotes están presentes en gran número dentro y fuera de las células. Los linfocitos, células plasmáticas y células gigantes son escasos. La epidermis puede estar atrófica, ulcerada o hiperplásica.<sup>3,49</sup> En la leishmaniasis dérmica post kala-azar (PKDL), suele haber atrofia epidérmica con hiperqueratosis folicular y, en dermis, el cuadro es similar al de la leishmaniasis lupoide. Cuando se observan parásitos, éstos son escasos.<sup>3,49</sup>

### **TRATAMIENTO**

En la actualidad, todos los tratamientos convencionales implican un elevado costo, falta de efectividad en muchos casos, resistencias y diversos efectos secundarios. El tratamiento de leishmaniasis cutánea y mucocutánea incluye a los antimoniales pentavalentes: antimoniato de meglumina (Glucantime) y estibogluconato de sodio (Pentostam). Otros fármacos sistémicos utilizados son: Anfotericina B, Anfotericina B

liposomal (AmBisome), Anfotericina B desoxicolato, y pentamidina, esta última de empleo muy restringido debido a su toxicidad. Miltefosine, fue aceptado en India para tratamiento de la leishmaniosis visceral desde 2002, y en América se acepta para tratar lesiones cutáneas y mucocutáneas; sin embargo, se han identificado un gran número de recaídas.<sup>49</sup>

Ante la leishmaniasis cutánea diseminada, los resultados son desalentadores, con frecuentes recaídas. Se ha reportado el empleo de meglumina + anfotericina B con efectos moderados, y resultados excelentes pero transitorios con la utilización de miltefosine. En el tratamiento local de la leishmaniasis cutánea, los antimoniales sistémicos o intralesionales y a algunos métodos físicos, por separado o combinados son eficaces en lesiones pequeñas.<sup>52</sup>

Respecto a las vacunas, el laboratorio farmacéutico Virbac, lanzó en España una vacuna contra la leishmaniasis canina en Europa, CaniLeish, con resultados variables. Recientemente se han investigado diferentes proteínas recombinantes. Entre ellas, son promisorios los resultados obtenidos con LEISH-1, de IDRI, y sus trabajos posteriores con LEISH-2 y LEISH-3.<sup>45,53</sup>

## **RESPUESTA INMUNE FRENTE A *Leishmania***

La permanencia del parásito depende de una equilibrada relación huésped-parásito. La sobrevivencia inicial del parásito en el hospedero vertebrado es favorecida por un factor salival del insecto, maxadilán, un potente vasodilatador encontrado en la saliva del insecto que inhibe la producción de TNF-alfa, disminuye la producción de óxido nítrico por el macrófago y sobrerregula la producción de citocinas asociadas a una respuesta Th2.<sup>2,25</sup>

La inmunidad contra *Leishmania* es mediada por la vía innata y adaptativa de defensa del hospedero. Los macrófagos, neutrófilos y CD juegan un papel fundamental en la infección, al ser los primeros componentes celulares en entrar en contacto con el parásito y fagocitarlo.<sup>10,11</sup> Los macrófagos junto con neutrófilos y células dendríticas tienen funciones fagocíticas cooperadoras entre ellos. Una de las actividades efectoras antimicrobiales involucra la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos (que previamente han fagocitado al parásito) y neutrófilos no apoptóticos con señales de

“eat me”, lo que resulta en el mejoramiento de la capacidad antileishmanicida del macrófago al adquirir y utilizar potentes moléculas microbicidas del neutrófilo. Dicha fagocitosis en el foco de inflamación ayuda en el control de la infección y prevención de autólisis de neutrófilos, acelerando con esto la resolución “transitoria” de la inflamación asociada a la infección,<sup>11,54</sup> sin embargo se ha reportado previamente que la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos infectados por parte de los macrófagos, representa un mecanismo temporal de supervivencia del parásito al usar al neutrófilo como “caballo de Troya”.<sup>26,55</sup>

Las células fagocíticas se unen al parásito mediante diversos receptores (receptores de complemento CR1 y CR3, receptores tipo lectina, receptores fagocíticos tipo toll –TLR-, entre otros) que reconocen principalmente dos moléculas que recubren la superficie del parásito: gp63 y LPG.<sup>2,23</sup> La unión con múltiples receptores permite al parásito ser fagocitado rápidamente protegiéndolo de los mecanismos líticos del complejo de ataque a la membrana (MAC). Una vez dentro del fagolisosoma, el parásito sufre una metacicloogénesis pasando de promastigote a amastigote y secreta superóxido dismutasa, fosfatasa ácida y la glicoproteína gp63, degrada enzimas lisosomales para su supervivencia intracelular.<sup>2,25</sup> Durante la fagocitosis, así como a partir de la activación de receptores tipo toll (que reconocen PAMP), se liberan citocinas de la respuesta inmune innata que inducen la producción de citocinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-12, IL-1, IL-6, producción de óxido nítrico –NO-, expresión de moléculas coestimuladoras CD40) necesarias para la activación de células NK capaces de activar macrófagos e inducir la diferenciación de linfocitos T CD4+ y establecer una respuesta de tipo linfocitario contra el parásito.<sup>2,10</sup>

La respuesta inmunológica depende entre otros factores, de la especie infectiva de *Leishmania* así como de la subpoblación de linfocitos T CD4+ activados en una respuesta Th1, Th2 ó Th17. La producción temprana de IL-12 por macrófagos y CD induce una cascada de estimulación que lleva a la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia Th1. Los linfocitos T CD4+ Th1 refuerzan la activación del macrófago en etapas tardías de la infección con el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa y son responsables del control de la leishmaniasis, mientras que los linfocitos T CD4+ Th2

establecen un efecto inhibitor sobre las funciones leishmanicidas del macrófago agravando la infección y llevando a una progresión de la enfermedad.<sup>2,11</sup>

## NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos son los leucocitos de tipo de granulocítico más abundantes en la sangre humana (representando aproximadamente el 60-70% de todos los glóbulos blancos de la sangre), donde patrullan y protegen de agentes patógenos, siendo indispensables para el control de infecciones bacterianas y micóticas, a través de sus funciones principales están la de fagocitar y destruir a bacterias y participar en procesos inflamatorios, de daño tisular y reparación.<sup>56</sup> Su vida media es muy corta (de horas a días, esto es: de 1.5 a 12.5 horas en ratones y de 8 horas hasta 5.4 días en humanos).<sup>57</sup> Los neutrófilos son atraídos por quimiotaxis por productos procedentes de células muertas, polisacáridos bacterianos y productos de degradación del complemento. Al estimular su movilización salen de los vasos sanguíneos por diapédesis. Los neutrófilos tienen en su membrana receptores que reconocen anticuerpos, factores del complemento unidos a bacterias y polisacáridos bacterianos. Esto estimula la fagocitosis de las bacterias y su posterior destrucción.<sup>56</sup>

### Morfología del neutrófilo

Los neutrófilos miden de 10 a 12  $\mu\text{m}$  diámetro; se caracterizan por tener un núcleo multilobulado (con 2 a 5 lóbulos) unidos por finas hebras de material nuclear, por lo que también se llaman leucocitos polimorfonucleares. Hay un 10% de neutrófilos que tienen un núcleo alargado y de grosor uniforme que son los neutrófilos bastonados (neutrófilos jóvenes que presentan el núcleo en banda- figura 12).

Los neutrófilos reciben ese nombre por no tener preferencia por colorantes ácidos ni básicos. Poseen gran cantidad de gránulos y lisosomas en su

citoplasma con diferentes contenidos (enzimas lisosomales, catepsina G, colagenasa

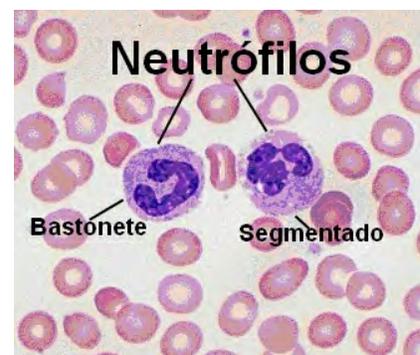


Figura 12. Neutrófilo en banda (izquierda) y segmentado (derecha). Imagen original tomada de UWA, disponible en: [www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/blood/blood.htm#Neutrophilic](http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/blood/blood.htm#Neutrophilic)

inespecífica, colagenasa G, fosfolipasa A2, fosfatasa alcalina, fagocitina, entre otros) que les permiten realizar sus funciones específicas. Los neutrófilos contienen tres tipos de gránulos:

Gránulos específicos (Secundarios): son más pequeños, contienen diversas enzimas y activadores del complemento y otros péptidos antimicrobianos.

Gránulos Azurófilos (Primarios): son más grandes, funcionan como los lisosomas de los neutrófilos y contienen mieloperoxidasa (MPO).

Gránulos Terciarios: un tipo contiene fosfatasas y otro tipo contiene metaloproteinasas.<sup>58</sup>

### **Origen, Diferenciación y Maduración.**

Los neutrófilos se desarrollan en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas en un proceso llamado "granulopoyesis". Los neutrófilos maduros se caracterizan por sus núcleos segmentados y presencia de gránulos, los cuales están llenos de proteínas (> 700). El linaje de neutrófilos de médula ósea pueden ser dividido en tres compartimentos: (1) el conjunto o pool de células madre compuestas de células madre hematopoyéticas y progenitores pluripotentes; (2) el pool mitótico compuesto de mieloblastos proliferantes con linaje comprometido, promielocitos y mielocitos; y (3) el pool post-mitótico compuesto de metamielocitos, células de la banda, y neutrófilos maduros. Los neutrófilos de médula ósea post-mitótico constituyen el 95% de los neutrófilos en el cuerpo y esta reserva es fácilmente movilizada y reclutada rápidamente a los sitios de infección.

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es el factor predominante que regula el ciclo vital de los neutrófilos al incrementar la proliferación celular, supervivencia, diferenciación, y el tráfico/movilización. G-CSF induce proliferación y expresión de proteínas anti-apoptóticas y regula la expresión de quimiocinas. El mantenimiento de los números de neutrófilos se encuentra también regulado por la apoptosis de neutrófilos apoptóticos por macrófagos, un proceso denominado "Eferocitosis". La eferocitosis reduce la producción de interleucina IL-23 e IL-17, y modula la producción de G-CSF. Recientemente, la autofagia se ha reportado como un regulador negativo del desarrollo de neutrófilos en la médula ósea.<sup>16,56</sup>

## **Tipos de Neutrófilos y plasticidad de los neutrófilos.**

La heterogeneidad de los neutrófilos ha sido demostrada en los últimos años a varios niveles, basándose básicamente en su actividad proangiogénica/proinflamatoria o supresora, así como a diferentes perfiles de expresión de receptores asociados a distintos subtipos de neutrófilos, algunos de estos son: neutrófilos Olfactomedin 4+, neutrófilos CD177+ (NB1), CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>dim</sup> (neutrófilos supresores en la inflamación sistémica), neutrófilos CD66b+/CD33+ (MDSCs baja densidad), CXCR4 + (envejecidos / senescentes), MMP-9+ (pro-angiogénicos), neutrófilos ICAM-1/CD54+ (asociados a inflamación sistémica y migración reversa), neutrófilos N1/N2 (asociados a tumores - Tans), por mencionar algunos.

Más allá de la heterogeneidad, los neutrófilos presentan plasticidad funcional y pueden transdiferenciarse en: los híbridos CD-neutrófilos que tras la estimulación de GM-CSF muestran características fenotípicas y funcionales de neutrófilos y DC; células similares a CD -como en la artritis reumatoide; (lii) CPAs MHC II+, inducidas por la acidosis, citocinas, y factores de crecimiento y que se encuentran en las enfermedades inflamatorias crónicas y (iv) los fagocitos gigantes, asociados con la autofagia. Además, en condiciones inflamatorias, los neutrófilos en banda pueden transdiferenciarse en monocitos.<sup>56,57,59</sup>

## **Funciones**

Los neutrófilos son rápidamente reclutados a sitios de infección, donde cumplen con sus funciones antimicrobianas. Los hallazgos recientes sobre la supervivencia a largo plazo, la formación de trampa extracelular de neutrófilos (NET), la heterogeneidad y la plasticidad, las funciones supresoras y la lesión tisular han ampliado la comprensión de sus funciones en procesos infecciosos e inflamatorios (figura 13).

Los neutrófilos constituyen una parte esencial de la sistema inmune innato. Son el primer tipo de célula inmune que responde y llega al sitio de la infección a través de la quimiotaxis. Además del reclutamiento y la activación de otras células del sistema inmune, los neutrófilos desempeñan un papel clave en la defensa de primera línea contra los patógenos invasores. Los neutrófilos tienen tres métodos para atacar directamente microorganismos: la fagocitosis (ingestión), la liberación de agentes

antimicrobianos solubles (degranulación), y la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETosis).<sup>56,57,59</sup>

### Fagocitosis

Los neutrófilos son células fagocíticas, capaces de ingerir y digerir microorganismos o partículas por un proceso conocido como fagocitosis. Para poder reconocer a los objetivos, éstos deben ser recubiertos en opsoninas.

Los neutrófilos son fagocitos rápidos y potentes. Después de la unión de receptores opsónicos, tales como los receptores Fc $\gamma$ , las lectinas tipo C o los receptores del complemento, la membrana neutrofílica engulle partículas o un microorganismo, un proceso que está mediado por una compleja interacción de lípidos de membrana, cascadas de señalización intracelular y reordenamientos del citoesqueleto. Posteriormente, los gránulos primarios y secundarios se funden con el fagosoma y descargan su contenido antimicrobiano. La fagocitosis ocurre en cuestión de minutos y se ve reforzada por el sistema del complemento, los anticuerpos IgG y la pre-activación celular.<sup>16,26,56</sup>

### Degranulación

Los neutrófilos también liberan una variedad de proteínas en gránulos por un proceso llamado degranulación. Los contenidos de estos gránulos tienen propiedades antimicrobianas, y ayudan a combatir la infección.

Los péptidos antimicrobianos desempeñan una función importante en las barreras epiteliales y son secretados en varios fluidos corporales, como el sudor, el fluido de revestimiento alveolar, la leche o el moco intestinal. La mayoría de los péptidos en gránulos de neutrófilos humanos, como la proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad,  $\alpha$ -defensinas y catelicidinas, ejecutan sus efectos microbicidas interrumpiendo las membranas bacterianas. La lactoferrina y la lipocalina inhiben la captación microbiana de hierro, y la lisozima rompe los peptidoglicanos de la pared celular. Además de sus actividades antimicrobianas, las catelicidinas (o su producto de escisión procesado LL-37) y las  $\alpha$ -defensinas también pueden actuar como mediadores proinflamatorios y agonistas de receptores de quimicinas. Los péptidos

antimicrobianos, liberados por los neutrófilos, también se asocian a los NET, lo que facilita una estrecha interacción con NET-patógenos.<sup>56,57,58</sup>

### Trampas extracelulares de neutrófilos (NET)

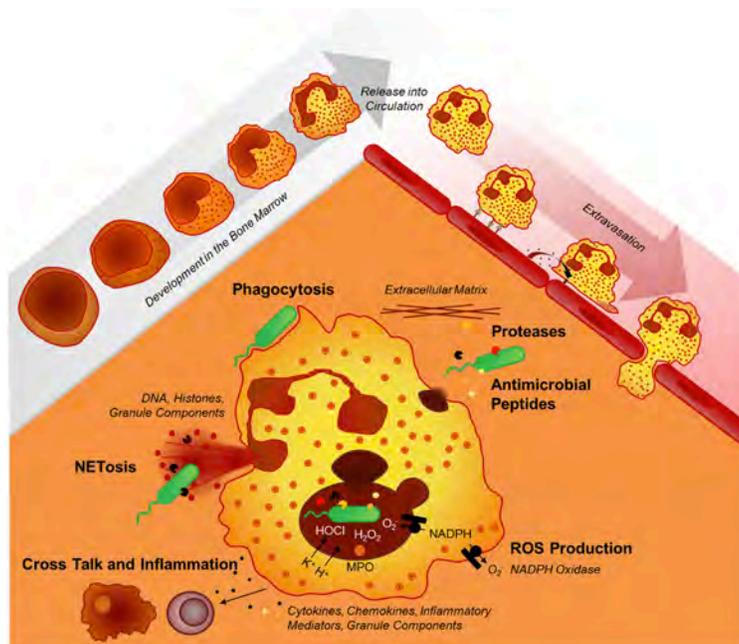
Las NET son trampas de ADN extracelulares compuestas principalmente por cromatina nuclear descondensada, histonas y proteínas de gránulos con actividad bactericida, donde se han identificado al menos 24 de ellas, provenientes de los gránulos, núcleo, citoplasma e incluso el citoesqueleto de los neutrófilos.<sup>60</sup> Algunas de las proteínas expresadas en las NET son catelicidina así como la citocina proinflamatoria IL-17, las cuales promueven la actividad fibrótica en tejidos infectados<sup>61</sup> e inducen la formación de más NET.<sup>62</sup> Microscópicamente se ha observado que los núcleos de neutrófilos IL-17+ muestran con frecuencia la morfología de las trampas extracelulares. Incluso, a través de alto aumento o inmunofluorescencia de dos colores, se ha revelado que IL-17 y MPO (mieloperoxidasa) se asocian con frecuencia a formaciones similares a NET (visualizadas con DAPI).<sup>63</sup>

El concepto de NETosis se introdujo en 2004 como un nuevo mecanismo de muerte celular distinto a la apoptosis o necrosis debido a que requiere hipercitrulinación de las histonas y degradación de las histonas por elastasa, la cual sinergia con la mieloperoxidasa (MPO) para llevar a la descondensación del ADN. La activación de la vía de la NADPH oxidasa desempeña un papel importante durante NETosis, sin embargo, se han reportado vías alternas, donde NADPH oxidasa no es necesaria para la formación de NET. Otros estudios apoyan la idea de que neutrófilos viables pueden formar NET, las cuales consisten en DNA mitocondrial o nuclear, de una manera rápida y conservando su viabilidad.<sup>64</sup>

La activación de los neutrófilos provoca la liberación de estructuras en forma de banda de ADN. Estas trampas comprenden una banda de fibras que atrapan y matan microbios extracelularmente. Se sugiere que las redes además de proporcionar una alta concentración de componentes antimicrobianos capaces de destruir a los microorganismos, éstas pueden servir como una barrera física que impide la propagación de agentes patógenos.<sup>56,58,63</sup>

Figura 13. Mecanismos efectores del neutrófilo.

Los mecanismos empleados por los neutrófilos para responder ante infecciones incluyen fagocitosis, la liberación de varios componentes de los gránulos en el espacio extracelular dentro del fagosoma (principalmente proteasas, oxidantes, péptidos antimicrobianos), y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos. Imagen tomada del artículo de Neutrófilos de Kruger P (2015, . doi:10.1371/journal.ppat.1004651)



### Serin proteasas, serpinas y supervivencia de neutrófilos

Entre el amplio rango de armamentos que llevan los neutrófilos en sus gránulos, se encuentran las serin-proteasas que destruyen directamente a los microorganismos e inactivan las toxinas bacterianas. El daño excesivo en los tejidos del huésped y la inflamación impulsada por la actividad no controlada de estas proteasas (elastasa, proteinasa-3 y catepsina G) se controlan con los inhibidores de la serina proteasa endógena ("serpinas"). Además de proteger el cuerpo de las actividades proteolíticas libres y dañinas, estudios recientes demuestran que las serpinas tienen un papel inesperadamente más amplio en la regulación de la supervivencia de los neutrófilos. Esta nueva función fue sugerida en ratones carentes del inhibidor intracelular Serpinb1a, donde se mostró una menor supervivencia de neutrófilos aunado a una neutropenia grave de la médula ósea, haciendo que estos ratones fueran más susceptibles a infecciones bacterianas y virales.<sup>56</sup>

### La movilización y el tráfico

Las quimiocinas orquestan el equilibrio entre la liberación de neutrófilos y su retención. Las células estromales de la médula ósea producen la quimiocina ligando CXCL-12 que se une al receptor de quimiocinas con motivos C-X-C (CXCR) 4, que conduce a la retención de neutrófilos, mientras que la liberación se encuentra mediada principalmente por CXCR2. La eliminación de neutrófilos apoptóticos por

macrófagos, un mecanismo donde se encuentran implicados los receptores X del hígado (LXR), es esencial para la homeostasis. La alteración en la eliminación de los neutrófilos apoptóticos se ha relacionado con enfermedades autoinmunes. Recientemente se ha encontrado que la médula ósea representa un sitio de eliminación de neutrófilos. Curiosamente, se encontró que el “*homing*” de neutrófilos senescentes de nuevo a la médula ósea podría regular la liberación circadiana de progenitores hematopoyéticos en la circulación. Otro tema de complejidad ha sido añadido por el concepto de la “migración reversa” de neutrófilos, desde los órganos periféricos de nuevo hacia el torrente sanguíneo.<sup>56</sup> La “transmigración inversa” observada por primera vez en las células endoteliales *in vitro* y en ratones *in vivo* ha sido definida como un nuevo mecanismo de resolución de la inflamación en modelos de pez cebra.<sup>65,66</sup>

### **Interacción neutrófilo-patógeno.**

Los neutrófilos utilizan la fagocitosis o la liberación de factores antimicrobianos contenidos en gránulos especializados. La interacción con el patógeno puede ser directa, a través del reconocimiento de PAMPs por parte de los receptores PRRs presentes en los neutrófilos; o indirecta, por medio del reconocimiento de microorganismos opsonizados a través de los receptores de inmunoglobulinas (FcR) o de complemento.

El fagosoma sufre un proceso de maduración muy rápido que conlleva la fusión con gránulos citoplasmáticos, liberándose péptidos antimicrobianos y generándose especies reactivas de oxígeno (ROS). La degranulación en la superficie de los neutrófilos y la NETosis crean un entorno antimicrobiano en el sitio de inflamación que contribuye a la destrucción de los patógenos extracelulares.<sup>56</sup>

### **Interacciones neutrófilos- células inmunes**

Los neutrófilos pueden interactuar con una gran variedad de células inmunes, tales como CD, macrófagos, células asesinas naturales (NK) y linfocitos T. Los neutrófilos mueren por apoptosis después de haber fagocitado algún microorganismo, como *Leishmania*, para ser fagocitados posteriormente por macrófagos o CD.<sup>26</sup> Las células

Th17 orquestan el reclutamiento de neutrófilos mediante la producción de IL-17 y CXCL8 (IL-8). Los neutrófilos, a su vez, reclutan células Th17 a través de la liberación de quimiocinas CCL20 y CCL2, resultando en una retroalimentación positiva entre neutrófilos y células Th17. Además, los neutrófilos interfieren con la proliferación de células T como células supresoras neutrofílicas mieloides (Myeloid-derived suppressor cells - MDSCs). Los neutrófilos secretan el factor "estimulador de linfocitos B " (BLyS) y un ligando inductor de proliferación (APR). Además distintos fenotipos de neutrófilos son capaces de inhibir la proliferación de células T y NK. Estas células neutrofílicas supresoras han sido llamadas células MDSC granulocíticas/neutrofílicas.

### **Los neutrófilos en la inflamación aguda**

Los neutrófilos son las primeras células reclutadas a los sitios de infección e inflamación. El reclutamiento y activación de neutrófilos son acontecimientos clave en condiciones inflamatorias agudas al representar un primer escudo celular contra microorganismos. La infiltración de neutrófilos no se limita a condiciones infecciosas sino también a ambientes estériles. Fisiológicamente, la inflamación neutrofílica aguda es seguida por una fase de resolución, importante para la homeostasis del tejido, de lo contrario se induce lesión tisular a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la liberación de proteasas conduciendo a una inflamación crónica.<sup>56,67</sup>

### **Los neutrófilos en enfermedades crónicas y lesiones de tejidos**

Varias enfermedades inflamatorias crónicas se caracterizan por una afluencia sostenida de neutrófilos. Quimiocinas, mediadores lipídicos, fragmentos de complemento y productos de degradación de tejido pueden desencadenar la migración de neutrófilos a los tejidos. Tras la activación local, sus productos tóxicos de liberación, como proteasas y oxidantes, causan lesión del tejido al ser una fuente importante de MMPs (MMP-9). En consecuencia, las acciones de los neutrófilos llevan a la escisión de la matriz extracelular (Extracellular matrix – ECM) en pequeños fragmentos ejecutada por los neutrófilos que estimulan a otras células del sistema inmune a generar una retroalimentación en la destrucción del tejido y la infiltración de

células inmunes. Otra proteína derivada de neutrófilos implicados en la inflamación y la remodelación tisular es la proteína-1 (HMGB1), una proteína de la cromatina liberada de neutrófilos necróticos.<sup>56,68</sup>

## **CÉLULAS T**

### **Generalidades**

Las células T o linfocitos T son los componentes principales del sistema inmunológico adaptativo. Son las únicas células del organismo capaces de reconocer y distinguir específicamente diferentes determinantes antigénicos, por lo que son las responsables de las dos características que definen al sistema inmune adaptativo: especificidad y memoria.<sup>69</sup>

Las células T son los responsables de coordinar la inmunidad celular constituyendo el 70% del total de los linfocitos segregando proteínas o citocinas. El número de leucocitos en sangre periférica en un humano promedio es de 4000 a 11000 por microlitro, del cual, normalmente, un 20 a 40% son linfocitos.<sup>70</sup>

### **Origen, Diferenciación y Maduración**

Las células T provienen de una célula progenitora hematopoyética. Se originan a partir de los precursores del hígado fetal y la médula ósea del adulto, desde donde colonizan el timo. La determinación del linaje de linfocitos T que se genera es influenciado por una serie de mensajes intracelulares, tanto en la médula ósea como en el timo. Esto lleva a la diferenciación de células con TCR que pueden ser del tipo CD4 ó CD8.

Los mecanismos por los que estos progenitores linfocíticos formados en la médula ósea se diferencian en células T maduras que residen en los tejidos linfáticos periféricos, se conoce como Maduración Linfocítica y ocurre en varias etapas: linfocito Pro-T, linfocito Pre-T, linfocito doble positivo (CD4+/CD8+) y linfocito T inmaduro (simple positivo – CD4+/CD8-ó CD4-/CD8+).<sup>69,70</sup>

## **Activación de células T**

Cuando las células T inmaduras reconocen un antígeno comienza su activación y la fase efectora de la respuesta inmune adaptativa mediada por estas células. El reconocimiento se da a través de fragmentos peptídicos derivados de antígenos proteicos que se presentan unidos a moléculas MHC.

Las células T vírgenes necesitan ser activadas por CD, mientras que las células T efectoras pueden ser activadas por una mayor variedad de células presentadoras de antígenos (CPAs) como Macrófagos y Linfocitos B.<sup>71</sup>

La activación de estas células puede ocurrir en el ganglio linfático o en tejidos periféricos. En el ganglio linfático, la activación conduce a la activación de células efectoras inmunes. En los tejidos periféricos, la activación conduce a la erradicación del microorganismo del foco infeccioso.<sup>72</sup>

Una de las primeras respuestas detectables de las células T a la presentación y reconocimiento antigénico por CPAs es la secreción de citocinas, en especial la interleucina-2 (IL-2), la cual actúa como factor de crecimiento sobre el mismo linfocito T que lo secreta, por tener ésta receptores para la IL-2. Bajo el efecto de la IL-2, la célula T sufre una proliferación numérica exponencial, denominada expansión clonal, la cual es el fundamento de la memoria inmunológica. La expansión clonal es seguida por una diferenciación celular, produciendo células T CD4+ (encargados de la activación de macrófagos, linfocitos B y otras células) y células T CD8+ (las cuales eliminan ciertas células diana infectadas y activan macrófagos en los tejidos afectados).<sup>73,74,75</sup>

## **Clasificación**

Se han descrito varios subtipos de células T, cada uno de ellos con una función distintiva.

- Células T Cooperadores (CD4+): Regulan y amplifican los diferentes componentes del sistema inmune, inician la cascada de la respuesta inmune coordinada mediante la interacción con un MHC de clase II. Se subdividen a su vez en linfocitos de subpoblación Th1 y Th2.

- Células T Citotóxicas (CD8+): Encargados de las funciones efectoras de la inmunidad celular, interactúan con moléculas MHC I.
- Células T de memoria. Esta población celular es la responsable de que la respuesta inmunitaria sea más eficiente y rápida tras exposiciones repetidas. Pueden presentar el marcador CD4+ o CD8+.<sup>76</sup>
- Células T Reguladoras (Treg): (CD4+ -CD4+CD25+ y CD4Tr1-; ó CD8+) Suprimen la respuesta inmunológica global ya que son los responsables de identificar si un antígeno es nocivo o no.<sup>77</sup>
- Células T Natural Killers (NKT): Corresponden a un linaje de linfocitos T que co-expresan marcadores de ambas células (CD1d, cadenas  $\alpha\beta$  del TCR y NK1). Dentro de sus funciones principales está destruir los antígenos ó las células que los portan.<sup>72</sup>

#### **Células T CD4**

Las células T CD4+ se dividen en Linfocitos T o Células T cooperadoras (T helper) y Linfocitos o células T Reguladoras (Tregs). Las células T cooperadoras (Th) controlan la respuesta inmune adaptativa contra patógenos y tienen la capacidad de activar células efectoras como células T Citotóxicas (CTLs CD8+), Linfocitos B y Macrófagos. Las células T CD4+ cooperadoras controlan prácticamente todas las respuestas inmunitarias frente a los antígenos proteicos. Son células efectoras de la inmunidad celular y suministran estímulos que son importantes para la proliferación y diferenciación de linfocitos B y LTC (Linfocitos T Citotóxicos).<sup>73,77</sup>

Dentro de las células T CD4+ existen tres subpoblaciones efectoras (Th1, Th2 y Th17) y una subpoblación reguladora (Tregs) con base en el patrón de citocinas que secretan y es importante recalcar que tienen un papel cooperador entre ellas.

Las Th1 son células importantes en la inmunidad celular, secretan IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\beta$  y estimulan a los macrófagos; las Th2 son importantes para la inmunidad humoral y secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13<sup>76,78</sup> y cooperan con los linfocitos B; mientras que las Th17 ejercen un papel proinflamatorio a partir de la producción de IL-17, IL-21 e IL-22.<sup>78,79,80</sup> Las funciones de las células T Reguladoras (Tregs - CD25, CTLA-4, GITR, LAG-3, CD-127 y Foxp3)) incluyen: prevención de enfermedades autoinmunes al mantener la tolerancia inmunológica, supresión de alergias y asma,

tolerancia materno-fetal y tolerancia oral, supresión de activación de Linfocitos T desencadenados por estímulos débiles así como protección de bacterias comensales para no ser eliminadas por el sistema inmune.<sup>81,82</sup>

### **Células Th17**

Las células Th17 son consideradas como un tercer miembro de las células T efectoras.<sup>22</sup> Producen IL-17 (IL-17A), IL-17F, IL-21 e IL-22, capaces de inducir una reacción tisular masiva a través de la amplia distribución de receptores de IL-17 e IL-22 en células hematopoyéticas y estromales.<sup>83</sup> Los factores involucrados en el desarrollo de células Th17 son: factores de diferenciación (TGF-beta junto con IL-6 o IL-21), factor de crecimiento y estabilización (IL-23, miembro de la familia de citocinas IL-12) y factores de transcripción (STAT3, ROR $\gamma$ t y ROR $\alpha$ ).<sup>21,22</sup> Por otro lado, IL-4 (que antagonizan la diferenciación de células Th1) e IL-25 (IL-17E) antagonizan el desarrollo de células Th17.<sup>22</sup>

Las células Th17 son células altamente proinflamatorias capaces de estimular la producción de citocinas como IL-6 y TNF, y quimiocinas como CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CXCL1 y CXCL6 a través monocitos, células endoteliales y células epiteliales.<sup>22,84</sup> Al ser altamente proinflamatorias han sido implicadas en diversas enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis<sup>22</sup> y enfermedad de Crohn.<sup>85</sup>

Las funciones inmunológicas atribuidas a los linfocitos Th17 pueden ser supresoras o protectoras. Estudios recientes han mostrado que las células Th17 desempeñan una función importante en la protección contra ciertos patógenos extracelulares e intracelulares como *Leishmania*.<sup>22</sup> Además se ha demostrado que las células Th17 son capaces de regular la formación de órganos linfoides terciarios, como los de la piel, durante inflamaciones crónicas mediadas por las citocinas IL-17 e IL-22.<sup>86</sup>

### **Interleucina-17 (IL-17)**

La familia de IL-17 regulan la respuesta inmune innata y adaptativa. La desregulación en su producción contribuye a diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes como artritis reumatoide, psoriasis y asma.<sup>87</sup> La familia de citocinas de IL-17 son

proteínas diméricas que se presentan en seis formas homodiméricas (designadas IL-17A, B, C, D, E y F) y en una forma heterodimérica (IL-17A/F). Se conocen 5 receptores para estas citocinas: IL-17RA, IL17-RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE. IL-17A, IL-17F e IL-17A/F requieren de un complejo de receptores que incluyan tanto al receptor IL-17RA como a IL-17RC. IL-17RA presenta mayor afinidad por IL-17A (la evidencia indica que IL-17RA es el receptor común para todas las citocinas de IL-17) mientras que IL-17RC muestra mayor afinidad por IL-17F.<sup>83,87</sup>

El receptor IL-17RA se encuentra ampliamente expresado en células hematopoyéticas y mesenquimales, mientras que IL-17RC está expresado principalmente en células no hematopoyéticas. Sin embargo, la excepción que muestran los macrófagos al expresar ambos receptores (IL17RA e IL-17RC) sugiere lo importante que puede ser la acción de la IL-17 sobre los numerosos tipos celulares sensibles a esta citocina.<sup>83</sup>

IL-17 es producida mayoritariamente por células T CD4 Th17, sin embargo también la producen células NK, NKT, células T CD8+, células T gama-deltas, células B, neutrófilos y monocitos.<sup>22,88,89,90</sup>

IL-17 promueve la inflamación, favorece la angiogénesis y desarrollo tumoral mediante efectos proangiogénicos, y adicionalmente esta citocina es un potente factor osteoclástico, induciendo destrucción ósea.<sup>85</sup>

### **Células Th17 y su interacción con otras células en Leishmaniasis**

Debido a la amplia expresión del receptor de IL-17 en una gran variedad de células, esta citocina es responsable de la activación de diferentes procesos inflamatorios. IL-17A, IL-17F e IL-17A/F requieren de un complejo de receptores que incluyan tanto al receptor IL-17RA como a IL-17RC.<sup>83,87</sup>

La respuesta inmune protectora contra *Leishmania* se encuentra vinculada fuertemente al desarrollo de una respuesta Th1 y a la producción de IFN-gamma, lo que resulta en la activación de macrófagos con sobrerregulación de iNOS (Óxido nítrico sintasa inducible) y producción de NO (óxido nítrico), dando muerte al parásito intracelular y controlando a la enfermedad.<sup>11</sup> Existe evidencia reciente que indica que la respuesta Th17 actúa de manera importante en sinergismo con la respuesta Th1 y

se ha demostrado que *Leishmania donovani* tiene la capacidad de estimular la diferenciación de linfocitos T CD4 hacia células Th17.<sup>84</sup>

Por otra parte, las células cebadas contribuyen al control de la infección cutánea causada por *L. major*, ya que estas células son capaces de inducir la maduración de CD mediante un incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras sobre las CD inmaduras. Dicha interacción conduce a la liberación de citocinas moduladoras de la respuesta linfocitaria (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 y TGF- $\beta$ ) y promueve la proliferación de células T productoras de altos niveles de IFN- $\gamma$  (Th1) e IL-17 (Th17) ante la infección por *Leishmania major*.<sup>91</sup>

Sin embargo, con toda la información derivada de los diferentes estudios sobre las células Th17 y leishmaniasis, existe aún mucha controversia respecto al papel funcional que juegan estas células frente a la infección por *Leishmania*, debido a que los resultados que han mostrado diferentes autores alrededor del mundo son variables y contradictorios dependiendo de la especie infectiva del parásito, el modelo utilizado ante dicha infección (o los pacientes evaluados) y la interacción celular que ocurre a diferentes niveles; desde la transmisión hasta el establecimiento de la enfermedad. Sin duda, estas células son claves en la evolución de la leishmaniasis, ya sea mediante el control o progresión de la misma.

## **CÉLULAS Th17 Y NEUTRÓFILOS EN LEISHMANIASIS**

La interacción entre células Th17 y neutrófilos ocurre de manera recíproca a través de sus mediadores inflamatorios, entre los que destacan la citocina IL-17. IL-17 aumenta la activación de la metaloproteinasa-3 de matriz (MMP-3) y otras proteasas e induce la producción de CXCL8 (IL-8) capaz de atraer a los neutrófilos al sitio de inflamación.<sup>92</sup> CXCL8 es una quimiocina atractante para neutrófilos y al ser inducida por las células Th17, éstas podrían ser responsables del fenómeno inflamatorio en la leishmaniasis al incrementar el reclutamiento de neutrófilos.<sup>93</sup>

Por otro lado, los neutrófilos pueden también inducir la migración de las células Th17 mediante la expresión de CCL2 y CCL20. Sin embargo, las células Th17 interaccionan con neutrófilos a través de una vía independiente de IL-17 y una vía dependiente de IL-17. Esta primera vía conduce a la migración de neutrófilos a sitios

de inflamación mediante la inducción de expresión de CXCL1 y CXCL2, que son quimioatrayentes de neutrófilos, mientras que la vía dependiente se basa en la producción de GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por parte de las células Th17, lo que lleva al reclutamiento y activación de neutrófilos.

A pesar que los neutrófilos son importantes en la resolución de varias infecciones, la afluencia constante de neutrófilos puede generar daño tisular por la liberación de mediadores proinflamatorios y enzimas, como metaloproteasas que agravan la evolución de la leishmaniasis. La función nociva de abundantes neutrófilos fue demostrado por Sacks y cols,<sup>55</sup> quienes encontraron que el neutrófilo sirve de célula hospedera temprana para el parásito, protegiéndolo de la acción lítica de complemento. A este fenómeno ejercido por neutrófilos se le ha nombrado “caballo de Troya” al facilitar la afluencia de neutrófilos. Así, las células Th17, a través de la producción de IL-17, estarían participando como facilitadoras para la infección por *Leishmania*.<sup>26</sup> Por otro lado, la presencia de IL-17 ha sido asociada a la progresión en leishmaniasis mucocutánea (LMC) causada por *L. braziliensis*.<sup>93</sup> En ratones BALB/c deficientes de IL-17, la función que se le ha atribuido a esta citocina es el de exacerbar la infección por *L. major*, ya que los ratones deficientes mostraron lesiones más pequeñas y con una carga parasitaria menor en comparación con la cepa silvestre.<sup>94</sup> Sin embargo, su función en la leishmaniasis es aún controversial ya que por una lado, niveles altos de IL-17 se encuentran asociados a la protección inmunológica contra *L. donovani* en Leishmaniasis Visceral (LV), demostrando que estas citocinas se encuentran asociadas a la resistencia contra esta especie de *Leishmania*.<sup>84</sup>

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Leishmaniasis constituye una de las ocho enfermedades tropicales de mayor importancia para la OMS. Con más de 12 millones de personas infectadas alrededor del mundo y amenazando a 350 millones más que habitan en alguno de los 88 países donde prevalece la enfermedad, la Leishmaniasis es considerada una enfermedad emergente e incontrolable. En México, 17 de las 32 entidades federativas que conforman al país se ven afectadas por esta patología afectando con mayor magnitud a los estados del sureste.

La importancia de esta enfermedad se basa no solo en el incremento anual de personas infectadas por alguna de las 20 especies conocidas de *Leishmania* sino además en las repercusiones socioeconómicas, psicológicas y de salud que presenta al ser una enfermedad debilitante, deformante e incluso mortal, así como por el hecho de no existir tratamiento que erradique la infección debido a las diversas problemáticas a las que se enfrenta el sistema inmune frente a la infección por *Leishmania*. El parásito emplea diversos mecanismos propios así como del vector que lo transmite y del hospedero humano para evadir la respuesta inmune y disminuir o bloquear la capacidad leishmanicida por parte de los macrófagos, los cuales son muy importantes en la iniciación de la infección y la activación de una cascada de respuestas inmunes, tanto de tipo innata, donde predominan los neutrófilos (los cuales desempeñan una función importante en la inflamación generada) y de tipo adaptativa, entre los que predomina la diferenciación de las células T CD4+ hacia una respuesta Th1 o Th2 encargadas del control o del agravamiento de la enfermedad, respectivamente. En los últimos años se ha reportado una respuesta tipo Th17 en leishmaniasis. Específicamente para leishmaniasis visceral (LV), la respuesta Th17 se ha asociado con la protección contra *Leishmania donovani*. En contraste, en LMC causada por *Leishmania braziliensis*, ha atribuido un papel agravante a las células Th17 debido a la inflamación crónica inducida a través del constante flujo de neutrófilos hacia los tejidos infectados, agravando con esto el desarrollo de la enfermedad.

## **JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA**

La leishmaniasis al ser una enfermedad tropical de gran importancia para la OMS afecta en su mayoría a países en vías de desarrollo, lo que dificulta aún más su diagnóstico y tratamiento, volviéndola incontrolable en ciertas regiones endémicas.

El problema en el tratamiento de la leishmaniasis radica inicialmente en la dificultad para su diagnóstico por parte de algunos médicos, y aún cuando ésta es diagnosticada correctamente, la quimioterapia empleada en su tratamiento tiene un alto costo y tienden a presentar una toxicidad importante. Entre los factores que dificultan el control de la leishmaniasis figuran la falta de conocimiento de la patogénesis del parásito, así como la complejidad de la respuesta inmune que es necesaria para la protección contra el parásito. Esto hace necesario profundizar en conocimientos sobre mecanismos inmunes protectores durante la fase aguda y crónica contra la leishmaniasis cutánea causada por *L. mexicana*, la especie prevalente en México.

Dado que los neutrófilos representan la primera línea de defensa frente a este patógeno intracelular y la respuesta linfocitaria, mediada por células T CD4+ Th1 o Th17 determinan la evolución de la enfermedad, es crucial estudiar ambos tipos celulares durante la evolución de la leishmaniasis, tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad. En específico, aún se desconoce el papel de las células Th17 y su asociación con los neutrófilos en leishmaniasis causada por *Leishmania mexicana*. Estas células podrían estar jugando un papel importante en la generación de daño tisular por la inflamación exacerbada inducida por una sobreproducción de IL-17, tanto por las células Th17 como por los neutrófilos, lo cual pudiera favoreciendo una inflamación sostenida y crónica.

Por este hecho, la relevancia de esta investigación radica en el esclarecimiento del papel que juegan los neutrófilos y las células Th17 en la leishmaniasis cutánea causada por *L. mexicana* y así ampliar el conocimiento de la patogenia de esta enfermedad.

## **HIPÓTESIS**

La inflamación exacerbada inducida por neutrófilos y células Th17 en etapas tempranas y crónicas de la infección es un factor predisponente en la progresión de leishmaniasis cutánea causada por *L. mexicana*, donde la susceptibilidad del hospedero es crucial para el control ó diseminación y agravamiento de la enfermedad.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

Analizar el fenómeno de inflamación temprana y crónica relacionada a la presencia de neutrófilos y células Th17 en modelos murinos infectados experimentalmente con *Leishmania mexicana*.

### **Objetivos Específicos:**

- Evaluar el desarrollo de la lesión en ratones susceptibles (BALB/c) y semi-resistentes (C57BL/6) infectados con *Leishmania mexicana* en las semanas 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12.
- Analizar cuantitativamente la presencia de neutrófilos y células Th17 en lesiones cutáneas de ratones susceptibles (BALB/c) y semi-resistentes (C57BL/6) infectados con *Leishmania mexicana*.
- Determinar el grado de asociación que presentan los neutrófilos y células Th17 en ratones infectados BALB/c y C57BL/6 desde la etapa temprana hasta la fase crónica de la infección.
- Analizar la presencia de neutrófilos, células Th17 e IL17 en lesiones cutáneas de modelos BALB/C y C57BL/6, infectados con *L. mexicana*.
- Caracterizar la presencia de NETs en las lesiones crónicas de ratones infectados BALB/c y C57BL/6.
- Cuantificar los niveles de IL-17 en suero de ratones BALB/C y C57BL/6 infectados con *Leishmania mexicana*.

## **METODOLOGÍA**

### **MODELOS Y MUESTRAS DE ESTUDIO**

Las cepas de ratones utilizados en este estudio fueron BALB/c y C57BL/6. Los ratones fueron criados y alojados en el bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM dentro del Hospital General de México, siguiendo las Directrices Nacionales de Ética para la Salud Animal NOM-062-ZOO-199 y los lineamientos recomendados para el cuidado de los animales por El Comité Ético de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Se utilizaron 264 ratones hembras de 6 a 8 semanas (132 BALB/c como la cepa "susceptible" y 132 C57BL/6 como la cepa "semi-resistente") divididas en 4 grupos para cada cepa de ratón (3 grupos control no infectados y 1 grupo infectado), Cada grupo constaba de tres ratones:

1. UT- Grupo no tratado o grupo basal,
2. NI - Grupo con lesión por aguja,
3. SS- Ratones inoculados con solución salina (como vehículo del parásito),
4. LM - Ratones infectados con *Leishmania mexicana*.

### **INFECCIÓN**

#### **Infecciones *in vivo***

La infección se realizó mediante inoculación intradérmica de  $1 \times 10^5$  promastigotes de *Leishmania mexicana* (concentrados en 5  $\mu$ l de solución salina como vehículo del parásito) en los dos lóbulos de las orejas de ratones anestesiados por inhalación con sevoflurano.

Pasado el tiempo de evaluación respectiva, los ratones fueron anestesiados por inhalación con sevoflurano y sacrificados por dislocación cervical en diferentes tiempos post- infección (días 0, 1, 4, 5, 7, 14, 28 y 90).

## **Desarrollo de la lesión**

Se monitoreó el desarrollo de la lesión en ratones BALB/c y C57BL/6 en las semanas 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 de la infección. Se incluyeron ratones adicionales exclusivamente para el análisis detallado del crecimiento de la lesión. La lesión se evaluó usando un Vernier digital. \* Cada día evaluado constó de una “n” de 5 ratones.

## **OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

**Suero:** Los ratones fueron sangrados por punción cardiaca inmediatamente después de ser sacrificados para la obtención de la sangre y posteriormente el suero. La sangre obtenida se dejó coagular durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 4000 rpm/10 minutos (x2). El suero fue almacenado en tubos para microcentrífuga de 1 ml a -20°C.

**Bazo:** Para su disección y obtención se giró al animal para exponer su flanco izquierdo y realizar una incisión con unas tijeras de 2-3 cm al peritoneo para posteriormente localizar y extraer el bazo con unas pinzas cortando el tejido conectivo y colocar el bazo en un tubo de 15 ml con 3 ml de PBS estéril frío para su posterior disgregación o fijación.

**Orejas de ratón:** Se tomaron las dos orejas de cada ratón desde la base. Todas las orejas fueron cortadas y tratadas con crema depiladora (Nair), para la eliminación del pelo y lavadas previo a su fijación e inclusión para el procesamiento de las muestras por IHQ o disgregadas con colagenasa inmediatamente después del sacrificio del animal para el análisis por citometría de flujo.

## **FIJACIÓN E INCLUSIÓN DE TEJIDOS PARA IHQ**

La mitad de los ratones totales se utilizaron para el análisis inmunohistoquímico. Las orejas fueron cortadas y algunos tejidos se fijaron en formaldehído al 10% y se embebieron en parafina y otros se incluyeron en el compuesto OCT (Tissue-Tek® SAKURA, Cat. 4538) y se congelaron a -70°C para realizar el protocolo de IHC para parafina y muestras congeladas, así como la tinción de H/E.

## **DISGREGACIÓN DE TEJIDOS**

### **Disgregación de células de bazo**

Se colocó el órgano en una malla de 100 micrómetros y se maceró suavemente con un émbolo estéril agregando PBS estéril frío para dejar caer las células a la caja de petri y recuperarlas en un tubo de 15 ml. Posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm/ 10 minutos/ 4°C , se agregó de Solución Lítica (SL) y se colocó el tubo en hielo durante 10 minutos. Se detuvo la reacción de la SL con PBS, se centrifugaron y fueron incubadas en medio RPMI-1640 SFB 10% para su posterior conteo. Se utilizaron  $1 \times 10^6$  células por pozo por triplicado por condición: a) estimuladas con PMA/ionomicina durante 24 horas, b) sin estimular durante 24 horas y c) estimuladas con PMA/ionomicina durante 4.5 horas.

Las células se fijaron y procesaron de acuerdo a la técnica de análisis con las que fueron evaluadas (inmunocitoquímica, citometría de flujo o estimulación *in vitro*).

### **Disgregación de células de oreja**

Para llevar a cabo el aislamiento de las células de oreja, éstas fueron cortadas y tratadas con crema depiladora, para la eliminación del pelo de la oreja lavadas y suspendidas en PBS suplementado con antibióticos al 4% (penicilina estreptomina, Gibco, cat. 15070-063) durante 10 minutos. Posteriormente, se separaron las capas dorsal y ventral de la piel de los lóbulos de las orejas y se incubaron en medio RPMI-1640 (Gibco, cat. 21875158) con SFB al 10% (Fetal Bovine Serum - Gibco, cat. 10082139) que contenía 0,01% de colagenasa (SIGMA-ALDRICH, Cat. C5138-1G) y suplementado adicionalmente con SFB al 10% en baño María a 36°C durante 90 minutos. La solución se pasó a través de una malla de 100  $\mu$ m (BD Biosciences, Cat. 352360) y el tejido restante se maceró con émbolos de jeringas desechables estériles. La suspensión celular se lavó 4 veces con PBS frío y se centrifugó a 805 x g (2000 rpm) para posteriormente ser cuantificadas en la cámara de Neubauer.

## **CITOMETRÍA DE FLUJO**

La cuantificación celular de neutrófilos y células Th17 en lesiones se realizó mediante citometría de flujo. Posterior a la disgregación de tejido de oreja se usaron los siguientes anticuerpos para detectar las moléculas de superficie e intracelulares: anti-CD3 conjugado con PE (Rat anti mouse, Biolegend, cat. 100206), anti-CD4 conjugado con FITC (Rat anti mouse, Biolegend, cat. 100006) y anti-IL-17 conjugado con APC (Rat anti mouse, Biolegend, cat. 506916) para el panel de células Th17. Los anticuerpos para detectar a los neutrófilos fueron anti-NIMP-R14 (Rat anti mouse, Abcam, cat. ab2557) como anticuerpo primario y FITC anti-IgG de rata (eBioscience, cat. 11-4811) como anticuerpo secundario. Se usaron anticuerpos IgG apropiadamente conjugados como controles de isotipo y los eventos positivos fueron seleccionados y ajustados de acuerdo a los controles FMO (Fluorescence Minus One).

Para la tinción intracelular, se resuspendieron las células de oreja ( $1 \times 10^6$ ) en medio RPMI-1640 adicionado con SFB al 10% y se incubaron con Golgi Plug (BD Biosciences, Cat N° 555029) durante 2 horas a temperatura ambiente antes de la tinción extracelular contra antígenos superficiales CD3 / CD4 y NIMP-R14. A continuación, las células se fijaron y se permeabilizaron usando la solución Cytfix/Cytoperm (BD Biosciences, cat. No 554722) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las células se lavaron con buffer Perm/Wash (DB Biosciences, cat No. 554723) y se tiñeron con anticuerpos dirigidos contra la citocina intracelular IL-17A/F.

## **INMUNOHISTOQUÍMICA**

### **Tejidos murinos empleados como controles**

Los tejidos utilizados como controles positivos para el anticuerpo IL-17 fueron bazo y pulmón de ratón infectado con *M. tuberculosis*, pulmón de ratón infectado con *Histoplasma capsulatum* y para los anticuerpos CD3, CD4 y NIMP-R14 se utilizó cojinete de ratón con infección crónica por *L. mexicana*, para establecer las condiciones experimentales óptimas.

## **Muestras experimentales**

La mitad de las muestras fueron procesadas mediante inmunohistoquímica a través de dos técnicas:

1. Inmunohistoquímica por Técnica de Peroxidasa para identificar células Th17 (CD3, CD4 e IL-17) y neutrófilos (NIMP-R14) en los cortes de tejido.
2. Inmunohistoquímica por Fluorescencia (Inmunofluorescencia) para la detección de estructuras histológicas similares a NET dentro de los tejidos infectados. Se utilizaron anticuerpos dirigidos contra catelicidina (LL-37), IL-17 y DNA (se utilizó DAPI).

## **Inmunohistoquímica en tejidos parafinados (CD3, CD4, IL-17) y congelados (NIMP-R14)**

Se cortaron secciones de tejido de 5 µm y se montaron en portaobjetos de vidrio silanizado. Se desparafinaron y rehidrataron los tejidos en el caso de muestras incluidas en bloques de parafina mientras que en muestras congeladas, el tejido fue fijado con acetona fría. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (J.T.Baker) al 3% diluido en metanol. El bloqueo de la unión inespecífica se realizó con BSA al 1% (SIGMA). La inmunodetección de CD4 (Santa Cruz, cat. Sc13573), IL-17 (Abcam, cat. Ab79056) y neutrófilos [NIMP-R14] (Abcam, cat. Ab2557) se realizó mediante técnica de tinción con peroxidasa. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron biotina anti-rata anti-IgG para CD4 y NIMP-R14 y biotina cabra anti-conejo anti-IgG (Zymed, cat. 62-1840) para la detección de IL-17. Posteriormente los anticuerpos secundarios fueron detectados con el conjugado de HRP-estreptavidina (Invitrogen, cat 434323) y revelados con DAB (Dako, cat. K3468). Posteriormente las muestras fueron contrateñidos con hematoxilina de Harris con una inmersión final en una solución de agua de amoniacal al 0,2% para virar el pH y obtener un mejor contraste de la tinción. Finalmente los tejidos fueron deshidratados y montados con resina.

## **Inmunofluorescencia**

La posible presencia de NET se analizó por inmunofluorescencia utilizando anti-cathelicidina (anticuerpo LL-37 (H-40): sc-50423, Santa Cruz, USA) con un anticuerpo

secundario marcado en TRITC; APC anti-IL-17 (APC Rata anti-Ratón, Biolegend, Cat. No.506916) y la tinción nuclear se realizó con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (SIGMA, Fluoroshield con DAPI, cat. F6057- 20ML). La fusión de los tres marcadores se analizó mediante microscopía confocal.

DAPI (diamidino-2-fenilindol) es una sonda azul fluorescente que muestra una fluorescencia brillante tras unirse selectivamente al surco menor del ADN bicatenario. Su capacidad de selección del ADN y gran permeabilidad celular permiten una tinción eficaz de los núcleos con poco fondo del citoplasma. DAPI es una contratinción nuclear clásica para microscopía de inmunofluorescencia, así como un importante componente para los métodos de detección de alto contenido que requieren cuantificación basada en células del contenido de ADN.

## **ELISA**

La cuantificación de la citocina IL-17 en suero de los ratones fue evaluada a través de ELISA, utilizando un kit específicos contra esta citocina (Mouse IL-17AF (heterodimer) ELISA Ready-SET-Go! (2nd Generation) (Cat.88-8711). El rango de curva estándar es de 16 - 2000 pg/mL.

Las placas de ELISA Corning Costar 9018 fueron incubadas durante la noche a 4 °C con el anticuerpo de captura diluido en el “Coating buffer” del kit. Los pozos fueron bloqueados con el Assay Diluent 1x a temperatura ambiente durante 1 hora. Los estándares fueron diluidos (como se indica en el “C de A” del kit) para preparar la concentración máxima del estándar y se realizaron dos diluciones seriales de los estándares más altos para hacer la curva estándar. Posteriormente se incubó el anticuerpo de detección durante 1 hora, seguido de la incubación con Avidin-HRP durante 30 minutos. Se agregó la solución del sustrato (Substrate Solution) a cada pozo a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añadió Stop Solution a cada pozo. La placa fue leída a 450 nm.

## **PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS:**

### **Análisis de datos**

El análisis estadístico y gráficas se realizaron utilizando el software Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.) empleando Medidas de Tendencia

Central (Media) y medidas de dispersión (Desviación Estándar y Rango) en cada uno de los grupos.

Cada grupo constó de tres ratones:

1. UT- Grupo no tratado o grupo basal,
2. NI - Grupo con lesión por aguja,
3. SS- Ratones inoculados con solución salina (como vehículo del parásito),
4. LM - Ratones infectados con *Leishmania mexicana*.

## **Variables**

### Independientes

- Ratones
  - Cepa susceptible (BALB/c)
  - Cepa semi-resistente (C57BL/6)
- Tiempo de infección
  - Fase temprana (día 1, 4, 5, 7).
  - Fase tardía (día 14, 21, 28, 90).

### Dependientes

- Presencia de neutrófilos.
- Presencia de linfocitos CD4+ Th17.
- Niveles de la citocina IL-17.
- Formación de NET.

## **PRUEBAS ESTADÍSTICAS**

Las pruebas estadísticas realizadas para el análisis de resultados fueron las siguientes:

### **ANOVA**

El análisis de varianza (ANOVA) es una prueba estadística que se usa para determinar las diferencias entre las medias de tres o más grupos.

Para evaluar comparativamente el desarrollo de la lesión entre ratones BALB/c y C57BL/6, se realizó ANOVA de una vía comparando el grosor de los lóbulos de la

oreja (milímetros) de ambas cepas infectadas (5 ratones por grupo por semana, por lo que algunos ratones fueron agregados en este análisis) en diferentes puntos temporales (1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 semanas post-infección). Este estudio se combinó con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Para evaluar la cinética de células Th17 y neutrófilos durante la infección de *Leishmania mexicana* se utilizó la prueba ANOVA para encontrar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles y el grupo experimental. Se cuantificó el número total de células Th17 (CD3+/CD4+/IL-17+) y neutrófilos (NIMP-R14+) y se obtuvieron los porcentajes. Los promedios de los diferentes grupos de células se representaron en los gráficos después de que los valores se normalizaron a 1 (de acuerdo a los valores obtenidos del grupo control UT), con el fin de mostrar el incremento de veces en el número de células de cada grupo experimental en diferentes tiempos (0, 1, 4, 5, 7, 14, 28 y 90 días post-infección). Posteriormente se realizó la prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Tukey para encontrar en que grupo y día se encuentran específicamente estas diferencias y conocer cuáles son los datos más representativos.

Para todos los gráficos, los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes y los valores de P de  $\leq 0,05$  se consideraron significativos (\*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ , \*\* y \*  $P \leq 0,05$ ).

### **Análisis de correlación**

La correlación de Pearson es una prueba paramétrica que calcula el grado en el que dos variables se encuentran relacionadas, sin que exista una asociación causa-efecto, la cual está representada por el coeficiente de correlación “r”.

El grado de relación lineal entre células Th17 y neutrófilos por cepa de ratón se estableció mediante este análisis. La correlación se realizó mediante la comparación de los promedios de células Th17 y neutrófilos en los grupos infectados a lo largo de la infección en cada cepa de ratón. Por último, el test de Bonferroni se realizó para establecer diferencias estadísticas entre ambas cepas (BALB/c versus C57BL/6) comparando los valores de cada tipo de célula (células Th17 y neutrófilos) de los grupos infectados de cada cepa en su respectivo día de evaluación.

## **ANÁLISIS Y OBTENCIÓN DE IMÁGENES**

Las imágenes digitales de tejidos se analizaron usando microscopio de luz y una cámara AxioCam MRc5 de color (Zeiss, Alemania). La distribución de los marcadores en los tejidos de los lóbulos de las orejas se analizó por triplicado usando un aumento de 40X.

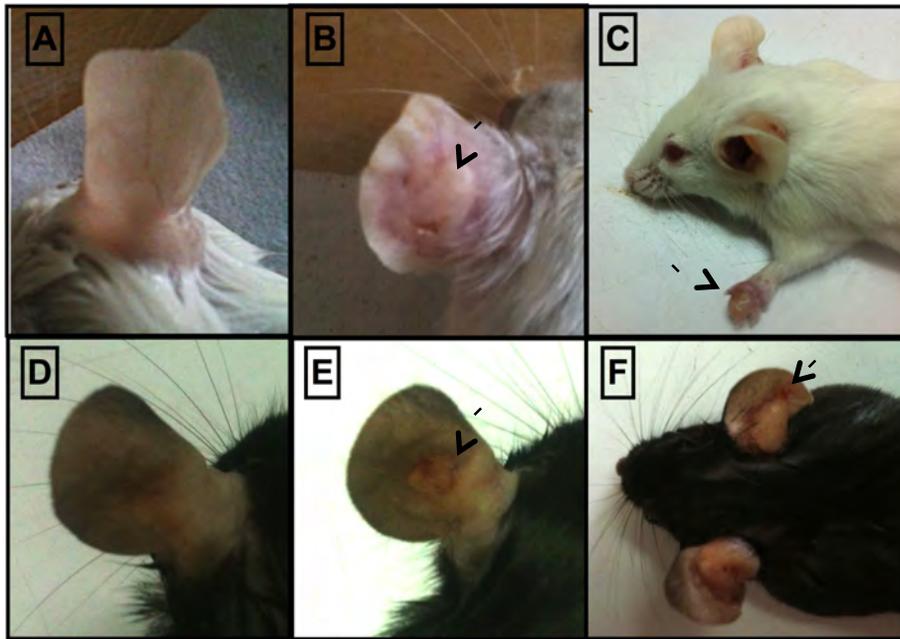
Los tejidos procesados por inmunofluorescencia fueron analizados mediante microscopía confocal (Leica TCS SP5) y las imágenes de los tejidos fueron capturadas y analizadas con una ampliación de 63X.

## **RESULTADOS**

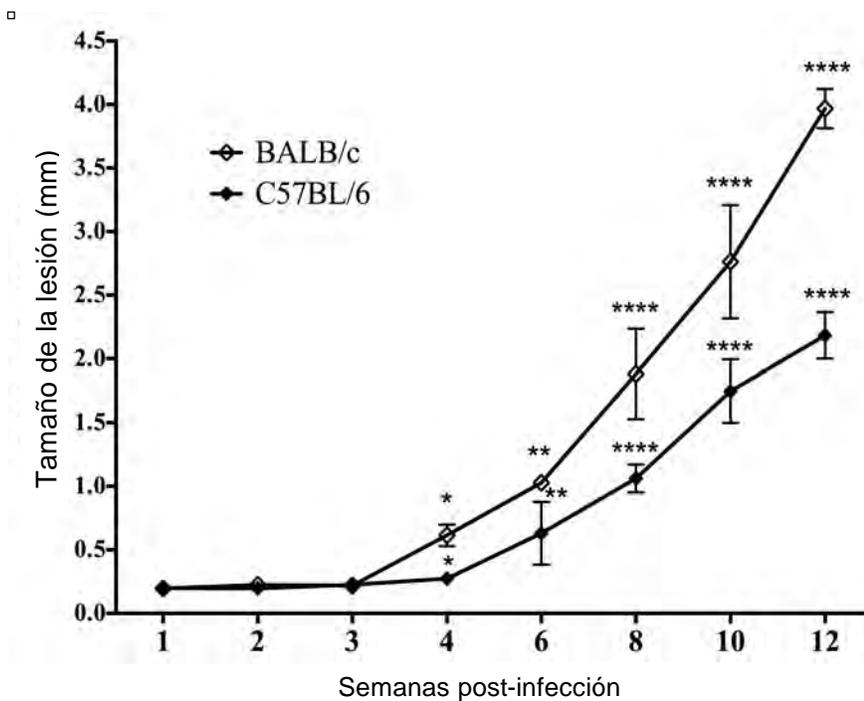
### **Infección *in vivo* y desarrollo de la lesión**

Los ratones fueron infectados con  $1 \times 10^5$  promastigotes metacíclicos de *Leishmania mexicana* en la dermis de las orejas, lográndose la reproducción del modelo de infección de oreja en ambas cepas de ratones

Se observó la formación de la lesión causada por *L.mexicana* en ambas cepas de ratones cuyo nódulo inicial evolucionó en tamaño, volviéndose un nódulo grande con bordes eritematosos y en algunos casos, pequeñas zonas iniciales de ulceración (figura 14). Las lesiones fueron clínicamente visibles como un pequeño nódulo que difirió significativamente entre los dos modelos de ratón después de cuatro semanas después de la infección, volviéndose significativamente mayor en la cepa susceptible BALB/c, en comparación con los ratones semi-resistentes C57BL/6 (figura 15). Los experimentos se interrumpieron por razones éticas una vez que se produjo ulceración o se demostró diseminación de lesiones en otras regiones del animal (se observa que la diseminación sólo se observó en 3 de 6 ratones BALB/c).



□ Figura 14. Desarrollo de lesión en lóbulo de oreja de ratones BALB/c y C57BL/6 en diferentes días de evolución de la infección por *L. mexicana*. Las lesiones se señalan con flechas negras. Las imágenes A y D muestran orejas de ratones sin tratamiento (día 0), las imágenes B y E corresponden al día 21 y C y F muestran la lesión formada al día 90.



□ Figura. 15 . Desarrollo de la lesión de la oreja en ratones BALB/c y C57BL/6. El grosor de la lesión del lóbulo de la oreja se evaluó midiendo (en milímetros) la inflamación de los lóbulos de la oreja infectados a lo largo de 12 semanas de infección. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de 5 ratones y los valores de P de  $\leq 0,05$  se consideraron significativos (\*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ , \*\* y \*  $P \leq 0,05$ )

## CITOMETRÍA DE FLUJO

### Estandarización de poblaciones celulares.

Del total de eventos adquiridos en el citómetro (FACS Canto II BD/DIVA) se regionaliza la zona de linfocitos y neutrófilos. La tinción celular se analizó utilizando un sistema FACS Canto II BD y el análisis de los datos se realizó utilizando software FACSDiva (Becton Dickinson).

### Th17

Del total de eventos adquiridos se obtiene una gráfica de puntos donde se coloca el FSC (tamaño) en el eje X y Y mostrando el área/ancho (FSC-A) por la altura (FSC-H) para delimitar una región (P1) con la intención de descartar dupletes, células muertas y debris (figura 16 A).

De esta región, se obtiene otra gráfica de puntos donde se compara el tamaño contra la complejidad y de esa manera delimitemos la región correspondiente a la zona de linfocitos (figura 16 B). De esta gráfica tomamos las células PE-CD3 + (figura 16 C), delimitamos la región y de esta región obtenemos las células FITC-CD4+ Y APC-IL17+ (figura 16 D) y así determinamos la región de las células Th17 en oreja.

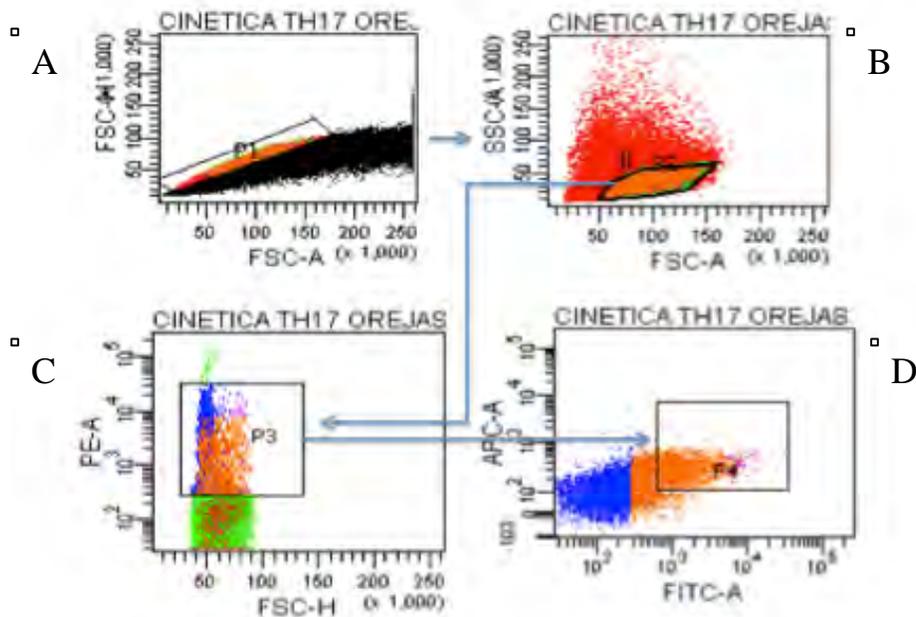


Figura 16. Obtención de la población de células Th17.

## Neutrófilos

Finalmente para la identificación de neutrófilos, tanto en oreja como en ganglio:

Volvemos a graficar el tamaño de la células (FSC), área por altura para eliminar dupletes (figura 17A) y del total de éstas células, seleccionamos la región donde podríamos tener a los neutrófilos (figura 17B) y finalmente seleccionamos las células FITC-NIMP-R14+ (figura 17D).

El histograma de la izquierda nos muestra células provenientes de un tubo sin teñir (figura 17C) y el de la derecha un pequeño pico que nos muestra las células positivas, o sea, los neutrófilos (17D).

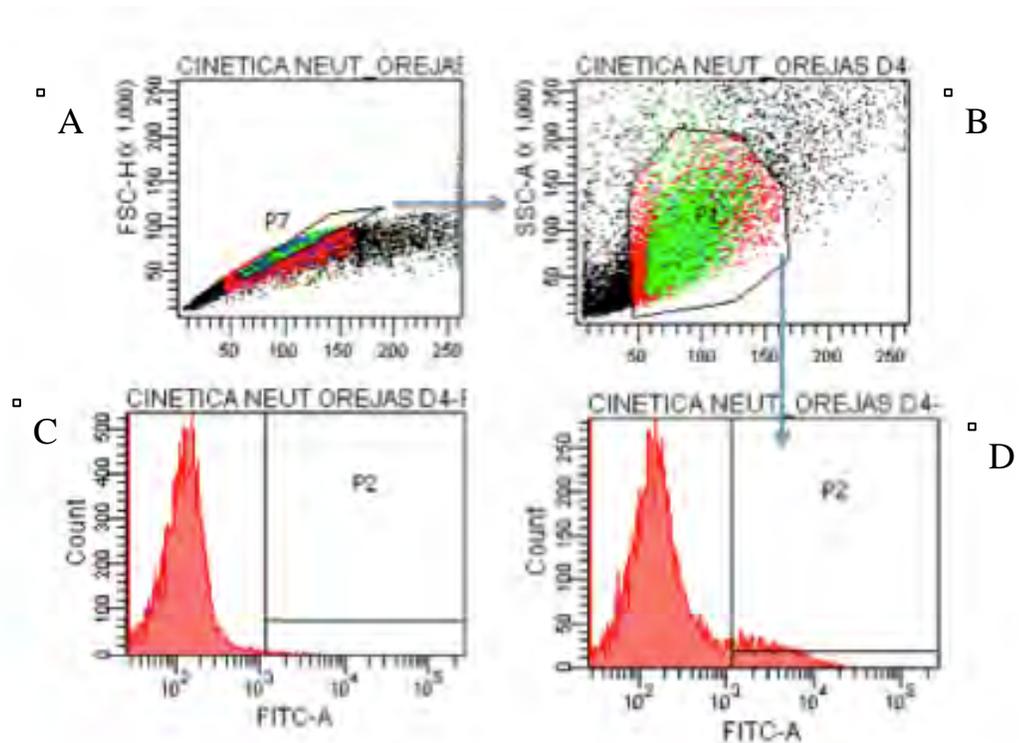


Figura 17. Obtención de la población de neutrófilos por citometría de flujo

## ***Leishmania mexicana* induce y mantiene la diferenciación de células Th17 en el tejido infectado.**

Se observó un aumento gradual y continuo en el número de células Th17 en las lesiones de ambas cepas de ratones infectados con *Leishmania mexicana*, aunque su número fue diferente entre ambas cepas. En ratones BALB/c, las células Th17 comenzaron a aumentar significativamente a partir del día 4 (4 veces), en el día 28

alcanzaron un aumento de 18 veces, y en el día 90 mostraron un incremento de 31 veces, en comparación con el grupo No tratado (UT) (figura 18). En ratones C57BL/6, se observó una tendencia similar. Las células Th17 mostraron un aumento inicial a partir del día 5 (2 veces), alcanzando un incremento de 10.97 veces el día 28 y un aumento de 12 veces para el día 90 post-infección. Sin embargo, cabe destacar que el incremento de células Th17 en todos los grupos C57BL/6 fue menor que en los ratones BALB/c.

En resumen, estos datos muestran que los ratones BALB/c desarrollan una intensa respuesta inflamatoria que comienza poco después de la infección con *Leishmania mexicana*, que se caracteriza por un aumento constante de células Th17 a lo largo de la enfermedad hasta la fase crónica. La intensidad de la respuesta Th17 contrasta con la observada en ratones C57BL/6, donde el número de células Th17 permaneció similar en las lesiones a lo largo del primer y tercer mes (días 28 y 90 post-infección). La diferencia entre las cepas de ratón fue significativa para las células Th17 en el día 28, así como en el día 90 post- infección (figura 18).

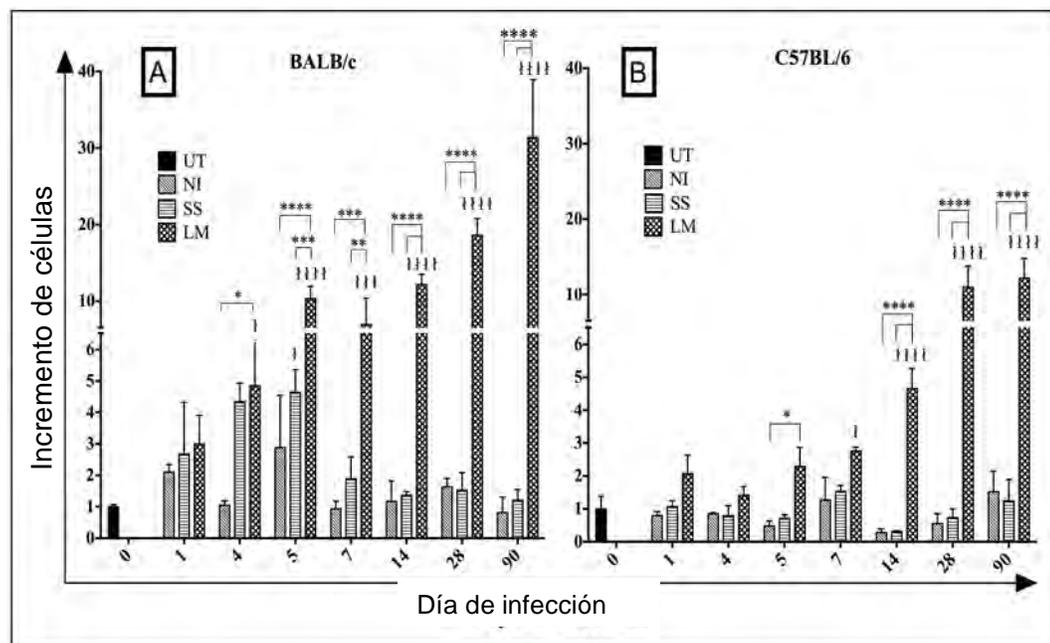


Figura 18. Células Th17 en piel de lóbulo de orejas de ratones BALB/c y C57BL/6. Cinética de las células Th17 (CD3+/ CD4+/ IL-17+) en lóbulos de las orejas de ratones BALB/c (A) y C57BL/6 (B) infectados con  $1 \times 10^5$  parásitos de *L. mexicana* (LM). Los controles consistieron en lesión por aguja (NI), solución salina (SS) y ratones no tratados (UT). Las barras muestran valores normalizados en comparación con los controles no tratados (UT). Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de un triplicado y los valores de P de  $\leq 0,05$  se consideraron significativos (\*\*\*\* P  $\leq 0,0001$ , \*\*\* P  $\leq 0,001$ , \*\* y \* P  $\leq 0,05$ ). †, ‡, § P  $\leq 0,05$  representan los significances estadísticos de los grupos NI, SS y LM en comparación con el grupo UT.

**Los neutrófilos infiltran los tejidos infectados por *L. mexicana* y continúa su reclutamiento en ellos durante la fase tardía de la infección, donde se encontraron niveles más elevados en la cepa susceptible BALB/c.**

A lo largo de la infección, los neutrófilos aumentaron de manera constante en los tejidos infectados. Se observó un incremento significativo en ratones C57BL/6 infectados a partir del primer día post-infección (hubo un incremento de 2 veces en comparación con el grupo control UT). En ratones BALB/c, el incremento observado en el primer día post-infección no fue significativo en comparación con el grupo control UT. Sin embargo, a medida que la infección progresaba, y especialmente en la fase tardía, el número de neutrófilos aumentó en ambas cepas, aunque éste fue más pronunciado en los ratones BALB/c, en comparación con los C57BL/6 (figura 19 A y B). En los días 28 y 90 post-infección, el número de neutrófilos fueron mayor en la cepa BALB/c en comparación con los C57BL/6, donde el incremento de veces en BALB/c en el día 28 fue de 4 veces y en el día 90 había incrementado 10 veces. Por el contrario, los ratones C57BL/6 mostraron un aumento de 4 veces el día 28, que ascendió y presentó un

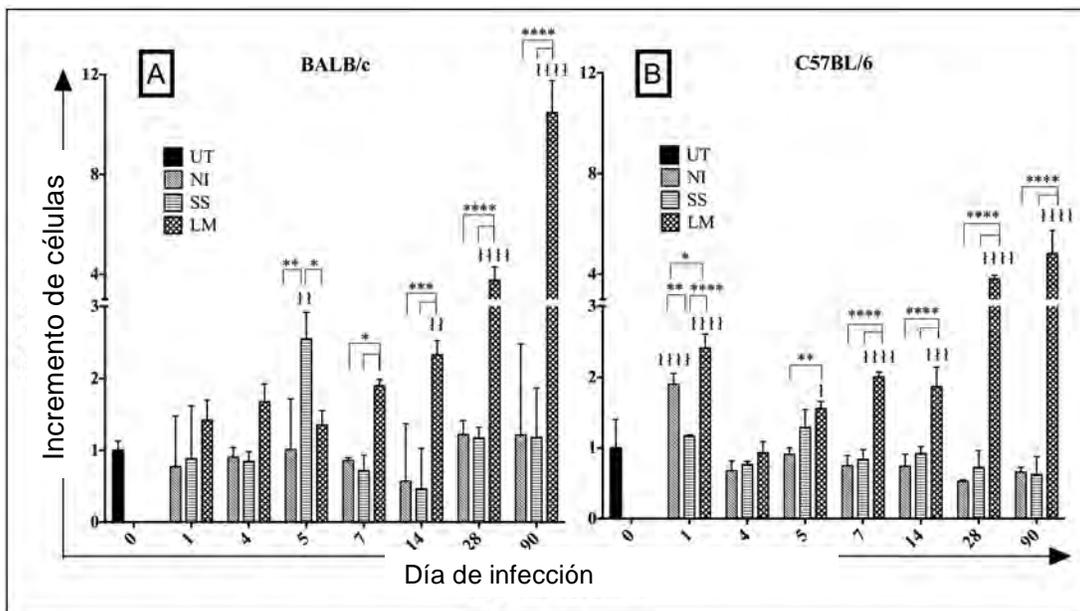


Figura 19. Neutrófilos en piel de lóbulo de orejas de ratones BALB/c y C57BL/6. Cinética de neutrófilos (NIMP-R14+) en lóbulos de las orejas de ratones BALB/c (A) y C57BL/6 (B) infectados con  $1 \times 10^5$  parásitos de *L. mexicana* (LM). Los controles consistieron en lesión por aguja (NI), solución salina (SS) y ratones no tratados (UT). Las barras muestran valores normalizados respecto a los controles no tratados (UT). Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de un triplicado y los valores de P de  $\leq 0,05$  se consideraron significativos (\*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ , \*\* y \*  $P \leq 0,05$ ). ‡‡‡  $P \leq 0,0001$ , ‡‡  $P \leq 0,001$ , ‡ y †  $P \leq 0,05$  representa la significancia estadística de los grupos NI, SS y LM en comparación con el grupo UT.

incremento de tan solo 5 veces para el día 90. Los grupos control de ambas cepas alcanzaron números de neutrófilos similares a los expresados en los grupos sin tratar, con la excepción de un aumento significativo transitorio que se observó en el grupo control SS en el día 5 en los ratones BALB/c y en el grupo control NI en el día 1 en ratones C57BL/6, que permanecieron sin cambios durante el resto del estudio.

En resumen, los neutrófilos de los ratones C57BL/6 mostraron una respuesta más temprana contra *L. mexicana* (comenzando el día 1 post-infección) y alcanzaron su número máximo al final del periodo del estudio (día 90), lo que contrastó con los ratones BALB/c, donde el incremento en el número de neutrófilos comenzó siendo más gradual pero alcanzó números más elevados durante todo el estudio.

### **Existe una estrecha asociación entre células Th17 y neutrófilos durante la fase crónica de la infección por *L. mexicana*.**

La asociación entre células Th17 y neutrófilos en las lesiones no fue evidente durante la fase inicial de la infección, con la excepción del primer día post-infección en ratones C57BL/6, donde los neutrófilos mostraron un ligero aumento coincidiendo con el aumento del número de células Th17 ese mismo día. Sin embargo, sólo después del día 7 se observó una asociación entre ambos tipos de células y que continuó a lo largo de los 90 días de evolución de la enfermedad en ambas cepas de ratón.

Este patrón de incremento gradual y paralelo de las células Th17 y neutrófilos en lesiones de ratones infectados con *L. mexicana* fue evidente en ambas cepas, sin embargo, el pico máximo alcanzado en ambos ratones al día 90 fue mayor en BALB/c, respecto a los C57BL/6.

En conjunto, estos datos muestran que los ratones C57BL/6, que son más resistentes a las infección por *L. mexicana*, también presentan una menor afluencia de células Th17 y neutrófilos en sus lesiones, en comparación con los ratones más susceptibles BALB/c (figura 20 A y B) .

Así que para determinar el grado de asociación que existe entre células Th17 y neutrófilos, se realizó una prueba de correlación de Pearson, utilizando valores normalizados de cada tipo celular en ambas cepas de ratón infectadas, para analizar

una posible correlación lineal entre la afluencia de células Th17 y neutrófilos en días específicos a lo largo del desarrollo de la enfermedad. Los resultados mostraron coeficientes estadísticamente significativos en ambas cepas de ratón: para ratones BALB/c se obtuvo un coeficiente  $r$  de 0,964 ( $p = 0,0082$  \*\*) (figura 20 A y C) y para los ratones C57BL/6 el coeficiente  $r$  fue de 0,971 ( $p = 0,0056$  \*\*) (figura 20 B y D). Los datos utilizados para este análisis se muestran en la Tabla de la figura 20 E.

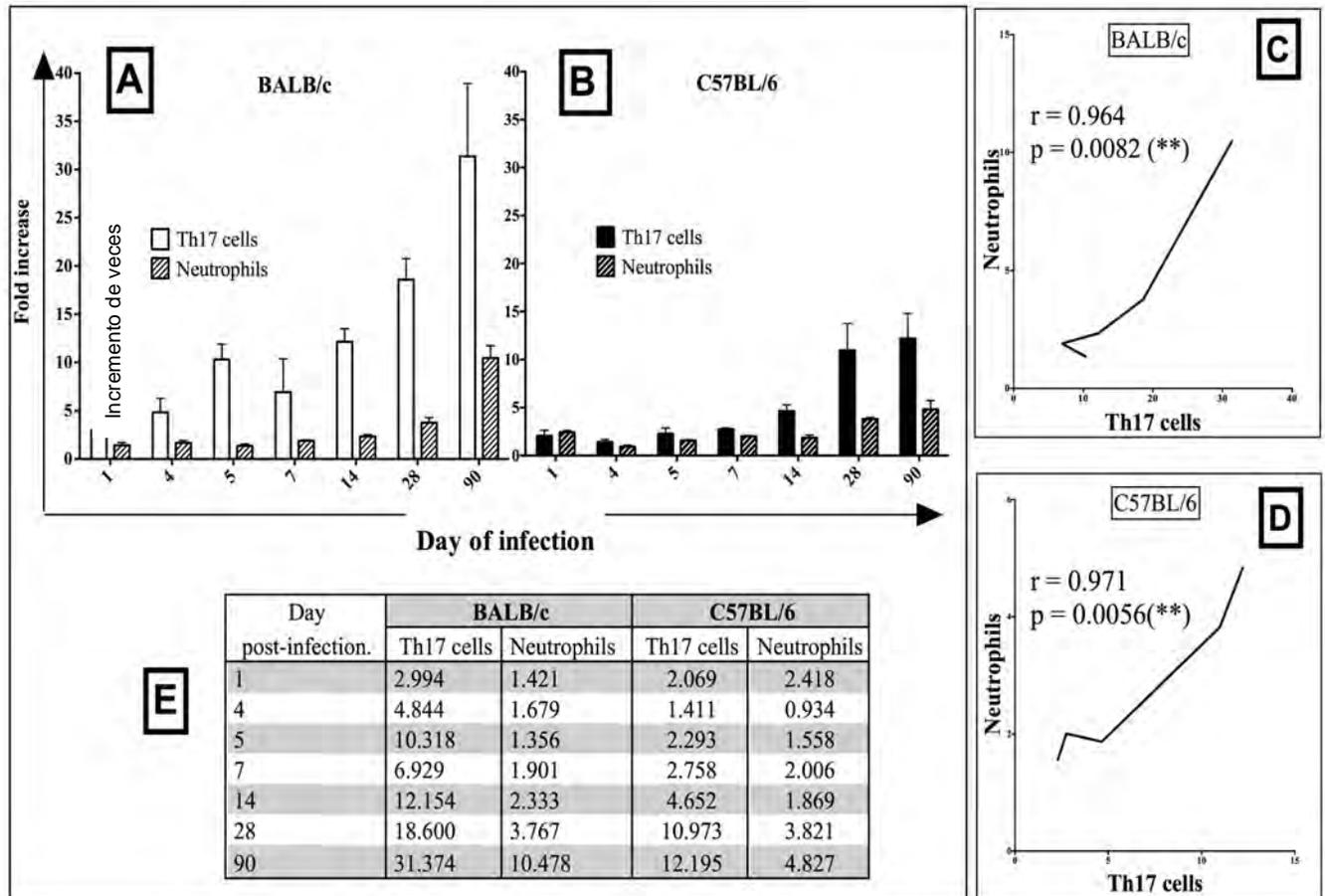


Figura 20. Correlación de células Th17 y neutrófilos en cada una de las cepas de ratón infectadas.

Las barras muestran el promedio (media)  $\pm$  DE de ratones BALB/c (A) y C57BL/6 (B) en diferentes días. El grado de relación lineal entre células Th17 y neutrófilos se estableció mediante la correlación de Pearson, comparando los promedios de células Th17 y neutrófilos en relación con la evolución de la enfermedad. Los resultados mostraron coeficientes significativos en ambas cepas:  $r = 0,964$   $p = 0,0082$  \*\* para BALB / c (C) y  $r = 0,971$   $p = 0,0056$  \*\* para ratones C57BL/6 (D), demostrando una asociación importante entre ambos tipos de células una vez que la infección se establece y se vuelve crónica. Los datos utilizados para los gráficos y la correlación de Pearson se muestran en la tabla (E).

**Existe una asociación entre el grosor de la lesión del lóbulo de la oreja en ratones infectados respecto al número de células Th17 y neutrófilos durante la infección por *L. mexicana*.**

Como ha sido posible apreciar en los resultados pasados, existe una estrecha asociación entre la afluencia de células Th17 y neutrófilos a lo largo del desarrollo de la enfermedad, sin embargo, para determinar la asociación existente entre la presencia de estos tipos celulares (de manera individual) respecto a la inflamación e incremento en el grosor de la lesión, se realizó una prueba de correlación de Pearson utilizando los valores normalizados de cada tipo celular respecto al grosor en milímetros en ambas cepas de ratón infectadas a lo largo de la enfermedad.

Los resultados mostraron coeficientes estadísticamente significativos en ambas cepas de ratón. La correlación entre células Th17 y grosor de la lesión en ratones C57BL/6 mostró un coeficiente  $r$  de 0,9810 ( $p = 0,0001$  \*\*\*\*) (figura 21 A) y en ratones BALB/c el coeficiente  $r$  fue de 0,9663 ( $p = 0,0001$  \*\*\*\*) (figura 21 A). La correlación entre neutrófilos y grosor de la lesión en ratones C57BL/6 mostró un coeficiente  $r$  de 0,9071 ( $p = 0,0019$  \*\*) (figura 21 B) y en ratones BALB/c el coeficiente  $r$  fue de 0,8936 ( $p = 0,0028$ \*\*) (figura 21 B).

En resumen, la presencia de células Th17 y neutrófilos está estrechamente asociada con el incremento en el grosor de la lesión.

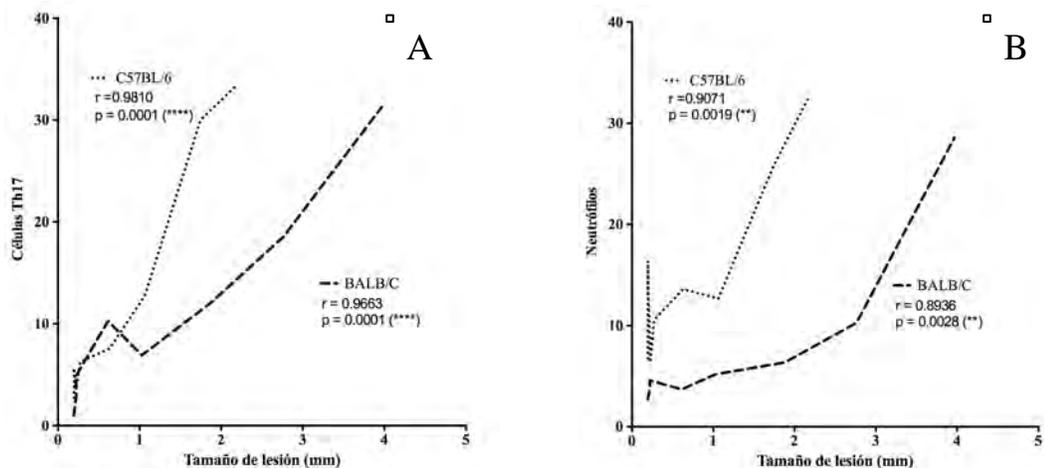


Figura 21. Correlación de células Th17 y neutrófilos respecto al tamaño de la lesión desarrollada en el lóbulo de la oreja en cada una de las cepas de ratón infectadas durante la evolución de la enfermedad. Los resultados mostraron coeficientes significativos en ambas cepas: la correlación entre células Th17 y grosor de la lesión en ratones C57BL/6 mostró un coeficiente  $r$  de 0,9810 ( $p = 0,0001$  \*\*\*\*) (figura 21 A) y en ratones BALB/c el coeficiente  $r$  fue de 0,9663 ( $p = 0,0001$  \*\*\*\*) (figura 21 A). La correlación entre neutrófilos y grosor de la lesión en ratones C57BL/6 mostró un coeficiente  $r$  de 0,9071 ( $p = 0,0019$  \*\*) (figura 21 B) y en ratones BALB/c el coeficiente  $r$  fue de 0,8936 ( $p = 0,0028$ \*\*) (figura 21 B).

**El análisis comparativo de la infiltración de células Th17 y neutrófilos en lesiones de *L. mexicana* muestra una mayor respuesta inflamatoria en ratones BALB/c, especialmente durante la fase crónica.**

Para analizar comparativamente la cinética de infiltración de células Th17 y neutrófilos en lesiones infectadas con *L. mexicana* entre los dos grupos de ratones infectados BALB/c y C57BL/6, se realizó la prueba de Bonferroni. Los ratones BALB/c mostraron un aumento significativamente mayor de infiltración de células Th17 en las lesiones los días 5 y 90 después de la infección, en comparación con los ratones C57BL/c. En el caso de los neutrófilos, esta diferencia estadísticamente significativa se evidenció en los días 1, 4 y 90 post-infección (figura 22), siendo mayor también en los ratones BALB/c. La única excepción se encontró el primer día post- infección, donde el aumento de neutrófilos fue mayor en C57BL/6, en comparación con los ratones BALB/c. Las significancias estadísticas entre ambas cepas de ratón fueron mayores durante la fase crónica de la infección.

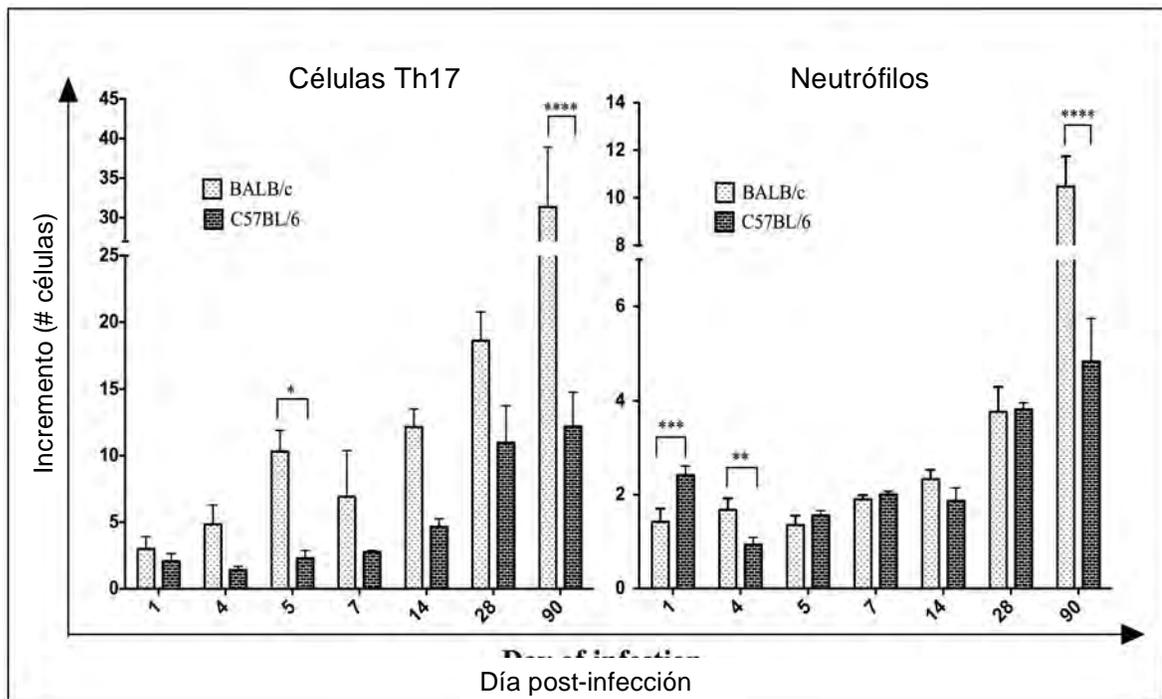


Figura 22. Incremento de veces de células Th17 (A) y neutrófilos (B) en orejas de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con  $1 \times 10^5$  parásitos de *L. mexicana*. Las barras muestran valores normalizados en comparación con el control no tratado (UT). Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de un triplicado y los valores de P de  $\leq 0,05$  se consideraron significativos (\*\*\*\* P  $\leq 0,0001$ , \*\*\* P  $\leq 0,001$ , \*\* y \* P  $\leq 0,05$ ). Las comparaciones se realizaron con la prueba de Bonferroni y se observó significancia estadística en los días 5 (\*) y 90 (\*\*\*\*) post-infección en el caso de células Th17, y para los neutrófilos esta significación se apreció en los días 1 (\*\*\*), 4 (\*\*) y 90 (\*\*\*\*) después de la infección, donde la cepa susceptible mostró valores más altos que los ratones semi-resistentes C57BL/6.

## INMUNOHISTOQUÍMICA

Previo a la IHQ, se analizaron las características y hallazgos histológicos de los tejidos de ambas cepas de ratones que fueron procesados por tinción de H/E para su análisis histopatológico, donde se apreciaron cambios morfológicos e histológicos importantes en el tejido de oreja a diferentes niveles, tanto en el epitelio como en la dermis y sus estructuras asociadas, en comparación con los tejidos control. Estos hallazgos son microscópicamente similares entre ambas cepas de ratón donde pueden observarse cambios en el grosor del epitelio y tejido conectivo debido al aumento de la densidad celular asociada a la inflamación, también es posible apreciar mayor producción de queratina y la presencia de numerosos parásitos ya sea libres en el tejido o contenidos dentro de queratinocitos, fagosomas, VPs o en estructuras similares a NET. Estas diferencias se resumen en la tabla 1.

<b>Tabla 1. Características histológicas de ratones infectados BALB/c y C57BL/6.</b>	
Tejido epitelial	El epitelio muestra hiperqueratosis y acantosis.
Tejido conectivo	El estroma se encuentra compuesto por áreas de transición entre tejido conectivo irregular denso y tejido conectivo irregular laxo.
	Numerosas VP se localizan dentro el estroma, el cual está compuesto por áreas de infiltrado inflamatorio. Áreas de tejido conectivo irregular denso tienden a contener pocas VP, sugiriendo que entre más denso sea el tejido conectivo (TC), menor cantidad de VPs es observada.
	Las fibras de colágeno se encuentran rodeando algunas áreas de vacuolas parasitíferas (VP) localizadas entre áreas del infiltrado linfocitario (*este hallazgo es más característico y común de observar en ratones infectados C57BL/6).
	Vasos sanguíneos grandes y pequeños son encontrados en proximidad a las acumulaciones de parásitos (contenidos o no dentro de VP).
Infiltrado linfocitario	Se aprecian áreas grandes y focalizadas de infiltrado linfocitario rodeando zonas de VP (formando estructuras similares a órganos linfoides terciarios).
Parásitos	Los parásitos se encuentran libres en el tejido, contenidos dentro de VP. Se aprecia también acumulación de amastigotes intraepidérmicos (amastigotes en el interior de los queratinocitos).
Vacuolas parasitíferas (VP)	Se observan extensas áreas de múltiples VP de diferentes tamaños conteniendo amastigotes de <i>L. mexicana</i> , las cuales se localizan principalmente dentro del tejido conectivo irregular laxo que contiene zonas de infiltrado inflamatorio.
NET	Es difícil diferenciar PVs de NET, sin embargo en ambos ratones, es clara la presencia de células morfológicamente similares neutrófilos, donde sus nucleos de parecen liberar trampas extracelulares sobre las cuales se retienen numerosos parásitos en áreas del tejido infectado.

Posterior al análisis de H/E, se realizó la IHQ para evaluar la expresión de los marcadores analizados en este estudio.

Es importante recordar que los resultados de esta metodología fueron útiles para corroborar la información obtenida por citometría de flujo, donde se pudo apreciar una expresión diferencial entre ambas cepas de ratones cuando la infección había evolucionado a la cronicidad y cuyo aumento gradual siguió un patrón continuo, más intenso y dramático en la cepa susceptible BALB/c, que en los ratones semi-resistentes C57BL/6 (especialmente en el fase tardía de la infección al pasar del día 28 a 90 después de la infección).

En este análisis inmunohistoquímico, se procesaron todas las muestras de la cinética y se evaluó la expresión de los marcadores en el tejido. De manera general, fue posible apreciar un incremento en la expresión inmunohistoquímica de neutrófilos y células Th17 en la piel infectada crónica de ratones Balb/C y C57BL/6 que mostraron una abundante expresión de IL-17 con áreas coincidentes de células CD4+ y células NIMP-R14+ dentro de áreas de inflamación crónica que se encuentran estrechamente relacionadas con numerosos parásitos de *L. mexicana* que se encontraban principalmente en vacuolas parasitóforas, menos frecuentemente dispersos libremente en el infiltrado celular del estroma y también asociados a estructuras histológicas similares a las trampas extracelulares de neutrófilos (NET).

A continuación se muestran los paneles de imágenes correspondientes al día 0, 5 y 90 post-infección en ambas cepas de ratones, debido a que corresponden a los días con mayor significancia estadística entre ambas cepas. Los paneles de IHQ de los días restantes y los controles se muestran completos en la sección de “Información Suplementaria”.

### **Análisis inmunohistoquímico de la distribución de CD4, IL-17 y neutrófilos en tejidos infectados por *L. mexicana* a los días 5 y 90 post-infección.**

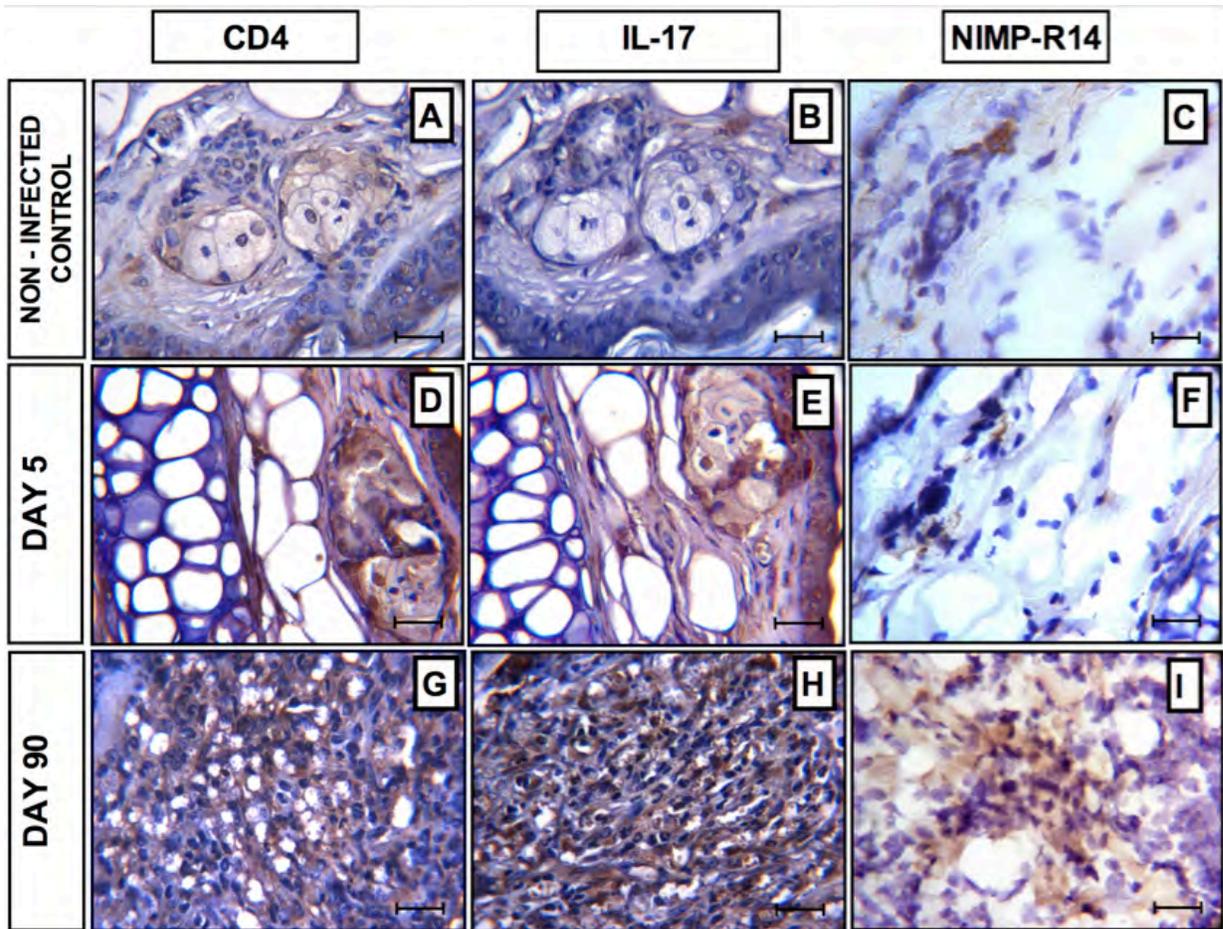
En condiciones basales (ratones no tratados - grupo UT), los ratones BALB/c albergan pocas células CD4+ las cuales fueron encontradas en el epitelio, el tejido conectivo y las glándulas sebáceas, asociadas o no a los folículos pilosos (debido a la cápsula del

tejido conectivo que se encuentra en estas glándulas). La expresión de IL-17 fue escasa y sólo se observó en algunas células que también fueron positivas para CD4+ tinción en el epitelio y la dermis (figura 23 B). Se encontraron neutrófilos (células NIMP-R14+) en la dermis, aunque algunos también fueron observados cerca de glándulas sebáceas/foliculares, mostrando escasa tinción (figura 23-C)

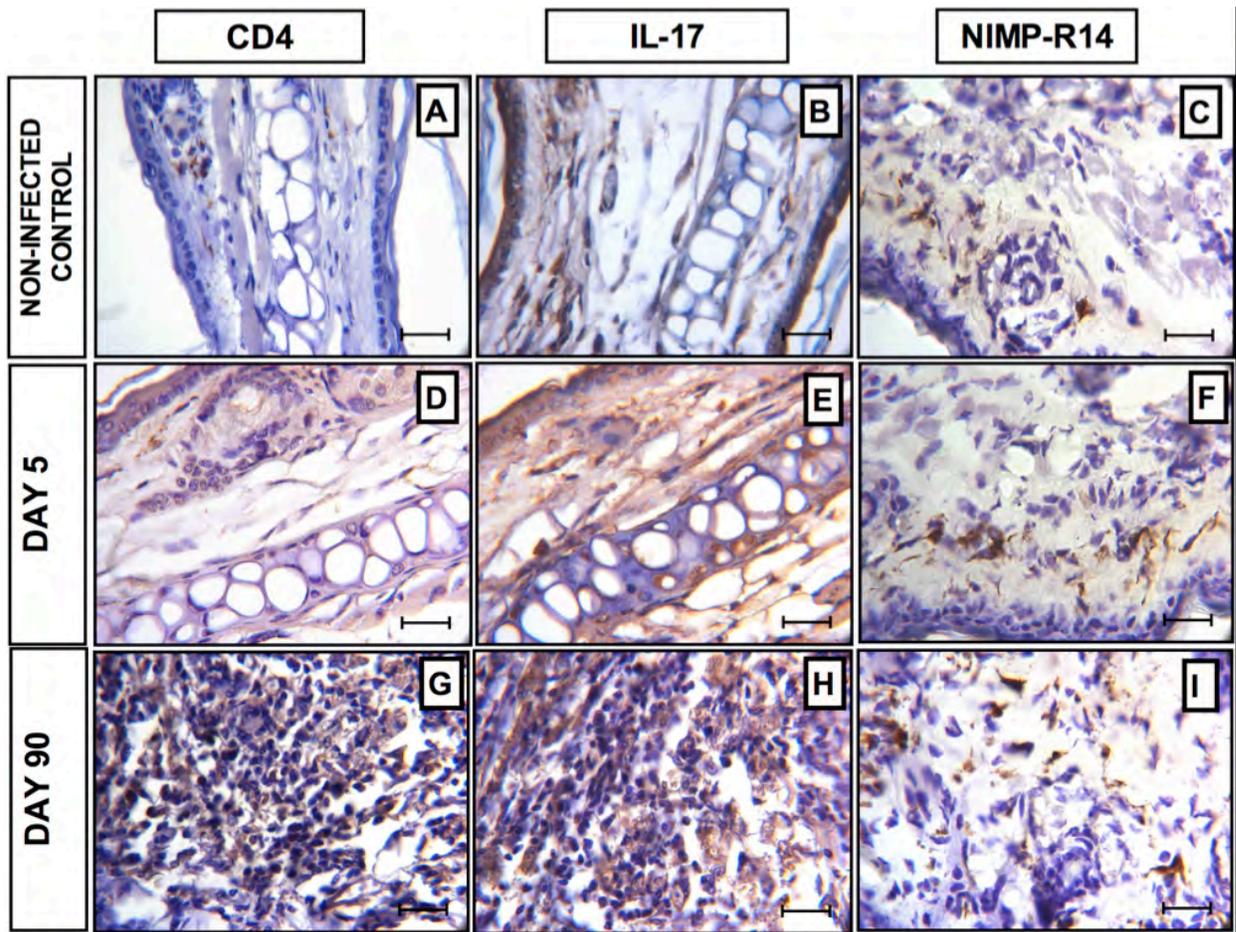
En ratones C57BL/6, la expresión de CD4 y NIMP-R14 en condiciones basales (grupo UT) fue similar a la de BALB/c (Figuras 24 A y 24C). Sin embargo, en ratones C57BL/6 la expresión de IL-17 incrementó en el epitelio y no siempre coincidió con células CD4+, lo que sugiere que la IL-17 no sólo es producida por células T sino también por otras células epiteliales en condiciones basales (figura 24 B). Los otros controles no infectados de lesión por aguja (NI) o inyección de solución salina (SS) mostraron células CD4, IL-17 y NIMP-R14 disminuidas, similares a los tejidos no tratados (datos mostrados en “Información Suplementaria”)

Los tejidos infectados fueron analizados los días 5 y 90 post-infección. En el día 5 de infección, la expresión tanto de CD4+ como de IL-17+ aumentaron en las mismas áreas del epitelio y tejidos conectivo en ambas cepas de ratón, aunque se observó una positividad mayor en las lesiones de ratones BALB/c (figura 23 D y E) respecto a las lesiones de ratones C57BL/6 (figura 24 D y E). La distribución de neutrófilos (NIMP-R14+) fue similar en ambas cepas de ratones, donde fueron encontrados exclusivamente en la capa de tejido conectivo de los lóbulos de las orejas (Figura 23 F y 24 F).

Al día 90 la respuesta inflamatoria se incrementó en los tejidos infectados de ambas cepas de ratón. Las lesiones de ratones BALB/c (figura 23 G, 23 H y 23 I) y C57BL/6 (figura 24 G, 24 H, 24 I) mostraron una alta expresión de IL-17, que coincidía con áreas de células CD4+ y células NIMP-R14+ dentro del infiltrado inflamatorio crónico. En resumen, los datos observados por tinción inmunohistoquímica confirman los resultados obtenidos por citometría de flujo, los cuales muestran una abundante concentración de células Th17 y neutrófilos en los tejidos infectados de *L. mexicana* de manera importante durante la fase crónica de la enfermedad.



□ Figura 23.  
 Análisis inmunohistoquímico de CD4, IL-17 y neutrófilos (NIMP-R14) en lóbulos de las orejas de ratones BALB/c bajo diferentes condiciones. Las imágenes A, B y C corresponden a controles no tratados, que muestran las expresiones basales de CD4, IL-17 y NIMP-R14. Las imágenes D, E y F muestran tejidos después de 5 días de infección donde se evidencia expresiones elevadas de CD4 e IL-17 en epitelio y tejido conectivo, coincidiendo en las mismas áreas. Las imágenes G, H e I muestran tinción de 90 días post-infección y es evidente un claro incremento del marcaje de CD4, IL-17 y NIMP-R14 dentro de este infiltrado celular. Las tinciones marrones muestran células positivas (reveladas por peroxidasa). Ampliación de 40X. Barra de escala = 50  $\mu$ m



□ Figura 24. Análisis histológico e inmunohistoquímico de la piel de la oreja de los ratones C57BL/6. Análisis inmunohistoquímico de CD4, IL-17 y neutrófilos (NIMP-R14) en lóbulos de las orejas de ratones C57BL/6 bajo diferentes condiciones. Las imágenes A, B y C corresponden a controles no tratados, que muestran la expresión basal de CD4, IL-17 y NIMP-R14. Las imágenes D, E y F muestran tejidos después de 5 días de infección donde se evidencia una expresión elevada de CD4 e IL-17 en epitelio y tejido conectivo, coincidiendo en las mismas áreas. Las imágenes G, H e I muestran tinción en el día 90 post-infección y es evidente un claro incremento en la expresión de CD4, IL-17 y NIMP-R14 dentro de este infiltrado celular. Las tinciones marrones muestran células positivas (reveladas por peroxidasa). Ampliación de 40X. Barra de escala = 50  $\mu$ m

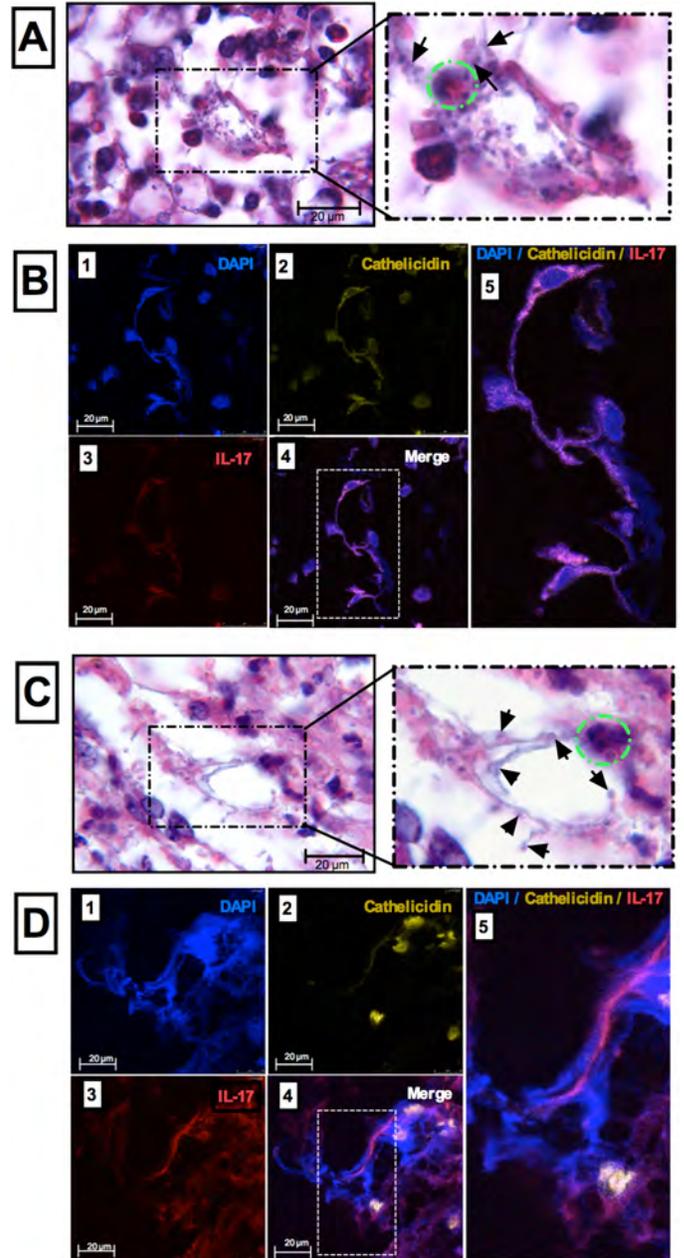
### **Estructuras histológicas similares a NET en lesiones crónicas**

Se observaron numerosos parásitos de *L. mexicana* en el infiltrado celular del estroma, los cuales se encontraban contenidas principalmente en vacuolas parasitóforas (VP) y con menor frecuencia se hallaban dispersas libremente en el tejido después del día 30 post-infección. También fue posible apreciar estructuras histológicas similares a NET en lesiones crónicas a partir del día 30 post-infección, donde algunas células mostraron núcleos lobulados, distintivos de neutrófilos, liberando trampas extracelulares que retenían numerosos parásitos en algunas áreas de los tejidos infectados (figura 25 A/C). Sin embargo, dado que las NET son difíciles de diferenciar de las VP en los tejidos, se agregaron estudios más detallados para determinar su presencia en la piel infectada. Por lo tanto, se realizó IHQ por técnica de fluorescencia para identificar los núcleos celulares, cathelicidina e IL-17, así como su co-localización. Fue posible apreciar estructuras delgadas y largas compuestas principalmente de material genético, que parecen extruirse de algunos núcleos que fueron visualizados con DAPI (figura 25 B-1/ D-1). Por otra parte, la expresión de IL-17 (figura 25 B-3/D-3) y cathelicidin (figura 25 B-2/D-2) co-localizaba dentro de las NET que además albergaban algunos parásitos de *L. mexicana* (figura 25 B-4/ D-4). Cabe señalar que, dado que DAPI tiñe el ADN de las células así como el de los parásitos, la captura de imágenes de los pequeños núcleos de parásitos por microscopía confocal se ensombreció por la tinción fluorescente más intensa de los núcleos celulares. En conjunto, nuestros resultados mostraron la presencia de NET en lesiones crónicas de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*.

Figura 25. Presencia de NET en lesiones de lóbulo de la oreja crónica de ratones C57BL/6 y BALB/c infectados con *L. mexicana*.

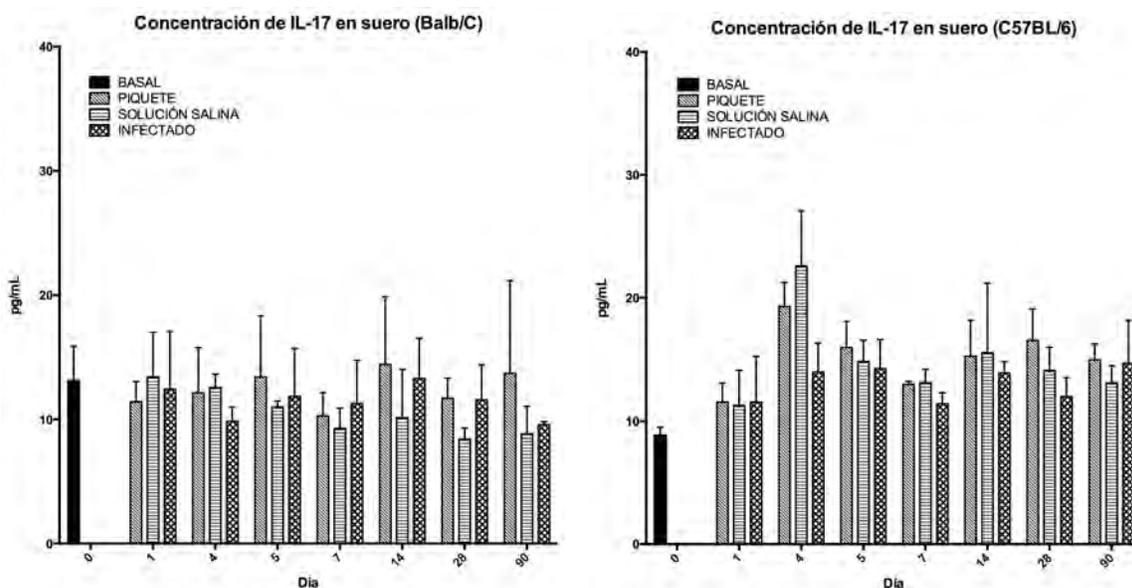
Las imágenes A y C muestran la tinción de H/E de las lesiones de los lóbulos de las orejas de ratones infectados C57BL/6 (A) y BALB/c (C) al día 90 post-infección. Las estructuras histológicas que asemejan NETs se muestran en el cuadro de selección de puntos, donde se puede encontrar una célula con núcleo lobulado (círculo verde) y extensiones citoplasmáticas que contienen numerosos amastigotes de *L. mexicana* (flechas negras). Ampliación de 100X. Barra de escala = 20  $\mu$ m.

Las imágenes B y D muestran la tinción por inmunofluorescencia de los lóbulos de las orejas C57BL/6 (B) y BALB/c (D) infectados (90 dpi) mostrando co-localización de la catelicidina, IL-17 y ADN en una estructura histológica grande con extensiones citoplasmáticas compuestas principalmente de material genético. El panel superior izquierdo (B1/ D1) muestra la tinción de ADN (DAPI), el panel superior central (B2 / D2) muestra la catelicidina teñida con TRITC y observada en color amarillo en la imagen, el panel inferior izquierdo (B3 / D3) muestra a IL-17 teñida con APC en color rojo y el panel inferior central (B4 / B4) muestra la combinación de ambas marcas en color rosa. La imagen ampliada de las tinciones fusionada (B5 / D5) muestra las extensiones citoplásmicas compuestas de ADN que parecen extruir desde el núcleo y que co-localizan con catelicidina e IL-17 dentro de los NETs. Las fotografías fueron tomadas con microscopía confocal. Ampliación de 63X. Barra de escala = 20  $\mu$ m.



## ELISA

La cuantificación de la citocina IL-17 en el suero de los ratones fue evaluada a través de ELISA. El rango de curva estándar del kit utilizado es de 16 - 2000 pg/mL. La concentración de IL-17 en el suero de los ratones infectados no muestra diferencias importantes en comparación con los grupos controles. El rango de concentración de IL-17 obtenido en el suero de los ratones controles e infectados fue de 31-113 pg/mL en BALB/c y 49-381 pg/mL en C57BL/6, donde no se observó ninguna tendencia de incremento en ratones infectados ni en etapas tempranas ni tardías de la infección. Estos datos se muestran graficados en las figura 26.



□ Figura 26. Concentración de IL-17 en suero de ratones BALB/c y C57BL/6 a lo largo de la infección.

La concentración de IL-17 en el suero de los ratones infectados no mostró diferencias importantes en comparación con los grupos controles, lo que sugiere que la producción de IL-17 ocurre exclusivamente a nivel local y no sistémico. Además, los resultados de IHQ y FC confirmaron la expresión incrementada de esta citocina en la zona de la lesión.

## DISCUSIÓN

La inflamación está mediada por muchos tipos celulares y sus productos donde los neutrófilos como las células Th17 están implicadas de manera importante en esta respuesta inmunológica debido a que se caracterizan por producir varias citocinas proinflamatorias, entre ellas IL-17 (IL-17A/F).<sup>21,95</sup>

IL-17 es una citocina altamente proinflamatoria que induce una reacción tisular inflamatoria masiva<sup>21,22</sup> y estimula la producción de muchas otras citocinas incluyendo IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , quimiocinas como CXCL1, CXCL6, CXCL10, CXCL8 (o IL-8, un atrayente de quimioquinas para neutrófilos), (IP-10, que actúa como un quimioatrayente para células Th1), NOS-2 y metaloproteinasas por monocitos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, macrófagos y neutrófilos.<sup>22,84,96,97</sup>

Hasta donde sabemos, no hay estudios comparativos sobre las respuestas combinadas de células Th17 y neutrófilos durante las fases agudas y crónicas de la infección por *Leishmania mexicana* en los ratones susceptibles BALB/c y los ratón semi-resistentes C57BL/6. En este estudio se analizó la cinética de la infiltración de células Th17 y neutrófilos en las lesiones de oreja de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados por *L. mexicana* entre las 24 horas y 90 días post-infección.

Estudios previos sobre el papel de las células Th17 y los neutrófilos en las infecciones por *Leishmania* han analizado cada una de estas células individualmente, revelando datos contradictorios sobre su papel en la fisiopatogenia de la enfermedad. Estas discrepancias nos motivaron a hacer un estudio de correlación entre los dos tipos de células en dos modelos de ratón con un fondo genético diferente.

Los neutrófilos son las células inmunitarias circulantes más abundantes que infiltran rápidamente sitios de infección o de inflamación estéril que albergan productos del huésped no nocivos o dañinos, incluidos a ácidos nucleicos.<sup>56</sup> En leishmaniasis, los neutrófilos se han asociado tanto a la exacerbación de la enfermedad así como al control de la misma, dependiendo del origen genético del huésped, así como de la cepa del parásito. En los ratones BALB/c, se ha demostrado que la susceptibilidad a *Leishmania* se correlaciona con la elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de los neutrófilos, mientras que los ratones semi-resistentes

C57BL/6 expresan una mutación alélica del receptor P2X7 que es responsable de una menor producción de ROS, disminución de la secreción de IL-1b, baja tasa de apoptosis y atenuación de la activación del inflamasoma de NLRP3.<sup>98-102</sup> Además, se han descrito diferentes fenotipos de neutrófilos con diferente expresión de TLR2, TLR7, TLR9 y diferente producción IL-12p70 e IL-10 en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *Leishmania major*. Esto es, mientras que los neutrófilos de ratones C57BL/6 producen niveles más elevados de ambas citocinas, los neutrófilos de los ratones BALB/c no secretaron la forma activa IL-12p70, dificultando así el control del parásito.<sup>103</sup> Por lo que de alguna manera este polimorfismo (y algunos otros más) influye en la disminución de la actividad inflamatoria que podría repercutir en un menor número de neutrófilos en los ratones C57BL/C en nuestros resultados.

En infecciones por diferentes especies de *Leishmania* como *L. major*,<sup>55</sup> *L. donovani* y *L. amazonensis* en ratones Balb/C y C57BL/6,<sup>104</sup> los neutrófilos son reclutados entre las primeras 6 y 24 horas después de la infección, mostrando parásitos fagocitados dentro de la primera y 12 horas post-infección, e incluso cuando nuestra cinética empezó a ser evaluada 24 horas después de la infección y no antes, se obtuvieron resultados coincidentes sólo en los ratones C57BL/6. Lo que podría estar apoyando la idea de que el reclutamiento temprano de neutrófilos podría estar confiriendo cierta resistencia al huésped C57BL/6, debido al papel protector de los neutrófilos asociados con la infiltración rápida a los sitios de entrada del patógeno,<sup>15,104</sup> ya que los neutrófilos, junto con sus mecanismos fagocíticos y líticos, también emplean trampas extracelulares de neutrófilos (NET) como mecanismo de defensa contra patógenos extracelulares e intracelulares, como en las infecciones por *L. amazonensis*, y donde se ha demostrado que la NETosis limita la infección parasitaria.<sup>55,56,104-109</sup> Sin embargo, estas células también pueden conducir a una reacción vascular local y a la inducción de daño tisular a través de la generación de ROS, producción de proteasas, así como la secreción de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, leucotrienos y NET.<sup>68,110-112</sup>

Los datos obtenidos en nuestro estudio concuerdan con la literatura, donde encontramos que además de los neutrófilos (células NIMP-R14+) y abundantes células T CD4+ que expresan IL-17 en áreas que albergan numerosos amastigotes

de *L. mexicana*, se evidenció la formación de NET en los tejidos infectados crónicamente con *Leishmania mexicana*. Las NET fueron confirmados a través de inmunofluorescencia, mostrando la presencia de estructuras de ADN extracitoplasmático teñido con DAPI y asociadas a IL-17 y catelicidina. La presencia combinada de estas moléculas ha sido descrita previamente en las NET.<sup>61,63,64,</sup>

Las NET se han asociado con daño a tejidos a través de la producción de IL-1 $\beta$  e IL-17, un mecanismo por el cual los neutrófilos regulan a las células Th17 y sostienen la inflamación crónica.<sup>57,113</sup> De esta manera, los neutrófilos representan una espada de doble filo que no sólo contribuye a la inflamación aguda y la eliminación del patógeno, sino también a la cronicidad inflamatoria y al daño tisular.<sup>57</sup>

Nuestros resultados muestran que los neutrófilos no sólo aumentan durante la fase aguda de la infección por *Leishmania mexicana*, sino aún más importantemente durante la fase crónica de la infección, donde los neutrófilos incrementan concomitantemente con las células Th17, a lo largo de la progresión de la enfermedad y que coincide con el incremento en el grosor de la lesión. Es importante destacar que esta respuesta fue significativamente más elevada en la cepa susceptible BALB/c, en comparación con la cepa más resistente C57BL/6.

Cabe señalar que el aumento transitorio de neutrófilos observado el día 5 en ratones BALB/c que recibieron únicamente solución salina podría ser atribuido posiblemente al cloruro de sodio contenido en la solución utilizada como vehículo para el parásito, ya que se ha demostrado que el cloruro de sodio induce diferenciación de células Th17<sup>114</sup> y debido a que las células Th17 también aumentaron significativamente el día 5 en ratones BALB/c, sus mediadores podrían ser responsables del reclutamiento de neutrófilos en el sitio de infección en estos ratones.

En conjunto, los neutrófilos representan el link entre las respuestas inmunes innatas y adaptativas a través de sus producción de citocinas y quimiocinas, así como a través de su papel como CPA, capaces de dirigir las respuestas linfocitarias, incluyendo a las células Th17.<sup>115,116</sup> Las células Th17 son otras células inflamatorias clave debido a su producción de citocinas altamente proinflamatorias tales como IL-17 (IL-17A), IL-17F, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$ , IL-6, que son capaces de estimular NOS-2 y metaloproteinasas en varios tipos de células.<sup>21,96,84,97</sup>

Como se sabe, la leishmaniasis cutánea experimental representó el primer modelo del paradigma Th1/Th2 demostrado en ratones BALB/c y C57BL/6 ante la infección por *L. major*, donde los ratones C57BL/6 mostraron predominantemente una respuesta de tipo Th1 con altos niveles de IFN- $\gamma$  (que activa las propiedades antimicrobianas de los macrófagos), mientras que los ratones BALB/c desarrollaron una predominante respuesta celular tipo Th2 con altos niveles de IL-4, IL-5 y IL-13.<sup>20</sup> Sin embargo, el posterior descubrimiento de la respuesta Th17 ha abierto nuevos panoramas de su participación en la leishmaniasis.

En la leishmaniasis el papel de las células Th17 sigue siendo controversial. En pacientes infectados con *L. braziliensis*, se ha demostrado que las células Th17 exacerbaban el daño tisular y la correlación positiva entre la expresión de ARNm de IL-17 y IFN- $\gamma$  sugiere que las células Th17 y Th1 actúan conjuntamente induciendo daño tisular en estos pacientes.<sup>93,117</sup> Por otro lado, también se ha informado que las células Th17 median la eliminación de *Leishmania donovani* en asociación con la activación de células Th1. En este caso, el mecanismo propuesto fue atribuido a la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células Th1, que regula negativamente la respuesta Th17 después de que la infección fue controlada, evitando así el daño tisular.<sup>84</sup>

Sin embargo, una demostración más clara sobre el papel de las células Th17 sobre el daño inflamatorio severo causado por el reclutamiento de neutrófilos se reportó en infecciones por *L. major* y *L. braziliensis*, utilizando ratones BALB/c IL-17<sup>-/-</sup>, que mostraron mayor resistencia a la infección.<sup>93,94,118,119</sup> Esto también fue confirmado en ratones C57BL/6 IL-17<sup>-/-</sup> que fueron altamente resistentes a leishmaniasis visceral causada por *L. donovani*.<sup>120</sup> El papel de las células Th17 en la leishmaniasis parece también estar relacionado con el fondo genético del huésped. Esto es, en ratones C57BL/6 infectados con *L. major*, las células Th17 se han asociado con un papel protector debido al incremento en la proliferación celular, el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos alternativamente activados, previniendo el desarrollo de la lesión<sup>67,121</sup>. Sin embargo, datos contradictorios en BALB/C muestran una asociación entre las células Th17 y Th2 con una producción elevada de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17, ejerciendo un efecto inhibitor sobre los mecanismos leishmanicidas de los macrófagos y por lo tanto, agravando así la infección.<sup>11,19,20,94</sup> De acuerdo con las

observaciones sobre las células Th17, también el papel de IL-17 difiere según el fondo genético del huésped, ya que en ratones BALB/c se mostró que esta citocina se encuentra asociada con la progresión de la enfermedad, mientras que en ratones C57BL/6 se ha demostrado que contribuye al control de la enfermedad.<sup>94,122</sup>

Nuestros resultados aportan nueva información que ayuda a aclarar el panorama sobre reportes previos aparentemente contradictorios sobre células Th17 y neutrófilos en leishmaniasis, ya que en nuestro estudio se analizaron ambos tipos de células simultáneamente en dos cepas de ratón con diferentes fondos genéticos: el ratón BALB/c susceptible y el ratón semi-resistente C57BL/6. Demostramos que además de los neutrófilos, también existe una concomitante y continua diferenciación y reclutamiento de células Th17 en los tejidos infectados a lo largo de la evolución de la enfermedad. Aunque tanto las células Th17 como los neutrófilos aumentaron constantemente a lo largo de la infección por *L. mexicana*, su número difirió significativamente entre los ratones susceptibles BALB/c y los ratones más resistente C57BL/6. Este incremento diferencial de ambos tipos de células se hizo muy evidente una vez que la infección se había vuelto crónica, donde números significativamente mayores de células Th17 y neutrófilos fueron reclutados en las lesiones de los ratones susceptible BALB/c en el día 90 post-infección, en comparación con los C57BL/6. Hay que destacar que el incremento en el número de células también se correlacionó con el tamaño de la lesión en los ratones BALB/c, respecto a los ratones C57BL/6.

La inflamación crónica es una suma de muchas respuestas inmunológicas desarrolladas por los tejidos y las células contra antígenos procedentes de una infección persistente o auto-antígenos del huésped. Con estos datos podemos especular que el importante incremento en el número de neutrófilos y células Th17 en infecciones crónicas de los ratones BALB/c causan inflamación incontrolada, ayudando a la propagación del parásito y posiblemente contribuyendo a la susceptibilidad de esta cepa frente a la infección por *L. mexicana*. En contraste, la respuesta más controlada de estas células en ratones C57BL/6 posiblemente se relaciona al perfil más resistente que muestra esta cepa de ratón. Aunque las células Th17 son unas de las principales células productoras de IL-17, no podemos descartar la posibilidad de que otras células productoras de IL-17 actúen juntas para crear un

ambiente favorable para la replicación y diseminación del parásito, agravando así el desarrollo de la enfermedad.

En diversas infecciones se ha demostrado cómo las células Th17 median la patología induciendo una infiltración inflamatoria severa a través del reclutamiento constante de neutrófilos;<sup>118,119</sup> esto coincide con nuestros resultados y otros datos informados acerca de cómo la respuesta de células Th17 con su citocina IL-17 también están implicados en la progresión de la leishmaniasis cutánea causada por *L.major* en ratones BALB/c, que mostró un mayor número de células Th17 y mayor producción de IL-17 en el tejido y en los ganglios linfáticos en comparación con la cepa C57BL/6.<sup>94</sup> Dichos resultados coinciden con los nuestros respecto a la expresión de IL-17 en el sitio de infección, demostrando el efecto local de la citocina, ya que sistémicamente no encontramos ningún hallazgo importante en la concentración de IL-17 en el suero de ratones infectados.

A pesar de que se necesitan más datos para obtener un conocimiento profundo de la patogénesis de la leishmaniasis, los resultados obtenidos en nuestro estudio posiblemente indican que la inflamación incontrolada en la fase crónica de la infección, se atribuye a la intensa y abundante infiltración de células Th17 y neutrófilos en la infección por *L. mexicana*, ya que el diálogo entre ambos tipos de células representa una retroalimentación en su desarrollo y reclutamiento al sitio de la infección que está mediada por IL-17, repercutiendo así en la susceptibilidad y severidad de la enfermedad en los ratones BALB/c.

## CONCLUSIONES

- *Leishmania mexicana* induce y mantiene la diferenciación de células Th17 en el tejido infectado de ambas cepas de ratones, sin embargo la respuesta inflamatoria que generan los ratones BALB/c es más intensa que la generada en ratones C57BL/6, especialmente en la fase crónica de la infección.
- Los neutrófilos infiltran los tejidos infectados por *L. mexicana* desde fases tempranas y permanecen en ellos durante la fase tardía de la infección, donde se encontraron en niveles más elevados en la cepa susceptible BALB/c.
- Existe una estrecha asociación entre células Th17 y neutrófilos, los cuales muestran un alto grado de correlación entre ellos a partir del día 5 post-infección y durante toda la fase crónica de la infección por *L. mexicana*.
- La infiltración continua de células Th17 y neutrófilos en la zona de la lesión se asocia importantemente con el tamaño de la lesión.
- La infiltración de células Th17 y neutrófilos en lesiones de *L. mexicana* muestra una mayor respuesta inflamatoria en ratones BALB/c, especialmente durante la fase crónica, mientras que los ratones C57BL/6, al ser más resistentes a la infección por *L. mexicana*, presentan una menor afluencia de células Th17 y neutrófilos en sus lesiones.
- La infección por *L. mexicana* induce un incremento en la expresión de neutrófilos y células Th17 en la piel infectada de ratones BALB/c y C57BL/6, donde se observa una abundante expresión de IL-17 con áreas coincidentes de células CD4+ y células NIMP-R14+ dentro de áreas de inflamación crónica que se encuentran estrechamente relacionadas con numerosos parásitos de *L. mexicana*
- La producción de IL-17 ocurre importantemente a nivel local en el sitio de infección, más no a nivel sistémico y cuyo incremento es dependiente del tiempo de evolución de la enfermedad (especialmente en la cepa susceptible).
- Los parásitos de *L. mexicana* se encuentran principalmente en vacuolas parasitóforas, menos frecuentemente dispersos libremente en el infiltrado celular del estroma y también asociados a estructuras histológicas similares a las trampas extracelulares de neutrófilos (NET).

- Nuestros resultados confirmaron la presencia de NET en lesiones crónicas de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*.
- Las células Th17 y los neutrófilos son componentes celulares inmunológicos importantes, estrechamente asociados e implicados en la inflamación y patogénesis durante la infección por *Leishmania mexicana*.
- La infección de *Leishmania mexicana* persiste como consecuencia de la inflamación generada por el constante reclutamiento de neutrófilos y diferenciación de células Th17 en la fase tardía de la infección en ambos ratones, pero con un mayor número en la cepa susceptible BALB/c en comparación con los C57BL/6.

# **ARTÍCULO IMPRESO**

## ORIGINAL ARTICLE

# Th17 cells and neutrophils: Close collaborators in chronic *Leishmania mexicana* infections leading to disease severity

C. P. Pedraza-Zamora | J. Delgado-Domínguez | J. Zamora-Chimal | I. Becker 

Facultad de Medicina, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Hospital General de México, Ciudad de México, México

**Correspondence**

Ingeborg Becker, Facultad de Medicina, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Hospital General de México, Ciudad de México, México. Email: becker@unam.mx

**Funding information**

PAPET, Grant/Award Number: IN217515; CONACYT, Grant/Award Number: 221405

**Summary**

Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* is associated with an important inflammatory response. We here analysed the kinetics of Th17 cells and neutrophils in ear lobe lesions caused by *Leishmania mexicana* throughout 90 days of disease progression in susceptible BALB/c and semi-resistant C57BL/6 mice infected with  $1 \times 10^5$  *Leishmania mexicana* promastigotes. Cells in the lesions were extracted and quantified by flow cytometry, whereas their distribution in the tissues in relation to the parasites was analysed by immunohistochemistry. Our results show that in BALB/c mice, both Th17 cells and neutrophils increase concomitantly and to significantly higher levels on day 90 post-infection, as compared to C57BL/6 mice. Our results provide novel evidence on the cells causing chronic inflammation throughout *Leishmania mexicana* infections, resulting as a consequence of neutrophil recruitment together with Th17 cell differentiation and recruitment, both of which remain in the infection site throughout the late phase of the infection. We conclude that the more enhanced levels of Th17 cells and neutrophils during chronic inflammatory lesions in BALB/c mice participate in their enhanced susceptibility towards a progressive disease evolution, whereas the more controlled response of these cells in C57BL/6 mice possibly relates to the more resistant profile of this mouse strain.

**KEYWORDS**

IL-17, Inflammation, *Leishmania mexicana*, neutrophils, Th17 cells

## 1 | INTRODUCTION

Leishmaniasis is a zoonotic tropical disease with a worldwide distribution, caused by *Leishmania* spp.<sup>1</sup> The parasite is transmitted by the bite of infected female phlebotomine sandflies belonging to the species *Phlebotomus* spp. and *Lutzomyia* spp. in the Old and New World, respectively.<sup>2,3</sup> Once inside the mammalian host, parasites are taken up by macrophages and other phagocytic cells. There are over 20 different *Leishmania* species transmitted by more than 90 species of vectors.<sup>3,4</sup> Depending on the infective *Leishmania* species, one of the three clinical forms may develop: (i) cutaneous leishmaniasis which is divided into self-healing or "localized" (LCL) and nonhealing or "diffuse" cutaneous leishmaniasis (DCL); (ii) mucocutaneous leishmaniasis (MCL); and (iii) visceral leishmaniasis (VL) which can derive in a complication named post-kala-azar dermal leishmaniasis.<sup>5</sup>

Cutaneous leishmaniasis is the most common clinical outcome.<sup>1</sup> In Mexico and many regions of Central America, *Leishmania mexicana* is the main species causing LCL and DCL in humans and animals.<sup>5-8</sup>

### 1.1 | Immune response

Immunity against *Leishmania* is mediated by innate and adaptive responses, where rapid phagocytosis is an initial key strategy for the parasite survival and is mainly executed by neutrophils, macrophages and dendritic cells.<sup>10-12</sup> Neutrophils are short-lived cells that play a central role in temporary parasite "clearance," thereby offering a transient safe shelter to parasites and allowing their direct entry into macrophages by expressing apoptotic markers on the neutrophil surface.<sup>14-16</sup> Parasite phagocytosis leads to the subsequent activation of CD4<sup>+</sup> T cells, which differentiate into one of the T-cell subsets:

	
Journal Name	PIM
Manuscript No.	12420
DATE	
No. of pages: 13	Dispatch: 28-2-2017
PE: Bhagyalakshmi	CE: Amekiaraj P

Th1, Th2, Th17 or Tregs in response to the parasitic infection.<sup>19</sup> The Th1/Th2 paradigm, based on their different cytokine profiles, was initially proposed by Mosman and Coffman<sup>20</sup> and later confirmed *in vivo* in *Leishmania major* infected murine models. For *Leishmania major*, it was shown that Th1 CD4<sup>+</sup> T cells control disease progression through high levels of IFN- $\gamma$  production. This activates antimicrobial mechanisms in macrophages associated with the development of host immunity and killing of parasites in the infection site, as observed in C57BL/6 mice.<sup>20,21</sup> In contrast, BALB/c mice develop a Th2 CD4<sup>+</sup> T-cell response that exerts an inhibitory effect on macrophage functions against *Leishmania*, thereby aggravating the infection, leading to nonhealing lesions.<sup>22–24</sup> In the case of *L. mexicana* infections, the immune response is regulated under different genetic controls.<sup>25</sup> Thus, both BALB/c and C57BL/6 mice infected with *L. mexicana* develop progressing nonhealing lesions, albeit with different severities. Whereas BALB/c mice produce higher levels of Th2-associated cytokines and show an enhanced susceptibility towards *L. mexicana*, C57BL/6 produce lower levels of Th2-associated cytokines, exhibiting an intermediate susceptibility with development of smaller lesions. Furthermore, C57BL/6 mice are able to control lymph node parasite replication and visceral dissemination more efficiently than BALB/c mice.<sup>24,27</sup>

The discovery of the third-effector T-helper cell (Th17 CD4<sup>+</sup>) has opened a new vision on immunopathogenesis of *Leishmania* infections. Th17 cells produce a variety of pro-inflammatory cytokines, the most prominent of which is IL-17A/F, which stimulate the production of other cytokines and chemokines such as CXCL8, an important attractant for neutrophils.<sup>28–31</sup> In leishmaniasis, the role of Th17 remains controversial due to contradictory results obtained in human samples, mouse models and *in vitro* studies. To further clarify the participation of Th17 cells and neutrophils in *Leishmania* infections in hosts with different genetic backgrounds, we studied these cells throughout three months in BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*.

The aim was to quantify the number of Th17 cells and neutrophils in skin lesions in an ear lobe infection model and analyse the distribution of neutrophils, CD4<sup>+</sup>/IL17<sup>+</sup> cells and parasites in the infected ear lobe tissues.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Mouse infection

BALB/c mice were bred and housed at the animal facilities of the Unidad de Investigación en Medicina Experimental of the Medical Faculty, UNAM, following the National Ethical Guidelines for Animal Health NOM-062-ZOO-199 and the guidelines recommended for animal care by the Ethical Committee of the Medical School of the National University Autonomous of Mexico (UNAM). A total of 264 female mice of 6 to 8 weeks of age (132 BALB/c as the "susceptible" strain and 132 C57BL/6 as the "semi-resistant" strain) were divided into four groups for each mouse strain: untreated group or the basal group (UT), mice with needle injury

(NI), mice injected with saline solution as the parasite vehicle (SS) and *Leishmania*-infected mice (LM). Each group consisted of three mice. Infection was made by intradermal inoculation of  $1 \times 10^5$  *Leishmania mexicana* promastigotes into ear lobes of mice anesthetized by inhalation with sevoflurane. Anesthetized mice were sacrificed by cervical dislocation in different post-infection times (days 0, 1, 4, 5, 7, 14, 28 and 90). Half of the ear lobe tissues were used for the flow cytometry analysis and the other half for the immunohistochemistry analysis.

Lesion development was monitored in BALB/c and C57BL/6 mice on weeks 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12 of the infection (additional mice were included for the detailed analysis of lesion growth). Lesion size was evaluated using a digital Vernier.

### 2.2 | Cell isolation

Ears were cut and treated with depilating cream for hair removal (Nair), washed and suspended in PBS supplemented with 4% antibiotics (Penicillin Streptomycin, Gibco, cat. 15070-063) for 10 min. Later, both dorsal and ventral skin layers of the ear lobes were separated and incubated in RPMI-1640 medium (Gibco, cat. 21875158) containing 0.01% collagenase (Sigma-Aldrich, Cat. C5138-1G) and supplemented with 10% FBS (foetal bovine serum—Gibco, cat. 10062139) in a water bath at 36°C during 90 min. The solution was passed through a 100- $\mu$ m cell strainer (BD Biosciences, Cat. 352360) and the remaining tissue was macerated with plungers of sterilized disposable syringes. The cell suspension was washed four times with cold PBS and centrifugated at 805 g before its quantitation in a Neubauer chamber.

### 2.3 | Flow cytometry

Cell quantification was carried out by flow cytometry. The following antibodies were used to detect cell surface and intracellular markers: PE Rat anti-mouse CD3 (Biolegend, Cat. No. 100206), FITC Rat anti-mouse CD4 (Biolegend, Cat. No.100406) and APC rat anti-mouse IL-17 (Biolegend, Cat. No.506916) for the Th17 cell panel. Rat anti-mouse neutrophil antibody (NIMP-R14) (Abcam, CatLab2557) and anti-rat IgG FITC (eBioscience, cat. 11-4811) were used as secondary antibody. Appropriately conjugated IgG antibodies were used as isotype controls and positive events were gated according to FMO (fluorescence minus one) controls.

For intracellular staining, ear lobe cells ( $1 \times 10^6$ ) were suspended in RPMI-1640 and incubated with Golgi Plug (BD Biosciences, Cat No. 555029) during 2 h at room temperature before the extracellular staining with antibodies against surface antigens (CD3/CD4 and NIMP-R14). Then, cells were fixed and permeabilized using Cytotfix/Cytoperm solution (BD Biosciences, Cat.No. 554722) at room temperature for 20 min. Cells were washed with Perm/Wash buffer (DB Biosciences, Cat No. 554723) and stained with antibodies directed against the intracellular cytokine IL-17A/F.

CD3<sup>+</sup> T cells were gated, and the percentages of CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> cells were detected. NIMP-R14<sup>+</sup> cells were gated in another panel.

Cell staining was analysed using a FACS Canto II BD system, and data analysis was performed using FACSDiva software (Becton Dickinson).

## 2.4 | Immunohistochemistry

Half of the total mice were used for the immunohistochemistry (IHC) analysis. Some tissues were fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin, and some others were freshly embedded in OCT compound (Tissue-Tek<sup>®</sup> SAKURA, Cat. 4538) and frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ , to perform the IHC protocol for paraffin and frozen samples. Sections were cut ( $5\ \mu\text{m}$ ) and mounted onto slianzed glass slides. Blocking of endogenous peroxidase was performed with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (J.T.Baker) diluted in methanol. Blocking of nonspecific binding was performed with 1% BSA (SIGMA). Immunodetection of CD4 (Santa Cruz, cat. sc13573L), IL-17 (Abcam, cat. Ab79056) and neutrophils (NIMP-R14) (Abcam, cat. ab2557) were performed by peroxidase staining technique. The secondary antibodies were biotin anti-rat anti-IgG for CD4 and NIMP-R14 and biotin goat anti-rabbit IgG (Zymed, cat. 62-1840) for IL-17 antibody to be later detected by the HRP-streptavidin conjugate (Invitrogen, cat. 434323) and then revealed with DAB (Dako, cat. K3468) and counterstained with haematoxylin/eosin with a final immersion in 0.2% ammonia water solution.

The possible presence of NETs was analysed by immunofluorescence using anti-cathepsin (LL-37 antibody (H-40): sc-50423) with secondary antibody in TRITC; anti-IL-17 (APC rat anti-mouse IL17, Biologend, Cat. No.506916), and the nuclear staining was carried out with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (SIGMA, Fluoroshield with DAPI, cat. F6057-20ML). The merge of all three markers was analysed by confocal microscopy.

The digital images from tissues were analyzed using light microscope and a colour AxioCam MRc5 camera (Zeiss, Oberkochen, Germany). Distribution of the markers on ear lobe tissues was analysed in triplicate using a 40x magnification.

Images from tissues processed by immunofluorescence staining technique were captured and analysed at 63x magnification by confocal microscopy (Leica TCS SPS).

## 2.5 | Statistical analysis

To evaluate the kinetics of Th17 cells and neutrophils during *Leishmania mexicana* infections, the total cell number was quantified and the percentages were obtained. The averages of the different cell groups were plotted in the graphs after the values were normalized to 1 (according to the values obtained from the UT group), to show the fold increase in cell numbers of each experimental group. For all graphs, data are presented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments, and *P* values of  $\leq 0.05$  were considered significant (\*\*\*\**P*  $\leq 0.0001$ , \*\*\**P*  $\leq 0.001$ , \*\* and \**P*  $\leq 0.05$ ).

Statistical analysis was performed using Prism 6 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The differences in frequency of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> T cells and NIMP-R14<sup>+</sup> cells (neutrophils) between the experimental and control groups (UT, NI, S5 and LM) at different time points (0, 1, 4, 5, 7, 14, 28 and 90 days

post-infection) were analysed by two-way ANOVA to establish statistical significance in combination with the indicated post hoc test (Tukey analysis for multiple comparisons).

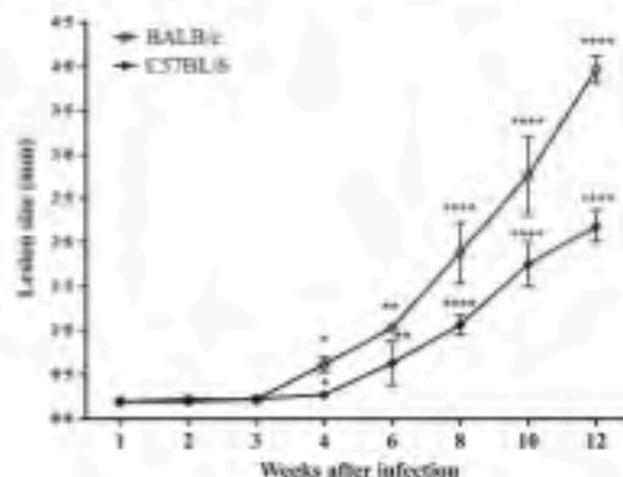
The degree of linear relation between Th17 cells and neutrophils per mouse strain was established by Pearson's correlation. To find the degree of association between these cell types, the correlation was performed by comparing the averages of Th17 cells and neutrophils in the infected groups throughout the infection in each mouse strain. Finally, Bonferroni test was performed to establish statistical differences between both strains (BALB/c vs C57BL/6) by comparing the values of each cell type (Th17 cells and neutrophils) from the infected groups of each strain in their respective day of evaluation.

To comparatively evaluate the lesion development between BALB/c and C57BL/6 mice, one-way ANOVA was performed comparing the ear lobe thickness (millimetres) of both infected strains (five mice per group per week) at different time points (1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks post-infection). This study was combined with the Bonferroni multiple comparisons test.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Lesion development in BALB/c- and C57BL/6-infected mice

Lesion development caused by  $1 \times 10^5$  *L. mexicana* infections was observed in both mice strains. Lesions were clinically visible as a small nodule that differed significantly between both mouse models after four weeks post-infection, being significantly larger in susceptible BALB/c, as compared to semi-resistant C57BL/6 mice (Figure 1). Experiments were stopped for ethical reasons once ulceration occurred or dissemination of lesions was evidenced in other regions of



**FIGURE 1** Ear lobe lesion development in BALB/c and C57BL/6 mice. The thickness of the ear lobe lesion was assessed by measuring (millimetres) the swelling of the infected ear lobes throughout 12 weeks of infection. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of five mice, and *P* values of  $\leq 0.05$  were considered significant (\*\*\*\**P*  $\leq 0.0001$ , \*\*\**P*  $\leq 0.001$ , \*\* and \**P*  $\leq 0.05$ )

the animal (it is noteworthy that dissemination was only observed in three of six BALB/c mice).

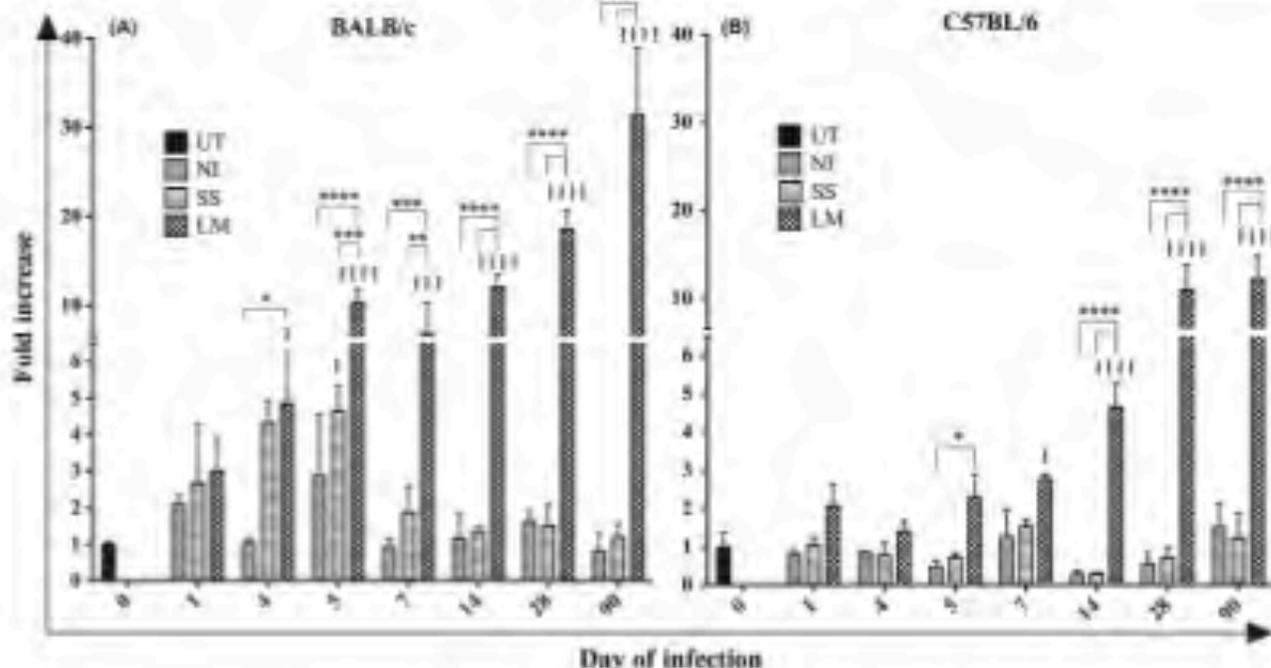
### 3.2 | *Leishmania mexicana* induces and sustains Th17 cell differentiation

A gradual continuous increase in Th17 cell numbers was observed in lesions of both mice strains infected with *Leishmania mexicana*, albeit their numbers differed importantly between the mouse strains. In BALB/c mice, Th17 cells began to increase significantly beginning on day 4 (4.8-fold), by day 28 they reached a 18.6-fold increase and by day 90 they had ascended to a 31.37-fold increase, as compared to the untreated group (UT) (Figure 2A). In C57BL/6 mice, a similar tendency was observed. Th17 cells showed an initial increase beginning on day 5 (2.29-fold), reaching a 10.97-fold increase by day 28 and a 12.19-fold increase by day 90 (Figure 2B). It is noteworthy that the increase in Th17 cells in all C57BL/6 groups was lower as compared to BALB/c mice. Taken together, these data show that BALB/c mice develop an intense inflammatory response beginning early after the infection with *Leishmania mexicana*, which is characterized by a steady increase in Th17 cells throughout disease progression into the chronic phase. The intensity of the Th17 response contrasted to that observed in C57BL/6 mice, where Th17 cell numbers remained similar in the lesions throughout the first and third months (days 28 and 90) post-infection (Figure 2B).

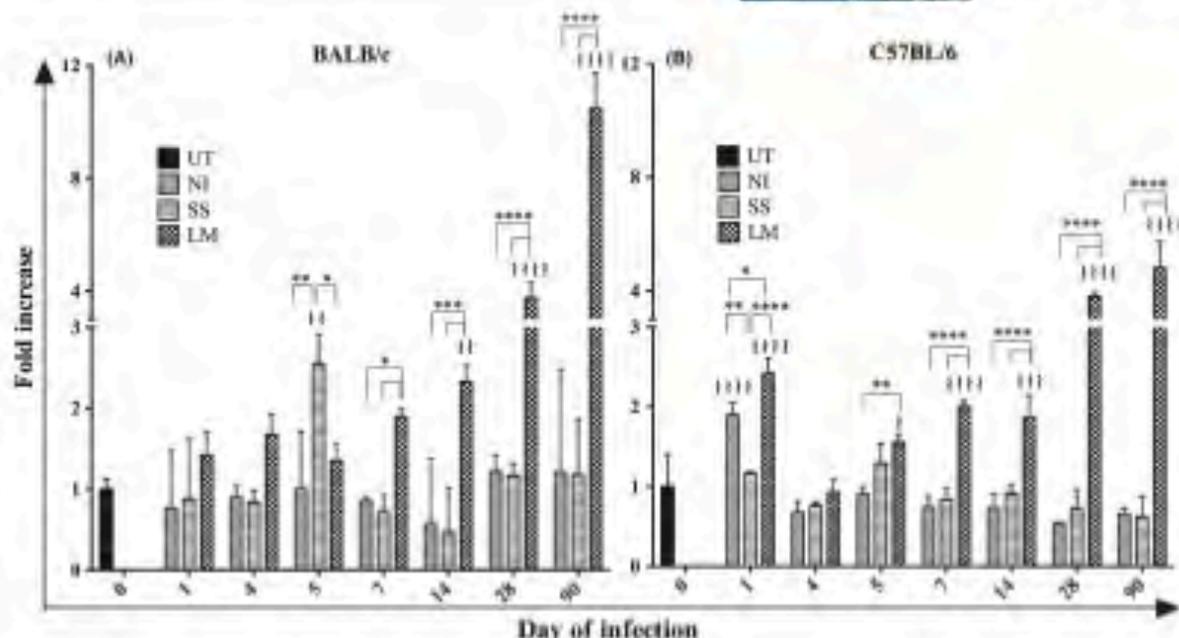
### 3.3 | Neutrophils infiltrate *L. mexicana*-infected tissues and remain there throughout the late phase of the infection, where more enhanced levels were found in the susceptible BALB/c strain

Throughout the infection period, neutrophils increased steadily in the damaged tissues. A significant increase was observed in infected C57BL/6 mice beginning on the first day postinfection (2.4-fold increase), as compared to the UT group. In BALB/c mice, the increase during the first day was not significant as compared with the UT group. Yet, as infection progressed, and especially in the late phase, neutrophil numbers increased in both strains, albeit it was more pronounced in BALB/c mice, as compared to C57BL/6 (Figure 3A,B). Between days 28 and 90 post-infection, neutrophil numbers were higher in BALB/c as compared to C57BL/6 mice. Thus, the fold increase in BALB/c on day 28 was 3.76 and on day 90 had ascended to a 10.47-fold increase. In contrast, C57BL/6 mice showed a 3.82-fold increase on day 28, which ascended to a 4.82-fold increase by day 90. Control groups of both strains reached similar neutrophil numbers as those expressed in the untreated groups, with the exception being a transient significant increase that was observed in the control group SS on day 5 in BALB/c and in the NI control group on day 1 in C57BL/6 mice, which remained unchanged throughout the rest of the study.

Taken together, neutrophils in C57BL/6 mice showed an earlier response towards *L. mexicana* (beginning on day 1 post-infection).



**FIGURE 2** Th17 cells in ear lobe skin of BALB/c and C57BL/6 mice. Kinetics of Th17 cells (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup>) in ear lobes of BALB/c (A) and C57BL/6 mice (B) infected with  $1 \times 10^7$  *L. mexicana* parasites (LM). Controls consisted of needle injury (NI), saline solution (SS) and untreated mice (UT). Bars show normalized values as compared to untreated controls (UT). Data are presented as the mean  $\pm$  SD of a triplicate, and P values of  $\leq 0.05$  were considered significant (\*\*\*\*P  $\leq$  .0001, \*\*\*P  $\leq$  .001, \*\* and \*P  $\leq$  .05). #H, #I, #J, #K, #L, #M, #N, #O, #P, #Q, #R, #S, #T, #U, #V, #W, #X, #Y, #Z represent the statistical significances of NI, SS and LM groups compared to the UT group



**FIGURE 3** Neutrophils in earlobe skin of BALB/c and C57BL/6 mice. Kinetics of neutrophils (NIMP-R14+) in ear lobes of BALB/c (A) and C57BL/6 mice (B) infected with  $1 \times 10^5$  *L. mexicana* parasites (LM). Controls consisted of needle injury (NI), saline solution (SS) and untreated mice (UT). Bars show normalized values as compared to untreated controls (UT). Data are presented as the mean  $\pm$  SD of a triplicate, and P values of  $\leq .05$  were considered significant: (\*\*\*\*)  $P \leq .0001$ , (\*\*\*)  $P \leq .001$ , (\*\*)  $P \leq .01$ , (\*)  $P \leq .05$ . #, ##, ###, ####, #####, H, HH, HHH, HHHH, HHHHH and I, II, III, IIII, IIIII represent the statistical significances of NI, SS and LM groups compared to the UT group

reaching their maximal numbers at the end of the study period (day 90), which contrasted with BALB/c mice, where neutrophil increase began more gradual, but reaching more elevated numbers throughout the study period.

### 3.4 | Pearson's analysis shows an association between Th17 cells and neutrophils during the chronic phase of *L. mexicana* infection

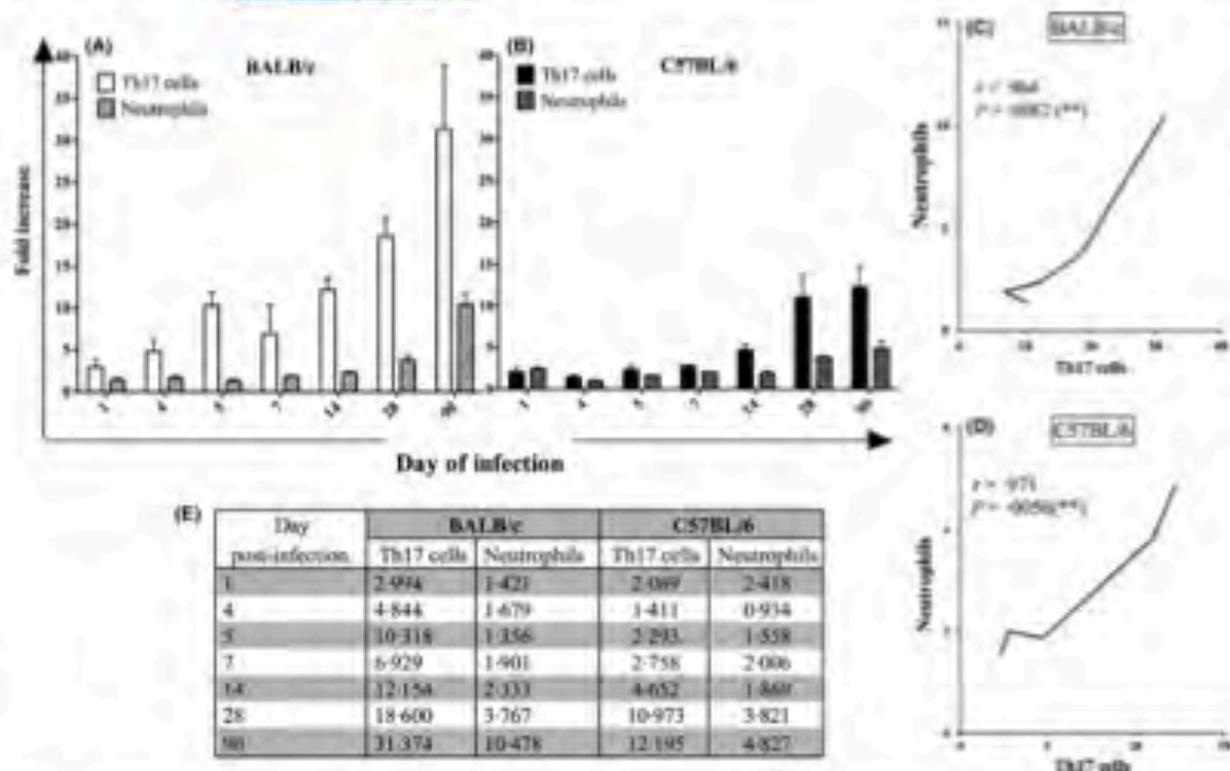
The association between Th17 cells and neutrophils in the lesions was not apparent during the initial phase of the infection, with exception of day 1 in C57BL/6 mice, where neutrophils showed a slight increase that was coincident with enhanced Th17 cell numbers. It was only after day 7 that an association between both cell types was observed, which lasted throughout the 90 days of disease evolution in both mouse strains. This parallel pattern of gradual increase of Th17 cells and neutrophils in *L. mexicana* lesions was evident in both mice strains; however, the maximal peak of both cells on day 90 was higher in BALB/c mice, as compared to C57BL/6. Taken together, these data show that C57BL/6 mice, which are more resistant to *L. mexicana* infections, also have a more reduced influx of Th17 cells and neutrophils into their lesions, as compared to the more susceptible BALB/c mice (Figure 4A,B).

A Pearson's correlation test, using normalized values of each cell type in both infected mouse strains, was performed to analyse a

possible linear correlation between the influx of Th17 cells and neutrophils on specific days throughout the disease development. The results show significant coefficients in both mouse strains:  $r = .964$   $P = .0082$  \*\* for BALB/c (Figure 4A,C) and  $r = .971$   $P = .0056$  \*\* for C57BL/6 mice (Figure 4B,D). Data used for this analysis are shown in the Table of Figure 4E.

### 3.5 | A comparative analysis of infiltration of Th17 cells and neutrophils into *L. mexicana* lesions shows an enhanced inflammatory response in BALB/c mice, especially during the chronic phase

To comparatively analyse the infiltration kinetics of Th17 cells and neutrophils into lesions infected with *L. mexicana* between BALB/c and C57BL/6 mice, the Bonferroni test was performed. BALB/c mice showed a significantly higher increase of Th17 cell infiltration into the lesions on days 5 and 90 post-infection, as compared to C57BL/6 mice. In neutrophils, this significant difference was evidenced on days 1, 4 and 90 post-infection (Figure 5), being higher in BALB/c mice. The only exception was found on the first day post-infection, where the neutrophil increase was higher in C57BL/6, as compared to BALB/c mice. The statistical significances between both mouse strains were higher during the chronic phase of the infection.



**FIGURE 4** Correlation of Th17 cells and neutrophils in each of the infected mouse strains. Bars show the average (mean)  $\pm$  SD of BALB/c (A) and C57BL/6 (B) mice on different days. The degree of linear relation between Th17 cells and neutrophils was established by Pearson's correlation, comparing the averages of Th17 cells and neutrophils in relation to disease evolution. Results showed significant coefficients in both strains:  $r = 0.964$   $P = 0.0082$  \*\* for BALB/c (C) and  $r = 0.971$   $P = 0.0056$  \*\* for C57BL/6 mice (D), demonstrating an important association between both types of cells as infection becomes chronic. Data used for graphs and Pearson's correlation are shown in the Table (E)

### 3.6 | Analysis by immunohistochemistry of CD4, IL-17 and neutrophil distribution in infected tissues on days 5 and 90 of infection

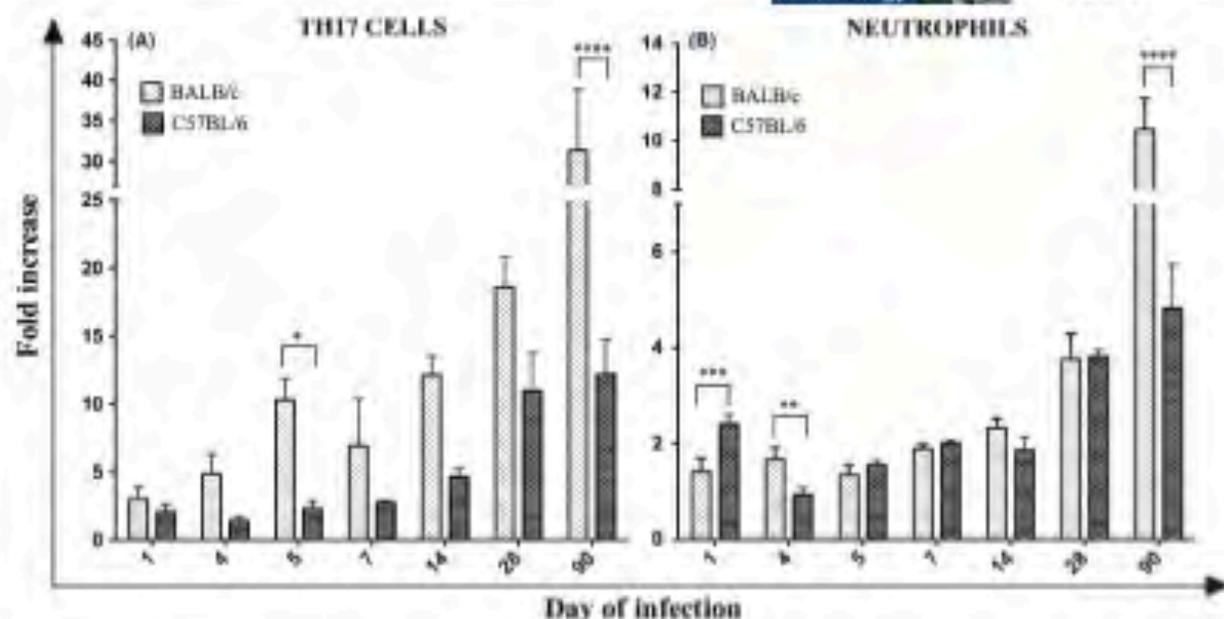
In basal conditions (untreated), BALB/c mice harbour few CD4+ cells in the epithelium, connective tissue and sebaceous glands, associated or not with hair follicles (due to the connective tissue capsule found in these glands) (Figure 6A). The expression of IL-17 was scant and only observed in some cells that were also positive for CD4 staining in the epithelium and dermis (Figure 6B). Neutrophils (NIMP-R14+ cells) were found in the dermis, yet some were also found near sebaceous/follicles glands, showing scant staining (Figure 6C).

In C57BL/6 mice, the expression of CD4 and NIMP-R14 in basal conditions (untreated) was similar to that of BALB/c (Figure 7A,C). However, in C57BL/6 mice the expression of IL-17 was augmented in the epithelium and was not always coincident with CD4+ cells, suggesting that IL-17 is not only produced by T cells but also by other epithelial cells in basal conditions (Figure 7B). The other noninfected controls (needle injuries [NI] or injection of saline solution [SS]) showed diminished CD4, IL-17 and NIMP-R14 expressing cells, similar to untreated tissues (data not shown).

The infected tissues were analysed on days 5 and 90 post-infection. On day 5 of infection, expressions of both CD4 and IL-17 augmented in the same areas of the epithelium and connective tissues in both mouse strains, although a stronger positive mark was found in BALB/c lesions (Figure 6D,E), as compared to lesions of C57BL/6 mice (Figure 7D,E). The distribution of neutrophils (NIMP-R14+) was similar in both mice strains, where they were found exclusively in the connective tissue layer of the ear lobes (Figures 6F and 7F).

By day 90, the inflammatory response was enhanced in infected tissues of both mouse strains. The lesions of BALB/c (Figure 6G-I) and C57BL/6 (Figure 7G-I) mice showed a high expression of IL-17, which coincided with areas of CD4+ cells and NIMP-R14+ cells within the chronic inflammatory infiltrate. Taken together, the data observed by immunohistochemistry staining confirm the results obtained by flow cytometry, both of which show an abundance of Th17 cells and neutrophils in the *L. mexicana*-infected tissues importantly during the chronic phase of the disease.

Samples from day 28 are not presented, as the histological features are microscopically similar to those of day 90 post-infection in both infected strains.



**FIGURE 5** Fold increase of Th17 cells (A) and neutrophils (B) in infected ears of BALB/c and C57BL/6 mice infected with  $1 \times 10^7$  *L. mexicana* parasites. Bars show normalized values as compared to the untreated control (UT). Data are presented as the mean  $\pm$  SD of a triplicate, and P values of  $\leq 0.05$  were considered significant (\*\*\*\* $P \leq 0.0001$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* and \* $P \leq 0.05$ ). Comparisons were performed with Bonferroni test, and statistical significance was observed on days 5 (\*) and 90 (\*\*\*\*) post-infection in the case of Th17 cells, and for neutrophils, this significance was appreciated on days 1 (\*\*\*), 4 (\*\*) and 90 (\*\*\*\*) post-infection

### 3.7 | Histological structures resembling NETs in chronic lesions

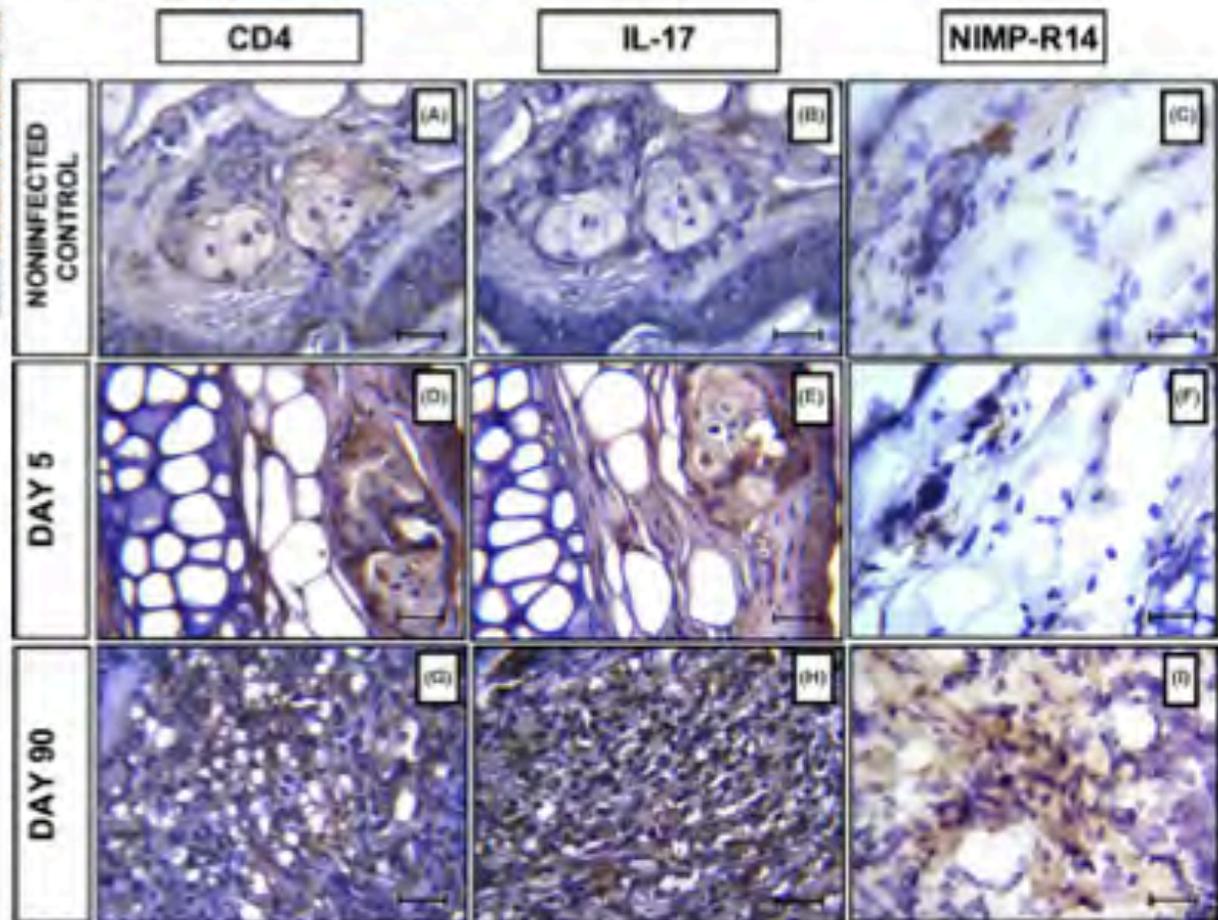
Numerous *L. mexicana* parasites were found mainly within parasitophorous vacuoles (PV) and less often dispersed freely in the cellular infiltrate of the stroma after 28 days of infection. It was possible to appreciate histological structures resembling NETs in chronic lesions, where some cells showed lobulated nuclei distinctive of neutrophils releasing extracellular traps, that retained numerous parasites in some areas of the infected tissues (Figure 8A). However, as NETs are hard to differentiate from PV in tissues, more detailed studies were added to determine their presence in the infected skin. We therefore performed immunofluorescent staining to identify the nuclei, cathelicidin and *act17* and their co-localization in both mouse strains. It was possible to appreciate thin and long structures composed mostly of genetic material, which seemed to extrude from some nuclei, that were visualized with DAPI staining (Figure 8B-1,D-1). Furthermore, the expressions of IL-17 (Figure 8B-3,D-3) and cathelicidin (Figure 8B-2,D-2) co-localized within NETs that harboured some *L. mexicana* parasites (Figure 8B-4,D-4,B-5,D-5). It is noteworthy that, as DAPI stains DNA of the cells as well as that of parasites, the capture of images of the small parasite nuclei by confocal microscopy was overshadowed by the more intense fluorescent staining of the cellular nuclei. Taken together, our results showed the presence of NETs in chronic lesions of *L. mexicana*-infected BALB/c and C57BL/6 mice.

## 4 | DISCUSSION

To the best of our knowledge, there are no comparative studies on the combined responses of Th17 cells and neutrophils during the initial acute and chronic phases of *Leishmania mexicana* infections in susceptible BALB/c and the semi-resistant C57BL/6 mouse strains. We here analysed the kinetics of tissue infiltration by Th17 cells and neutrophils into ear lobe lesions of *L. mexicana* infections in BALB/c and C57BL/6 mice between 24 h and 90 days of infection. Previous studies on the role Th17 cells and neutrophils in *Leishmania* infections have analysed each of these cells individually, revealing contradictory data on their role in the physiopathogenesis of the disease. These discrepancies motivated us to do a correlation study between the two cell types in two mouse models with a different genetic background.

Neutrophils have been associated with both disease exacerbation and disease control, depending on the genetic background of the host as well as the parasite strain. In BALB/c mice, susceptibility to *Leishmania* has been shown to correlate with enhanced reactive oxygen species (ROS) production by neutrophils, whereas the semi-resistant C57BL/6 mice express an allelic mutation of the P2X7 receptor that is responsible for lower ROS production, lower IL-1 $\beta$  secretion and attenuated NLRP3 inflammasome activation.<sup>20–24</sup> Furthermore, different neutrophil phenotypes with varied TLR2, TLR7, TLR9 expressions as well as IL-12p70 and IL-10 productions have been reported in BALB/c and C57BL/6 mouse strains infected with *Leishmania major*. Whereas neutrophils of C57BL/6 mice produced elevated levels of

LOW RESOLUTION COLOUR FIG



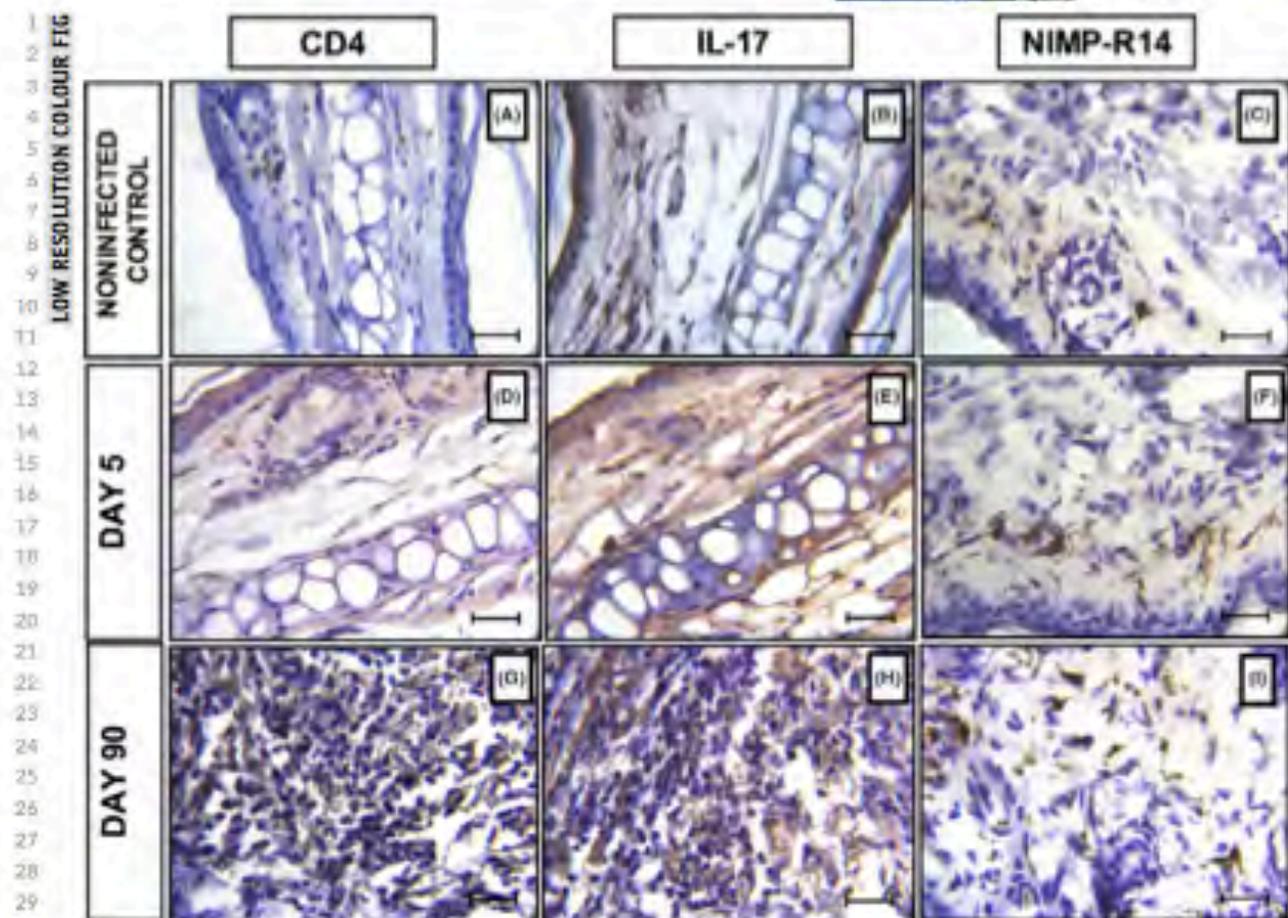
**FIGURE 6** Immunohistochemical analysis of CD4, IL-17 and neutrophils (NIMP-R14) in ear lobes of BALB/c mice after different conditions. Images A, B and C correspond to untreated controls, showing the basal expressions of CD4, IL-17 and NIMP-R14. Images D, E and F show tissues after 5 days of infection. Elevated expressions of CD4 and IL-17 in epithelium and connective tissue are evidenced, coinciding in the same areas. Images G, H and I show staining after 90 days of infection. A clear increase of CD4, IL-17 and NIMP-R14 is evidenced within this cellular infiltrate. Brown staining shows positive cells [revealed by peroxidase]. Magnification of 40 $\times$ . Scale bar=50  $\mu$ m

both cytokines, BALB/c neutrophils did not secrete the active form IL-12p70, thereby hampering parasite control.<sup>37</sup> Neutrophils are the most abundant circulating immune cells that rapidly infiltrate infections or sites of sterile tissue damage harbouring nonharmful host products, including nucleic acids.<sup>38</sup> In *Leishmania* infections, they are recruited between 6 and 24 h post-infection, showing phagocytosed parasites as soon as 1–12 h after infection. Together with their phagocytic and lytic mechanisms, these cells also employ neutrophil extracellular traps (NETs) as a defence mechanism against extracellular and intracellular pathogens, such as *L. amazonensis* infections, and where NETosis has been shown to limit the parasite infection.<sup>39–41</sup> Yet neutrophils can also lead to local vascular reaction and tissue injury through ROS generation, protease production as well as secretion of cytokines, chemokines, prostaglandins, leucotrienes and NETs.<sup>42–44</sup> Our current data are in accordance with the literature, where we found that in addition to neutrophils (NIMP-R14+ cells) and abundant CD4+ T cells expressing IL-17 in areas harbouring numerous *L. mexicana* amastigotes, the

formation of NETs was evidenced in tissues chronically infected with *Leishmania mexicana*. NETs were confirmed through immunofluorescence, showing the presence of extracytoplasmic DNA structures by DAPI staining in association with IL-17 and cathelicidin. The combined presence of these molecules has been described as being characteristic for NETs.<sup>50–52</sup>

NETs have been associated with tissue injury through IL-1 $\beta$  and IL-17 production, a mechanism by which neutrophils regulate Th17 cells and sustain chronic inflammation.<sup>53,54</sup> Thus, neutrophils represent a double-edged sword that not only contributes to acute inflammation and pathogen clearance, but also to inflammatory chronicity and tissue damage.<sup>55</sup>

Our results now show that neutrophils not only increase during the acute phase of *Leishmania mexicana* infections, but even more importantly so during the chronic phase of the infection, where they increase, concomitantly with Th17 cells, throughout disease progression. It is noteworthy that this response was significantly enhanced



**FIGURE 7** Histological and immunohistochemical analysis of ear lobe skin of C57BL/6 mice. Immunohistochemical analysis of CD4, IL-17 and neutrophils (NIMP-R14) in ear lobes of C57BL/6 mice after different conditions. Images A, B and C correspond to untreated controls, showing the basal expressions of CD4, IL-17 and NIMP-R14. Images D, E and F show tissues after 5 days of infection. Elevated expressions of CD4 and IL-17 in epithelium and connective tissue are evidenced, coinciding in the same areas. Images G, H and I show staining after 90 days of infection. A clear increase of CD4, IL-17 and NIMP-R14 is evidenced within this cellular infiltrate. Brown staining shows positive cells (revealed by peroxidase). Magnification of 40 $\times$ . Scale bar=50  $\mu$ m

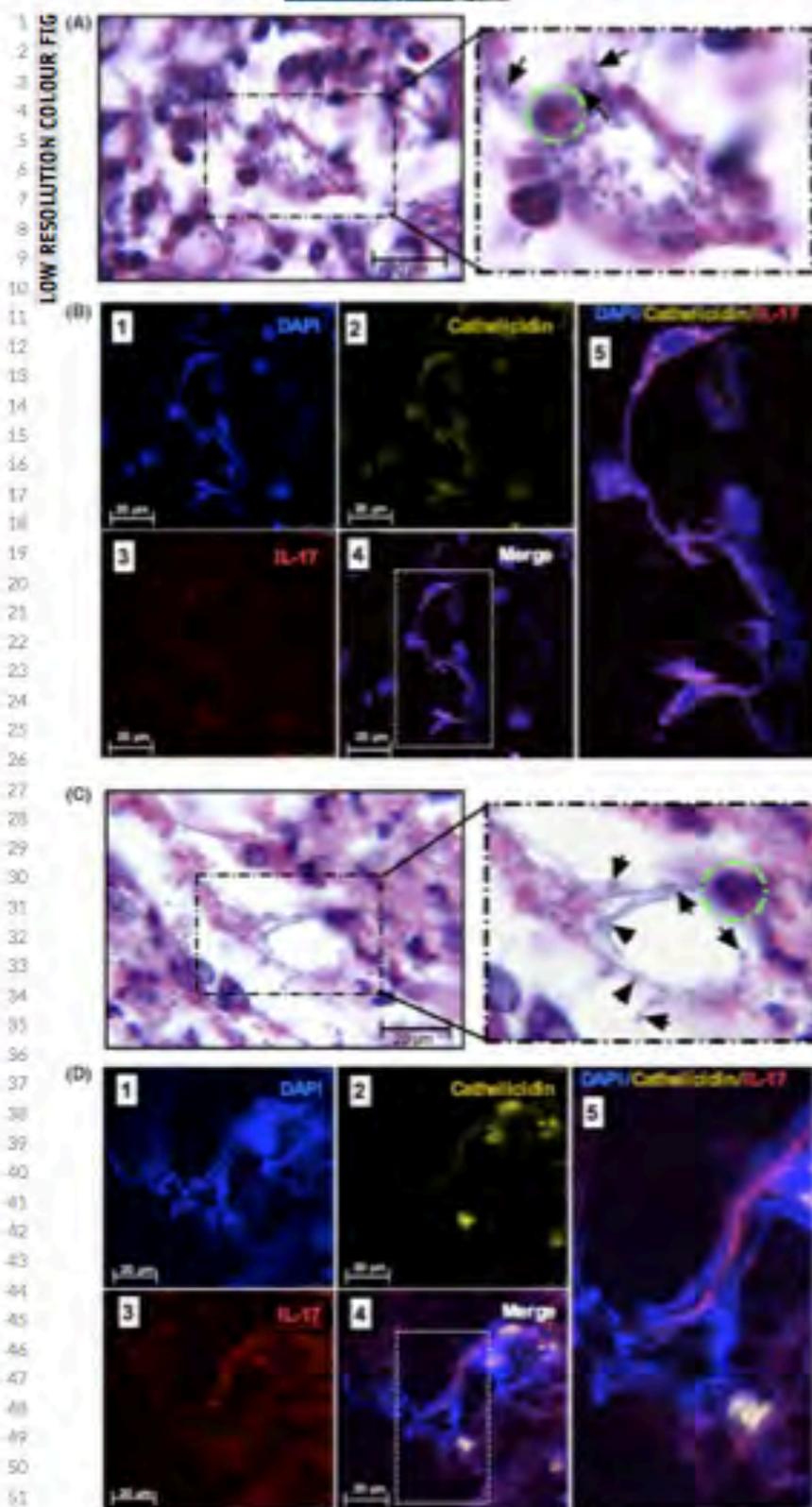
in susceptible BALB/c, as compared to the more resistance C57BL/6 mouse strain.

The transient neutrophil increase observed on day 5 in BALB/c mice receiving only saline solution could possibly be attributed to the sodium chloride contained in the solution used as vehicle for the parasite. It has been shown that sodium chloride induces a Th17-cell differentiation<sup>54</sup> and as Th17 cells also increased significantly on day 5 in BALB/c mice, their mediators could be responsible for the neutrophil recruitment at the infection site in these mice.

Taken together, neutrophils link the innate and adaptive immune responses through their cytokine and chemokine productions as well as their role as APCs, capable of directing T-cell responses, including Th17 cells.<sup>57,58</sup> Th17 cells are other key inflammatory cells due to their production of highly pro-inflammatory cytokines such as IL-17 (IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$ , IL-6, which are capable of stimulating NOS-2 and metalloproteinases in various cell types.<sup>26–31,59,60</sup> In

leishmaniasis, the role of Th17 cells remains controversial. In patients infected with *L. braziliensis*, Th17 cells have been shown to exacerbate tissue damage and the positive correlation between IL-17 and IFN- $\gamma$  mRNA expression suggested that Th17 and Th1 cells act together inducing immune-mediated tissue damage in these patients.<sup>51,62</sup> On the other hand, Th17 cells have also been reported to mediate the clearance of *Leishmania donovani* in association with activation of Th1 cells. In this case, the proposed mechanism was attributed to IFN $\gamma$  production by Th1 cells, which downregulates the Th17 response after the infection was controlled, thereby preventing tissue damage.<sup>59</sup>

Yet a more clear demonstration on the role of Th17 cells in causing severe inflammatory damage by recruiting neutrophils was achieved in *L. major* and *L. braziliensis* infections, using IL-17<sup>-/-</sup> BALB/c mice, which showed more resistance to the infection.<sup>63,64</sup> This was also confirmed in IL-17<sup>-/-</sup> C57BL/6 mice that were highly resistant to visceral leishmaniasis caused by *L. donovani*.<sup>65</sup> The role of Th17 cells in



**FIGURE 8** The presence of NETs in chronic ear lobe lesions of *L. mexicana*-infected C57BL/6 and BALB/c mice. Images A and C show H&E staining of ear lobe lesions from infected C57BL/6 (A) and BALB/c (C) mice after 90 days post-infection. Histological structures possibly resembling NETs are shown in the selected dot box, where a cell with lobulated nucleus (green dot circle) and cytoplasmic extensions containing numerous *L. mexicana* amastigotes (black arrows) can be found. Magnification of 100 $\times$ . Scale bar=20  $\mu$ m. Images B and D show immunofluorescence staining of infected C57BL/6 (B) and BALB/c (D) ear lobes (90 DPI) showing co-localization of cathelicidin, IL-17 and DNA in a large histological structure with cytoplasmic extensions composed mainly of genetic material. The upper left panel (B1/D1) shows the DNA staining (DAPI), the upper middle panel (B2/D2) shows the cathelicidin stained with TRITC and observed in yellow colour in the image, the lower left panel (B3/D3) shows the IL-17 stained with APC in red colour and the lower middle panel (B4/D4) shows the merge of both stains in pink colour. The magnified image of the merged staining (B5/D5) shows the cytoplasmic extensions composed of DNA that seem to extrude from the nucleus and that co-localize with cathelicidin and IL-17 within NETs. The photographs were taken with a confocal microscopy. Magnification of 60 $\times$ . Scale bar=20  $\mu$ m

leishmaniasis seems related to the genetic background of the host. Thus, in C57BL/6 mice infected with *L. major*, Th17 cells have been associated with a protective role due to enhanced cell proliferation, recruitment of neutrophils and alternatively activated macrophages, preventing lesion development.<sup>26,27</sup> Contradictory data were found in BALB/c mice that showed an association between Th17 and Th2 cells with elevated production of IL-4, IL-5, IL-13 and IL-17, exerting an inhibitory effect on leishmanicidal mechanisms of macrophages and thereby aggravating the infection.<sup>11,22,28,29</sup> In accordance with observations on Th17 cells, also the role of IL-17 differs according to the genetic background of the host. Thus, in BALB/c mice this cytokine was shown to be associated with disease progression, whereas in C57BL/6 mice it has been shown to contribute to disease control.<sup>35,36</sup>

Our results now add novel information that help shed light into the apparently contradicting reports on Th17 and neutrophils in leishmaniasis, as we analysed both cell types simultaneously in two mouse strains with different genetic backgrounds: the susceptible BALB/c mouse and the semi-resistant C57BL/6 mouse. We show that in addition to neutrophils, there are also a concomitant and continuous Th17 cell differentiation and recruitment into the infected tissues throughout the disease evolution. Although both Th17 cells and neutrophils steadily increase throughout *Leishmania mexicana* infections, their numbers differ importantly between susceptible BALB/c mice and the more resistant C57BL/6 mouse strain. This differential increase in both cell types becomes very apparent once the infection has evolved to chronicity, where significantly higher numbers of Th17 and neutrophils are recruited into the lesions in the susceptible BALB/c strain on day 90 post-infection, as compared to C57BL/6 mice. It is noteworthy that the enhanced cell numbers also correlated with the enhanced lesion sizes in BALB/c, as compared to C57BL/6 mice.

With these data, we are tempted to speculate that the importantly enhanced numbers of neutrophils and Th17 cells in chronic infections of BALB/c mice cause uncontrolled inflammation, aiding parasite spread and possibly contributing to the susceptibility of this mouse strain to *Leishmania mexicana* infections. In contrast, the more controlled response of these cells in C57BL/6 mice possibly relates to the more resistant profile of this mouse strain. Although Th17 cells are one of the main IL-17 cytokine producers, we cannot rule out the possibility that other IL-17-producing cells possibly act in concert to create a favourable environment for parasite replication and dissemination that aggravates the disease outcome.

Even though more data are needed to gain a thorough insight into the pathogenesis of leishmaniasis, the results obtained from our study possibly indicate that the uncontrolled inflammation in the chronic phase due to intense infiltration of Th17 cells and neutrophils in *L. mexicana* infections possibly repercuts on disease susceptibility and severity in the BALB/c mouse strain.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This project was financed by PAPIIT IN217515 and CONACYT 221405. Claudia Patricia Pedraza Zamora is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de

la Salud of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship 216344 from CONACYT. We are thankful to M.C. Rocely Cervantes Sarabia for the parasite cultures and C.D. María José Gómora Herrera for the technical help in the confocal microscopy.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors state that they have no conflict of interests of any kind regarding the manuscript.

#### AUTHOR CONTRIBUTION

CPPZ performed the research, analysed the data and wrote the paper. JDD collaborated in the flow cytometry procedure. JZC contributed in the analysis of confocal microscopy and flow cytometry. IB designed the research study and corrected the paper.

#### REFERENCES

- World Health Organization - Fact sheet 375: Leishmaniasis [homepage on the internet]. WHO; c2016 (updated September 2016). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Accessed May 2016.
- Bates P. Transmission of leishmania metacyclic promastigotes by oropharyngeal sand flies. *Int J Parasitol*. 2007;37:1097-1106.
- Fisser Steinbruch A, Pérez Tamayo R. Leishmaniasis (capítulo escrito por Ingeborg Becker). En: *Aprendizaje de la parasitología basado en problemas*. 1ª edición. México: Editorial Manual Moderno; 2006. P294-409.
- Dejaux P, Ghosh RS, Dhalaria P, Strub-Wourgaft N, Zizina EE. Report of the Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) Consortium Meeting, New Delhi, India, 27-29 June 2012. *Parasit Vectors*. 2013;6:196.
- López-Céspedes A, Longoni SS, Sauri-Arceo CH, et al. Leishmania spp. epidemiology of canine leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. *Sci World J*. 2012;777:777-777. ID article:945871, doi:10.1100/2012/945871.
- Vinetz JM, Soong L. Leishmania mexicana infection of the eyelid in a traveler to Belize. *Braz J Infect Dis*. 2007;11:149-152.
- WHO Leishmaniasis in Guatemala [database in the Internet]. WHO. <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/GUATEMALA.pdf>. Accessed May 2016.
- Cedillo RA, Romero JE, Romero CJ, Gavida ME. Leishmaniasis en el Salvador. *Minerva Revista en línea CIC-UES*. Enero-Julio. 2014;4:33-44.
- Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis en las Américas Recomendaciones para el tratamiento [database in the Internet]. Washington D.C.: OPS; c2013. [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Leishmaniasis-Tratamiento-Américas-2013-Guia\\_OPS.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Leishmaniasis-Tratamiento-Américas-2013-Guia_OPS.pdf). Accessed May 2016.
- Kedzierski L. Leishmaniasis vaccine: where are we today? *J Glob Infect Dis*. 2010;2:177-185.
- Nylen S, Gautam S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2010;2:135-146.
- Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of leishmania: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol*. 2012;28:335-344.
- Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2011;90:271-284.
- Filardy AA, Pires DR, DosReis GA. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to leishmania infection. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:1863-1870.

15. Peters NC, Sacks DL. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol*. 2009;11:1290-1296.
16. Charroy M, Brunner-Agten S, Aebischer D, et al. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of leishmania major inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1000755.
17. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for leishmania major and other intracellular microbes? *Respir Microbiol*. 2003;11:210-214.
18. Freitas-Lopes M, Costa-da-Silva AC, Alexandre DG. Innate immunity to leishmania infection: within phagocytes. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:17771-17771. Article ID 754956.
19. Zhu J, Yamano H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445-489.
20. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-173.
21. Lohoff M, Gessner A, Bogdan C, Röllinghoff M. Experimental murine leishmaniasis and the Th1/Th2 cell concept. *Tokai J Exp Clin Med*. 1998;23:347-350.
22. Becker I, Salazar N, Aguirre M, et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;130:65-74.
23. Ashok D, Schuster S, Ronet C, et al. Cross-presenting dendritic cells are required for control of leishmania major infection. *Eur J Immunol*. 2014;44:1422-1432.
24. Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of leishmania major infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol*. 2000;165:969-977.
25. Alexander J, Kaye PM. Immunoregulatory pathways in murine leishmaniasis: different regulatory control during *Leishmania mexicana mexicana* and *Leishmania major* infections. *Clin Exp Immunol*. 1985;61:674-682.
26. Aguilar TF, Lambert MA, Laman JD, et al. Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66:273-279.
27. Rosas L, Kessler T, Barón J, et al. Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *Int Immunol*. 2005;17:1347-1357.
28. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517.
29. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal development of pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441:235-238.
30. Roark CL, Simonian PL, Fontana AP, Bern WK, O'Brien KL. gamma-delta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:353-357.
31. Bacellar O, Faria D, Nascimento M, et al. IL-17 Production in patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2009;200:75-78.
32. Adriouch S, Dix D, Weige V, et al. Cutting edge: a neutral P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol*. 2002;169:4108-4112.
33. Shio MT, Christian JG, Jiang JY, Chang K-P, Olivier M. PKC/Ros-mediated NLRP3 inflammasome activation is attenuated by leishmania zinc-metalloprotease during infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0003868.
34. Iziko M, Ferrar J, Eitzhig HK. Nucleotide signaling during inflammation. *Nature*. 2014;509:310-317.
35. Karmakar M, Katsnelson MA, Duzysak GK, Pearlman E. Neutrophil P2X<sub>7</sub> receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-18 secretion in response to ATP. *Nature*. 2016;7:10655.
36. Horta MF, Pinheiro Mendes B, Roma EH, et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol Res*. 2012;7777:7777-7777. Article ID 203818. 11 pages. doi:10.1155/2012/203818.
37. Charroy M, Megreou R, Alerbach C, et al. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol*. 2007;82:288-299.
38. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, et al. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*. 2015;11:e1004651.
39. Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002536.
40. Sousa LM, Carneiro MB, Resende ME, et al. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite Immunol*. 2014;36:13-31.
41. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:6748-6753.
42. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation and beyond. *J Exp Med*. 2013;210:1283-1299.
43. Summers C, Ransin SM, Condit AM, et al. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010;31:318-324.
44. Iba T, Hashiguchi N, Nagao K, Tabe Y, Mura M. Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *J Intensive Care*. 2013;3:13.
45. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 2009;30:513-521.
46. Dieli S, Banchereau J, Pascual V. Neutrophils come of age in chronic inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2012;24:671-677.
47. Hoenderdijk K, Condit AM. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48:531-539.
48. Wright HL, Moots RJ, Bucknall HC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. 2010;49:1618-1631.
49. Segel GB, Halperin MW, Lichtman MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol*. 2011;89:359-372.
50. Nobuhiro DD, Jackson R, Grasemann H, Palaniyar N. Innate immune collectin surfactant protein d simultaneously binds both neutrophil extracellular traps and carbohydrate ligands and promotes bacterial trapping. *J Immunol*. 2011;187:1856-1865.
51. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol*. 2011;187:490-500.
52. Chrysanthopoulou A, Mitrakis I, Apostolidou E, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol*. 2014;233:294-307.
53. Löfgren T, Margal S, Albrichter J, et al. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med Microbiol Immunol*. 2009;198:211-219.
54. Wamtsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps license macrophages and Th17 cells for cytokine production in atherosclerosis. *Science*. 2015;349:316-320.
55. Kolaczowska E, Kuberski P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:159-175.
56. Kleinewietfeld M, et al. Sodium chloride drives autoimmunity disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013;496:518-522.
57. Silva MT. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. *J Leukoc Biol*. 2010;87:805-813.
58. Abi Abdalan DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol*. 2011;23:317-326.
59. Pyla M, Romano A, Cabartosa S, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest*. 2009;119:2375-2387.

- 1 60. Evans HG, Gaffr NJ, Kelly S, et al. In vivo activated monocytes from  
2 the site of inflammation in humans specifically promote Th17 re-  
3 sponses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:4232-4237.
- 4 61. Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, et al. Human mucosal leish-  
5 maniasis neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high  
6 levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol*. 2010;40:2830-2836.
- 7 62. Oliveira WN, Ribeiro LE, Schieffer A, et al. The role of inflammatory  
8 and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegu-  
9 mentary leishmaniasis. *Cytokine*. 2014;66:127-132.
- 10 63. Khader SA, Gaffen SL, Kolis JK. Th17 cells at the cross roads of innate  
11 and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol*. 2009;2:403-411.
- 12 64. Canoso R, Fina D, Paoluzi OA, et al. IL-23-mediated regulation of IL-  
13 17 production in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Eur J*  
14 *Immunol*. 2008;38:470-478.
- 15 65. Lopez Koslka S, Dinges S, Griewank K, et al. IL-17 promotes pro-  
16 gression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol*.  
17 2009;182:3039-3046.
- 18 66. Terrazas C, Varikuti S, Kimble J, et al. IL-17A promotes susceptibility  
19 during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania don-*  
20 *ovani*. *FASEB J*. 2016;30:1135-1143.
- 21 67. Wu W, Huang L, Mendez S. A live *Leishmania* major vaccine con-  
22 taining CpG motifs induces the de novo generation of Th17 cells in  
23 C57BL/6 mice. *Eur J Immunol*. 2010;40:2517-2527.
- 24 68. Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Junior DS, et al. Interleukin 17A  
25 acts synergistically with interferon  $\gamma$  to promote protection against  
26 *Leishmania infantum* infection. *J Infect Dis*. 2015;211:1015-1026.

How to cite this article: Pedraza Zamora CP, Delgado-Dominguez J, Zamora-Chimal J, Becker J. Th17 cells and neutrophils: Close collaborators in chronic *Leishmania mexicana* infections leading to disease severity. *Parasite Immunol*. 2017;00:e12420. <https://doi.org/10.1111/pim.12420>

UNCORRECTED PROOF

## REFERENCIAS

1. World Health Organization -Fact sheet 375: Leishmaniasis [homepage on the internet]. WHO; c2016 [updated September 2016; cited May 2016]. Available on: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
2. Flisser Steinbruch A, Pérez Tamayo R. Leishmaniosis (capítulo escrito por Ingeborg Becker). En. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas.1ª edición. México: Editorial Manual Moderno; 2006. P.394-409.
3. Desjeux P, Ghosh RS, Dhalaria P, Strub-Wourgaft N, Zijlstra EE. Report of the Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) Consortium Meeting, New Delhi, India, 27-29 June 2012. *Parasit Vectors*. 2013, 6:196.
4. López-Céspedes A, Longoni SS, Sauri-Arceo CH, et al. Leishmania spp. epidemiology of canine leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. *Scientific World Journal*. 2012. ID article:945871, doi:10.1100/2012/945871.
5. Vinetz JM, Soong L. Leishmania mexicana infection of the eyelid in a traveler to Belize. *Braz J Infect Dis*. 2007; 11 (1): 149-152.
6. WHO Leishmaniasis in Guatemala [database in the Internet]. WHO [cited May 2016]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/GUATEMALA.pdf>
7. Cedillos RA, Romero JE, Romero Chévez JE, Gavidia ME. Leishmaniasis en el Salvador. *Minerva Revista en línea CIC-UES*. Enero-Julio 2014 Vol. 4: 33-44.
8. Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis en las Américas Recomendaciones para el tratamiento [database in the Internet]. Washington D.C.: OPS; c2013 – [cited May 2016]. Available from: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Leishmaniasis-Tratamiento-Américas-2013-Guia\\_OPS.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Leishmaniasis-Tratamiento-Américas-2013-Guia_OPS.pdf)
9. Bates P. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10): 1097-106.
10. Kedzierski L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today?. *J Glob Infect Dis*. 2010 May; 2(2):177-85. doi: 10.4103/0974-777X.62881.
11. Nylen S, Gautam S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2010 May; 2(2): 135-46. doi: 10.4103/0974-777X.62876.
12. Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol*. 2012 Aug; 28(8):335-44. doi: 10.1016/j.pt.2012.05.002.
13. Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2011; 90(2):271-84. doi: 10.1189/jlb.0810457.
14. Filardy AA, Pires DR, DosReis GA. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to Leishmania infection. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Jun; 68(11):1863-70. doi: 10.1007/s00018-011-0653-2.
15. Peters NC, Sacks DL. The impact of vector mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol*. 2009 Sep; 11(9): 1290–96.
16. Charmoy M, et al. The Prominent Role of Neutrophils during the Initial Phase of Infection by Leishmania Parasites. *J Biomed Biotechnol*. 2010, Article ID 719361, 1-8 pp.
17. Freitas-Lopes M, Costa-da-Silva AC, Alexandre DosReis G. Innate Immunity to Leishmania Infection: Within Phagocytes. *Mediators Inflamm*. 2014. Article ID 754956.
18. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989; 7:145-73. DOI: 10.1146/annurev.iy.07.040189.001045.
19. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Aug; 130(2): 65-74.
20. Ashok D, Schuster S, Ronet C, et al. Cross-presenting dendritic cells are required for control of Leishmania major infection. *Eur J Immunol*. 2014 May. 44(5):1422–32. doi: 10.1002/eji.201344242.
21. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:485-517. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
22. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: The third member of the effector T cell Trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19(6): 652-7.

23. Velasco-Castrejón O. Las Leishmaniasis con especial referencia a México. Publicación Técnica no. 4. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 1994. II Edición.
24. Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol*. 2002;124:495–507.
25. Brodie TM, Smith MC, Morris RV, Titus RG. Immunomodulatory Effects of the *Lutzomyia longipalpis* Salivary Gland Protein Maxadilan on Mouse Macrophages. *Infect Immun*. 2007; 75(5): 2359-65.
26. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*. 2003; 11(5): 210 – 14.
27. InDRE: Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica de Leishmaniasis por Laboratorio. Secretaría de Salud, México.DGE-InDRE– RNLSP. [homepage on the internet]. InDRE;c2015. (Recopilación de datos 2007 - 2011).
28. Handman E, Bullen DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol*. 2002 Aug;18(8):332-4.
29. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*. 1999 May-Jun;17(3):279-89.
30. Lane RP, Crosskey RW. Medical insects and arachnids. London: Chapman and Hall, 1993; p. 78-119.
31. Nieves E, Rondon M. Sobrevivencia del parásito *Leishmania* en el insecto vector: interacciones moleculares. *Rev Soc Ven Microbiol*. [Internet]; 27(2): 66-72. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562007000200003&lng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562007000200003&lng=es).
32. Secundino NF, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PF. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J Med Ent*. 2005;42:928–938.
33. World Health Organization (WHO)[Sede Web]. Suiza: 2010 [Acceso 2010]. Health topics: Leishmaniasis. Disponible en: [http://www.who.int/topics/tropical\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/tropical_diseases/en/)
34. Pastor-Santiago JA, Chávez-López S, Guzmán-Bracho C, Flisser A, Olivo-Díaz A. American visceral leishmaniasis in Chiapas, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Jan;86(1):108-14.
35. Ricardez R, Gómez Hernández CH, Guevara A. Encuesta rápida de Leishmaniasis visceral en caninos en un área endémica en Chiapas. *REDVET*. 2005;6(8):1-7.
36. Oliva G, Roura X, Crotti A, et al. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*. 2010; 236 (11).
37. Oryan A, Alidadi S, Akbari M (2014) Risk Factors Associated With Leishmaniasis. *Trop Med Surg* 2:e118. doi: 10.4172/2329-9088.1000e118
38. CDC, Centers for Disease Control y Prevention. 2013. [homepage on the internet]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>
39. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*. 2012;7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
40. Giavedoni P., Pau-Charles I., Mascaro J.M., Alsina-Gibert M., Garcia-Herrera A., Estrach T. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a patient with Sézary syndrome. *J Am Acad Dermatol*, 2014;71 (5) , pp. e213-e214.
41. Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol*. 2013; 82: 155–184. doi: 10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3.
42. Pagliano P, et al. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. *J Antimicrob Chemoth*. 2005; 55(2):229-233. doi:10.1093/jac/dkh538.
43. Mueller M, et al. A comparison of liposomal amphotericin B with sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in pregnancy in Sudan. *J Antimicrob Chemoth*. 2006; 58(4):811-815. doi:10.1093/jac/dkl342
44. Goto Y, Cheng J, Omachi S, Morimoto A. Prevalence, severity, and pathogenesis of anemia in visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2016 Nov 7.
45. Uribarren Berrueta T. Leishmaniosis o leishmaniasis. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>

46. Cuba CA, Marsden PD, Barreto AC, Rocha R, Sampaio RR, Patzlaff L. Parasitologic and immunologic diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1980;89:195-208.
47. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.* 2007;5:873-82.
48. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. 2012. Revista en línea: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/v64n2\\_12/mtr02212.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/v64n2_12/mtr02212.htm)
49. García-Almagro D. Leishmaniasis cutánea. *Actas Dermosifiliogr.* 2005;96(1). DOI: 10.1016/S0001-7310(05)73027-1
50. Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol.* 1996 Feb;257-72.
51. Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1999 May-Jun;17(3):297-304.
52. Ordaz-Farias A, Muñoz-Garza FZ, Sevilla-Gonzalez FK, et al. Case report: Transient success using prolonged treatment with miltefosine for a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana mexicana*. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Jan;88(1):153-6. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0592.
53. Beaumier CM, Gillespie PM, Hotez PJ, Bottazzi ME. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Transl Res.* 2013 Sep;162(3):144-55. doi: 10.1016/j.trsl.2013.03.006.
54. Silva M. Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. *J Leukoc Biol.* 2010.
55. Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient Capture of Infected Neutrophils by Dendritic Cells in the Skin Inhibits the Early Anti-*Leishmania* Response. *PLoS Pathog.* 2012 Feb;8(2): e1002536. doi:10.1371/journal.ppat.1002536.
56. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathog.* 2015; 11(3): e1004651. doi:10.1371/journal.ppat.1004651.
57. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Rev Immunol.* 2013 March; 13:159-175.
58. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Leukocyte functions and percentage breakdown.* Molecular Biology of the Cell. (2002) (4th ed). New York: Garland Science. ISBN 0-8153-4072-9.
59. Jones HR, Robb CT, Perretti M, Rossi AG. The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin Immunol.* 2016 Apr;28(2):137-45. doi: 10.1016/j.smim.2016.03.007.
60. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000639. doi:10.1371/journal.ppat.1000639.
61. Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol.* 2014 Jul;233(3):294-307. doi: 10.1002/path.4359.
62. Neumann A, Berends ET, Nerlich A, Molhoek EM, Gallo RL, Meerloo T, Nizet V, Naim HY, von Köckritz-Blickwede M. The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *Biochem J.* 2014 Nov 15;464(1):3-11. doi: 10.1042/BJ20140778.
63. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol.* 2011 Jul 1; 187(1): 490–500. doi: 10.4049/jimmunol.1100123.
64. Nobuhiro DD, Jackson R, Grasemann H, Palaniyar N. Innate Immune Collectin Surfactant Protein D Simultaneously Binds Both Neutrophil Extracellular Traps and Carbohydrate Ligands and Promotes Bacterial Trapping. *J Immunol.* 2011 Aug 15; 187(4): 1856-65.
65. Buckley CD, Ross EA, McGettrick HM, Osborne CE, Haworth O, et al. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol.* 2006; 79: 303–311.
66. Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, et al. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol.* 2011; 12: 761– 769. doi: 10.1038/ni.2062

67. Charmoy M, Brunner-Agten S, Aebischer D, et al. 2010. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog.* 2010 Feb 5; 6(2): e1000755. doi: 10.1371/journal.ppat.1000755.
68. Caielli S, Banchereau J, Pascual V. Neutrophils come of age in chronic inflammation. *Curr Opin in Immunol.* 2012 Dec;24(6):671-77. doi: 10.1016/j.coi.2012.09.008.
69. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T Cell populations. *Annu Rev Immunol.* 2010; 28: 445-89. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212.
70. Ganong WF. Fisiología Médica. 17a edición. Ed. El Manual Moderno. 2000. Cap 27; p. 574.
71. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591-619. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706.
72. Tefit JN, Davies G, Serra V. NKT Cell responses to glycolipid activation. *Methods Mol Biol.* 2010; 626: 149-76.
73. Abbas A; Inmunología Celular y Molecular; 18-33, 81-90, 163-183 pp.
74. Alemseged T, Albert F, Golstein P, Schmitt-Vershulst AM. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature.* 1985; 313: 318-20.
75. Beadling C, Smith KA. DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes. *Med Immunol.* 2001; 1: 2
76. Lucey DR; Evolution of the type-1 (Th1)–Type-2 (Th2) Cytokine Paradigm. *Infect Dis Clin North Am.* 1999; 13(1); 1-9.
77. Corthay A. How do Regulatory T Cells Work?. *Scand Journal Immunol.* 2009; 70: 326–36.
78. Goedegebuure PS, Eberlein TJ. The role of CD4+ tumor- infiltrating lymphocytes in human solid tumors. *Immunol Res.* 1995; 14: 119-319.
79. Rojas- Espinosa O; Inmunología (de memoria); 3ª Ed; Editorial Médica Panamericana; 2006; 76-80 pp.
80. Mosman TR, Coffman RL. TH1 AND TH2 CELLS: Different patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Ann Rev Immunol.* 1989; 7: 145-73
81. Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL et al. Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J Exp Med.* 2002; 196: 505–15.
82. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J Immunol.* 2002;169:6210–7.
83. Sabat R, Witte E, Witte K, Wolk K. IL-22 and IL-17: An Overview. Springer Basel 2013. 11-35.
84. Pitta M, Romano A, Cabantous S, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest.* 2009 Aug 3;119(8):2379-87.
85. Dhodapkar KM, et al. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood.* 2008; 112 (7): 2878-85.
86. Grogan J, Ouyang W. A role for Th17 cells in the regulation of tertiary lymphoid follicles. *Eur J Immunol.* 2012. 42:2255-2262.
87. Liu S et al. Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor A. *Nature Communications.* 2013;4: 1888.
88. He D, et al. CD8+ IL-17 producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol.* 2006. 177(10): 6852-6858.
89. Bermejo D, et al. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR $\gamma$ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nature Immunol.* 2013 (14): 514–522.
90. Ma et al. Contribution of IL-17–producing  $\gamma\delta$  T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *JEM.* 2011. 208 (3): 491-503.
91. Dudeck A, et al. Mast cells promote Th1 and Th17 responses by modulating dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol.* 2011. 41: 1883-1893.
92. Wojkowska DW, Szpakowski P, Ksiazek-Winiarek D, Leszczynski M, Glabinski A. Interactions between Neutrophils, Th17 Cells, and Chemokines during the Initiation of Experimental Model of Multiple Sclerosis. *Mediat Inflamm.* 2014; Article ID 590409, 8 pages. doi:10.1155/2014/590409.

93. Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, et al. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol*. 2010. 40: 2830–2836. doi: 10.1002/eji.200940115.
94. Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol*. 2009;182(5):3039-46. doi: 10.4049/jimmunol.0713598.
95. Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL. gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol*. 2008 Jun; 20(3):353–7. doi: 10.1016/j.coi.2008.03.006.
96. Bacellar O, Faria D, Nascimento M, et al. IL-17 Production in Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2009 Jul. 200(1): 75–8. doi: 10.1086/599380.
97. Evans HG, Gullik NJ, Kelly S, et al. In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(15): 6232-37.
98. Adriouch S, Dox D, Welge V, et al. Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function of the Mouse P2X7 Receptor. *J Immunol*. 2002 October 15; 169(8):4108-4112. doi: 10.4049/jimmunol.169.8.4108.
99. Shio MT, Christian JG, Jung JY, Chang K-P, Olivier M. PKC/ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation Is Attenuated by Leishmania Zinc-Metalloprotease during Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6): e0003868. doi:10.1371/journal.pntd.0003868.
100. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*. 2014 May 15; 509(7500): 310–7. doi:10.1038/nature13085.
101. Karmakar M, Katsnelson MA, Dubyak GR, Pearlman E. Neutrophil P2X<sub>7</sub> receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to ATP. *Nature*. 2016;7:10555. doi:10.1038/ncomms10555.
102. Horta MF, Pinheiro Mendes B, Roma EH, et al. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. *J Parasitol Res*. 2012. Article ID 203818, 11 pages. doi:10.1155/2012/203818.
103. Charmoy M, Megnekou R, Allenbach C, et al. Leishmania major induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol*. 2007;82:288–99.
104. Sousa LM, Carneiro MB, Resende ME, et al. Neutrophils have a protective role during early stages of Leishmania amazonensis infection in BALB/c mice. *Parasite Immunol*. 2014 January;36(1):13-31. Doi.10.1111/pim.12078.
105. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 21;106(16):6748-53. doi: 10.1073/pnas.0900226106.
106. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation and beyond. *J Exp Med*. 2013 Jul; 210(7): 1283-99. doi: 10.1084/jem.20122220.
107. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, et al. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010 Aug; 31(8):318-24. doi:10.1016/j.it.2010.05.006.
108. Iba T, Hashiguchi N, Nagaoka I, Tabe Y, Murai M. Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *J Intensive Care*. 2013; 1:13. DOI: 10.1186/2052-0492-1-13.
109. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 2009;30:513–521. doi: 10.1016/j.it.2009.07.011.
110. Hoenderdos K, Condliffe A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 May; 48(5):531-9. doi: 10.1165/rcmb.2012-0492TR.
111. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. 2010 Sep; 49:1618-31. doi: 10.1093/rheumatology/keq045.
112. Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol*. 2011; 89:359-372.
113. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps license macrophages and Th17 cells for cytokine production in atherosclerosis. *Science*. 2015 Jul; 349 (6245): 316-20. doi: 10.1126/science.aaa8064.
114. Kleinewietfeld M, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013 Apr 25; 496 (7446): 518-522.

115. Silva MT. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. May 2010; *J Leukoc Biol.* 2010 May;87(5):805-13. doi: 10.1189/jlb.1109767.
116. Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol.* 2011 May; 23(5): 317-26. doi: 10.1093/intimm/dxr007.
117. Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine.* 2014 Apr;66(2):127-132. doi: 10.1016/j.cyto.2013.12.016.
118. Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK. Th17 cells at the cross roads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol.* 2009 Sep; 2(5): 403-11.
119. Caruso R, Fina D, Paoluzi OA, et al. IL-23-mediated regulation of IL-17 production in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Eur J Immunol.* 2008;38(2):470–8. doi: 10.1002/eji.200737635.
120. Terrazas C, Varikuti S, Kimble J, et al. IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. *FASEB J.* 2016 Mar;30(3):1135-43. doi: 10.1096/fj.15-277202.
121. Wu W, Huang L, Mendez S. A live *Leishmania major* vaccine containing CpG motifs induces the de novo generation of Th17 cells in C57BL/6 mice. *Eur J Immunol.* 2010;40(9): 2517–27. doi: 10.1002/eji.201040484.
122. Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Júnior DS, et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon  $\gamma$  to promote protection against *Leishmania infantum* infection. *J Infect Dis.* 2015 Mar 15;211(6):1015-26. doi: 10.1093/infdis/jiu531.

## INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

### SOLUCIONES PARA IHQ

□ **Solución de agua amoniacal al 0.2% (Bluing)**

Hidróxido de amonio (concentrado) ----- 2 ml  
Agua destilada ----- 1000 ml

Mezclar bien. El pH estará alrededor de 10.0. Almacenar esta solución a temperatura ambiente. Realizar el virado durante 30 segundos a 1 minuto después de la tinción con hematoxilina y lavado.

Nota: esta solución no es tan buena como el bicarbonato sódico según el resultado de la prueba.

□ **Solución Bloqueadora de ASB al 1%**

- 10 ml de buffer tris HCl 0.5 M
- 0.1 g de Albúmina Sérica Bovina
- 1 ul de tritón X100 (0.01%)

□ **Buffer Tris HCl 0.5 M, pH 7.6**

Para preparar 1 litro:

- 6.1 g Trizma Hydrochloride
- 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada
- .375 ml HCl 1N

Mezclar, aforar a 1000 ml y llevar a un pH 7.6.

□ **HCl 1 N**

- 8.285 ml de HCl
- 100 ml de agua destilada

□ **NaOH 1 N**

- 4 g de NaOH
- 100 ml de agua destilada.

\* Guardar todas las soluciones a 4° para su almacenamiento (Tris buffer, solución bloqueadora, solución diluyente de anticuerpos).

---

### MATERIALES

- Micropipetas ajustables Eppendorf (2, 5, 20, 200 y 1000 ul) y puntas.
- Portaobjetos silanizados cubreobjetos
- Vasos de precipitados de diferentes volúmenes.
- Matraces Elenmeyer, vasos Koplík y probetas.
- Tubos de 15 y 50 ml.
- Jeringas de insulina de 1 y .3 ml.
- Cajas de petri de difentes tamaños.
- Mallas estériles de 100 micrometros.
- Incubadora.
- Citómetro de flujo FACS CANTO.
- Centrifuga
- Anestesia inhalada (Sevoflurano).
- Anticuerpos Primarios:
  - PE Rat anti Mouse CD3, Biolegend, Cat. No. 100206.
  - FITC Rat anti Mouse CD4, Biolegend, Cat. No.100406.
  - APC Rat anti Mouse IL17, Biolegend, Cat. No.506916.
  - Anti-CD3 (Abcam).
  - Anti-CD4 (Santa Cruz, cat. Sc13573).
  - Anti-IL-17 (Abcam, cat. Ab79056).
  - Anti-NIMP-R14 (Rat monoclonal Anti- mouse Neutrophil antibody [NIMP-R14] (Abcam, cat. Ab2557).
  - Anti-cathelicidin (anticuerpo LL-37 (H-40): sc-50423, Santa Cruz, USA)
- Anticuerpos Secundarios:
  - Biotina anti-rata anti-IgG para CD4 y NIMP-R14.
  - Biotina cabra anti-conejo anti-IgG (Zymed, cat. 62-1840).
  - Biotina cabra anti-conejo anti-IgG (Zymed, cat. 62-1840) para IL-17.
  - HRP-estreptavidina (Invitrogen, cat 434323) y revelados con DAB (Dako, cat. K3468).
  - TRITC conjugated goat anti rabbit IgG (H+L) Zymed 816114. (p/ catelidicina)
  - DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (SIGMA, Fluoroshield con DAPI, cat. F6057- 20ML).

- Anticuerpos de isotipo para citometría.
  - APC Rat IgG1k, Biolegend, Cat. No. 400411.
  - PE Rat IgG2b,k, Biolegend, Cat. No. 100205.
  - FITC Rat IgG2b,k, Biolegend, Cat. No. 400633.
- HRP-estreptavidina (Invitrogen, cat 434323 #37 o 92).
- DAB, Dako Cytomation. DAB + Substrate Buffer, Ref: K3468 11 mL. Lot: 10010448. Dako Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System for Autostainer.
- Collagenase from Clostridium histolyticum (SIGMA-ALDRICH, Cat. C5138).
- RPMI (Gibco).
- Suero fetal Bovino.
- Suero de conejo sano.
- BD Cytotfix/Cytoperm, Fixation and Permeabilization Solution. BD Biosciences, Cat. No. 554722.
- BD Perm/Wash buffer, BD Biosciences, Cat. No. 554723.
- BD GolgiPlug, Protein Transport Inhibitor (Containing Brefeldin A). BD Biosciences, Cat No. 555029.
- Peróxido de hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (J.T.Baker).
- Albúmina. SIGMA. Albumin, Bovine Essentially IgG Free. [9048-46-8] No.232-936-2 Lyophilized Powder, Dessicate. Ref: A-9085 25g. Lot: 50K09151.
- Bloqueador de peroxidasa Dako, Dako Cytomation, Peroxidase Blocking Reagent, Ready to use. Ref. 52001, 110 mL. Lot. 026066.
- Tritón. SIGMA®. Triton X-100 (t-Octylphenoxy poly-ethoxyethanol) Sigma Ultra. Ref: T-9284 500 mL. Lot: 81K0225.
- Resina Entellan
- Kit para Elisa anti-IL17 (Mouse IL-17AF (heterodimer) ELISA Ready-SET-Go! (2nd Generation), Catalog Number: 88-8711, eBioscience®).
- Microscopio Zeiss, Germany.
- Microscopio Confocal de Fluorescencia Leica DM LS, Tipo DFC 300 FX.

## METODOLOGÍA DETALLADA

### LAVADO DE PARÁSITOS

Tomar 1000 ul del stock de parásitos *L. mexicana* cultivados en medio RPMI en el día 5 para obtener promastigotes metacíclicos. Realizar dos lavados con 1 ml de solución salina (4000 rpm/10 minutos). Aforar a 1 ml con SS. Realizar una dilución 1:10 con azul tripán y realizar el conteo celular en la cámara de Neubauer, utilizando la siguiente fórmula para obtener el número de parásitos por mL.

$$\# \text{ de parásitos} \times 10,000 \times 10^* = \text{Número de parásitos/mL.}$$

\* este número varía de acuerdo a la dilución con azul tripán que haya sido utilizada para el conteo, puede ser 1:2 o 1:20, por ejemplo si en el stock se encuentra pocos o muchos parásitos.

Posteriormente ajustar la concentración a la cantidad deseada (en este caso fue de 100,000 parásitos por cada 5 ml de solución salina).

### PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

#### Fijación

La mitad de los ratones totales se utilizaron para el análisis de inmunohistoquímica (IHC). Algunos tejidos se fijaron en formaldehído al 10% y se embebieron en parafina y otros se incluyeron en el compuesto OCT (Tissue-Tek® SAKURA, Cat. 4538) y se congelaron a -70°C para realizar el protocolo de IHC para parafina y muestras congeladas.

#### Deshidratación

Una vez fijadas en formol al 10%, las muestras se deshidrataron en el histoquinete con un tren de formol en el primer recipiente y alcoholes en el siguiente orden (OH al 70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 100% y 100%) con el objetivo de que el agua salga gradualmente y se evite la deformación del tejido.

#### Acclaramiento o Diafanización

Esto es una continuación del procesamiento que se lleva a cabo en el histoquinete, donde después de haber sido colocadas las muestras en Alcohol al 100% se pasan a Xilol (que puede ser puro o mezclado con alcohol en las mismas proporciones 1:1), después a Xilol puro y finalmente al último recipiente que también contiene Xilol puro. Las muestras se dejan durante una hora en cada recipiente.

#### Infiltración

En este paso la muestra se coloca en parafina líquida, cabe mencionar que se debe usar parafina histológica. En el paso anterior el tejido está completamente lleno de xilol, ahora debido a ósmosis sale el xilol y entra la parafina.

La deshidratación, aclaramiento e infiltración pueden ser realizadas manualmente pero hoy en día se realizan de modo automático en máquinas específicas.

#### **Inclusión o Impregnación**

Los tejidos se incluyen en Parafina fundida a 60°C.

#### **Corte y Montaje de la muestra.**

Las secciones fueron cortadas (5 µm) y montadas en portaobjetos de vidrio silanizados.

#### **TINCIÓN HEMATOXILINA - EOSINA**

Para llevar a cabo la tinción con Hematoxilina y Eosina es necesario eliminar la parafina de los portaobjetos, rehidratar los tejidos, teñirse, deshidratar, aclarar y montar. Esto es:

1) xilol 10 minutos, 2) xilol 10 minutos, 3) Xilol/OH 5 minutos, 4) OH 100% 5 minutos, 5) OH 100% 5 minutos, 6) OH 96% 5 minutos, 7) OH 96% 5 minutos, 8) Solución Scott 2-3 minutos, 9) Agua 5 minutos, 10) Eosina 2 minutos, 11) OH 96% 5 minutos, 12) OH 96% 5 minutos, 13) OH 100% 5 minutos, 14) OH 100% 5 minutos, 15) OH/xilol 5 minutos, 16) Xilol 5 minutos, 17) Xilol 5 minutos.

Finalmente se coloca una gota de resina Entellan sobre el tejido y se coloca sobre ésta un cubreobjetos.

#### **INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)**

La mitad de las muestras fueron procesadas mediante inmunohistoquímica a través de dos técnicas:

3. Inmunohistoquímica por Técnica de Peroxidasa para identificar células Th17 (CD3, CD4 e IL-17) y neutrófilos (NIMP-R14) en los cortes de tejido.
4. Inmunohistoquímica por Fluorescencia (Inmunofluorescencia) para la detección de estructuras histológicas similares a NET dentro de los tejidos infectados. Se utilizaron anticuerpos dirigidos contra catelicidina, IL-17 y DNA (se utilizó DAPI).

#### **INMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDOS PARAFINADOS**

1. Desparafinado y rehidratación de tejidos:  
Incubar las muestras en el horno a 50-60°C durante 30 minutos hasta que la parafina se vea brillante (o sobre platina a 60° C durante 30 minutos, tapando las muestras con papel aluminio).  
Pasar las muestras por un tren de xilol y alcohol en el siguiente orden: Xilol 1, Xilol 2, Xilol/Alcohol, Alcohol 100%, Alcohol 90%, Alcohol 80% y Alcohol 70% durante 5 minutos o 30 segundos agitando las muestras suavemente, en cada uno.  
Lavar dos veces en agua destilada durante 5 minutos y dejarlas ahí hasta usarlas, ya que es de gran importancia no dejar secar las muestras durante todo el proceso.
2. Reactivación antigénica en buffer de citratos (exclusivamente para el anticuerpo CD4, para el caso de IL-17 y CD3 se continua el procedimiento a partir del paso #6).  
Colocar las laminillas en un koplín de plástico con 50 ml de buffer de citratos y cerrar la tapa del vaso hasta el primer tope. El koplín se coloca en una olla express en baño maría a 120° C durante 3 minutos o durante 10 minutos a 90° C.  
Nota: La olla express se llena hasta ¾ con agua y se coloca una gradilla de metal que sostenga el vaso koplín y se cierra la olla. Se coloca en la parrilla y se sube la temperatura a 500° C, se espera a que el pivote esté en alto y se baja la temperatura a 135-140° C durante 3 minutos (lo que correspondería a 120° C dentro de la olla).
3. Terminado el tiempo se apaga la parrilla y se quita de ahí la olla. Dejar que la presión se libere poco a poco hasta que el pivote baje (proximadamente 15 minutos). Se abre la olla y se esperan 10 minutos.
4. Sacar el vaso koplín y dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Abrir el vaso y esperar 10 minutos. introducir el koplín en agua a temperatura ambiente y esperar hasta que se igualen las temperaturas.
5. Lavar las muestras con agua destilada.
6. Lavar con buffer Tris HCl durante 5 minutos
7. Bloqueo de peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 10 minutos (1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% + 9 ml de metanol)
8. Lavar con Tris HCl tres veces cada 5 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
9. Delimitar las muestras con plumón hidrofóbico.
10. Bloquear proteínas inespecíficas durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente con solución de albúmina sérica bovina (BSA- SIGMA) al 1% (Tris HCl BSA 1%, Tritón 0.1%)
11. Decantar.
12. Incubación del anticuerpo primario (diluido en Tris BSA 0.1% Tritón 0.01%) en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hora, con la siguiente concentración:

##### Anticuerpos primarios

CD3 (1:100) (Rabbit anti mouse).....1 µl + 99 µl Tris BSA .1% = 100 µl

CD4 (1:50) (Rat anti mouse).....2 µl + 98 µl Tris BSA .1% = 100 µl

IL-17 (1:200) (Rabbit anti mouse)..... 2 µl + 98 µl Tris BSA .1% = 100 µl

13. Realizar tres lavados con buffer Tris HCl 0.01 M durante 5 minutos.
14. Incubación del anticuerpo secundario biotilado durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente con la siguiente concentración:
 

<u>Anticuerpo secundario (para CD3 e IL-17):</u>	
Biotina anti-conejo (1:100).....	1 µl
Tris BSA 0.1%.....	<u>99 µl</u>
100 µl	
<u>Anticuerpo secundario (para CD4):</u>	
Biotina anti-rat (1:100).....	1 µl
Tris BSA 0.1%.....	<u>99 µl</u>
100 µl	
15. Realizar tres lavados con buffer Tris HCl 0.01 M durante 5 minutos.
16. Incubación de HRP-estreptavidina (Invitrogen, cat 434323) durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
 

HRP-estreptavidina (1:100).....	1 µl
Tris BSA 0.1%.....	<u>99 µl</u>
100 µl	
17. Realizar tres lavados con buffer Tris HCl.
18. Revelado con DAB (1:10) (Dako, cat. K3468) durante 40-60 segundos monitoreando en microscopio.
 

DAB café (1:10).....	10 µl
DAB buffer.....	<u>90 µl</u>
100 µl	
19. Lavar las laminillas con agua destilada 2 veces.
20. Contrateñir con hematoxilina de Harris durante 40 segundos y lavar con agua corriente hasta aclarar.
21. Pasar las laminillas por agua amoniacal durante 10 segundos y lavar con agua destilada.
22. Deshidratar las muestras: OH 70%, OH 80%, OH 90%, OH 96%, OH100%, OH/Xilol, Xilol 1 y Xilol 2.
23. Montar con resina entellan y dejar secar para su evaluación.

## INMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDOS CONGELADOS

1. Realizar cortes de 5 micras en el criostato.
2. Fijar los tejidos en acetona fría durante 10 minutos y dejar secar a temperatura ambiente.
3. Marcar con plumón hidrofóbico alrededor del tejido.
4. Realizar tres lavados con buffer Tris HCl 0.01 M, ph 7.6 durante 5 minutos.
5. Bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (J.T.Baker) al 3% diluido en metanol.
6. Realizar tres lavados con buffer Tris HCl 0.01 M durante 5 minutos.
7. Bloqueo de las proteínas inespecíficas con solución de BSA al 1% (SIGMA) durante 1 hora a 37° C.
8. Decantar.
9. Incubación del anticuerpo primario (diluido en Tris BSA 0.1% Tritón 0.01%) en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hora, con la siguiente concentración:
 

<u>NIMP-R14 (Rat anti mouse)</u>	
NIMP_R14 (1:100).....	1 µl
Tris BSA 0.1%.....	<u>99 µl</u>
100 µl	
10. Realizar tres lavados con buffer Tris HCl 0.01 M durante 5 minutos.
11. Incubación del anticuerpo secundario biotilado durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente con la siguiente concentración:
 

<u>Anticuerpo secundario:</u>	
Biotina anti-rata (1:100).....	1 µl
Tris BSA 0.1%.....	<u>99 µl</u>
100 µl	
12. Realizar tres lavados con buffer Tris HCl 0.01 M durante 5 minutos.

13. Incubación de HRP-estreptavidina (Invitrogen, cat 434323) durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. □

HRP-estreptavidina (1:100).....1 µl  
Tris BSA 0.1%.....99 µl  
100 µl

14. Realizar tres lavados con buffer Tris HCl.  
15. Revelado con DAB (1:10) (Dako, cat. K3468) durante 40 segundos monitoreando en microscopio. □

DAB café (1:10).....10 µl  
DAB buffer.....90 µl  
100 µl

16. Lavar las laminillas con agua destilada 2 veces.  
17. Contrateñir con hematoxilina de Harris durante 40 segundos y lavar con agua corriente hasta aclarar.  
18. Pasar por agua amoniacal durante 10 segundos y lavar con agua destilada.  
19. Deshidratar las muestras: OH 70%, OH 80%, OH 90%, OH 96%, OH/Xilol, Xilol 1 y Xilol 2.  
20. Montar con resina entellan y dejar secar para su evaluación.

### INMUNOFLUORESCENCIA

1. Realizar cortes de 5 micras en el criostato.  
2. Fijar los tejidos en acetona fría durante 10 minutos y dejar secar a temperatura ambiente.  
3. Marcar con plumón hidrofóbico alrededor del tejido.  
4. Realizar 3 lavados con PBS 1X durante 5 minutos.  
5. Bloqueo de proteínas inespecíficas con BSA al 1% Tritón 0.1% durante 30 minutos a temperatura ambiente.  
6. Decantar.  
7. Incubación de los anticuerpos primarios durante 30 minutos □  
a 4° C, con las siguientes concentraciones:

Anticuerpos primarios:  
Catelidicina (1:200).....1 µl  
IL-17 APC (1:50) .....4 µl  
Solución BSA 1%.....195 µl  
200 µl

8. Realizar 3 lavados con PBS 1x durante 5 minutos en cada uno.  
9. Bloqueo de proteínas inespecíficas con BSA al 1% Tritón 0.1% durante 30 minutos a temperatura ambiente.  
10. Decantar.  
11. Incubación de los anticuerpos secundarios durante 30 minutos □  
a 4° C, con las siguiente concentración:

Anticuerpo secundario:  
TRITC (1:50).....5 µl  
Solución BSA 1%.....245 µl  
250 µl

12. Realizar 3 lavados con PBS 1x durante 5 minutos en cada uno.  
13. Secar bien las laminillas, montar con DAPI.  
14. Sellado del cubreobjetos alrededor de toda la periferia del mismo, con un barniz de uñas para evitar la deshidratación y ayudar a mantener por mayor tiempo la fluorescencia.  
15. Proteger las laminillas de la luz y almacenarlas a 4° C.

### DISGREGACIÓN Y ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO

Colocar el órgano en una malla de 100 micrómetros y macerar suavemente con un émbolo estéril agregando el PBS estéril necesario para dejar caer las células a la caja de petri y recuperarlas en un tubo de 15 ml. Centrifugar a 1500 rpm/10 minutos/4°C y retirar sobrenadante. Agregar 1 ml de Solución Lítica (SL) pegando la pipeta a la pared del tubo resuspendiendo las células en la SL para posteriormente agregar 5 ml más de SL y colocar el tubo en hielo durante 10 minutos. Llevar la suspensión celular a 14 ml con PBS estéril para romper la reacción de la SL y centrifugar a 1500 rpm/10 minutos/4°C y retirar sobrenadante. Agregar 7 ml de RPMI y resuspender para realizar el conteo celular.

Colocar  $1 \times 10^6$  células (80  $\mu$ l de la suspensión celular en base al conteo) en 1 ml por pozo en una caja de 24 pozos y agregar las siguientes condiciones:

Pozo 1: Con estímulo por 24 horas.	Pozo 2: Sin estímulo por 24 horas.	Pozo 3: Con estímulo por 4.5 horas.
50 $\mu$ l PMA (50 ng/ml), 1 $\mu$ l Ionomicina (1 $\mu$ g/ml), 870 $\mu$ l RPMI.	1 $\mu$ l Golgi Plug, 920 $\mu$ l de RPMI.	50 $\mu$ l PMA (50 ng/ml), 1 $\mu$ l Ionomicina (1 $\mu$ g/ml), 870 $\mu$ l RPMI.

Pasado los respectivos tiempos recuperar las células del pozo y pasarlas a un eppendorf. Centrifugar a 1500 rpm/10 minutos, retirar sobrenadante y resuspender en 1 ml de PBS estéril ó RPMI, dependiendo de la técnica de análisis requerida (inmunocitoquímica o citometría de flujo)

#### DISGREGACIÓN DE TEJIDO DE OREJA

1. Cortar las orejas desde la base.
2. Eliminar el pelo de la oreja con crema depilatoria (Nair®) durante 5 minutos y enjuagar con agua corriente.
3. Colocar las orejas en PBS con antibiótico (10 ml PBS estéril + 400  $\mu$ l antibiótico - estreptomicina/penicilina 200 U/ml [Gibco, cat. 15070-063]) durante 10 minutos en una caja de petri.
4. Separar las láminas dérmicas con pinzas estériles e introducir las en un tubo de 15 ml con 2.5-3 ml de solución de colagenasa (9 ml RPMI [Gibco, cat. 21875158] suplementado con SFB 10% [Bovine Serum - Gibco, cat. 10082139] + 1 ml SFB + 0.01 g Colagenasa [SIGMA-ALDRICH, Cat. C5138-1G]) en baño maría durante 1.5 horas a 37°C.
5. Colocar el tejido y la solución de colagenasa en una malla de 100 micrómetros (BD Biosciences, Cat. 352360) y macerarlo con un émbolo estéril dejando caer las células a la caja de petri estéril y agregando gradualmente PBS estéril frío.
6. Recuperar las células con pipeta.
7. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C y retirar el sobrenadante.
8. Realizar 2-4 lavados (dependiendo de los restos orgánicos presentes en el PBS) con PBS estéril 1x a 1500/rpm durante 10 minutos a 4°C hasta que el buffer se aclare en su totalidad y se aprecie claramente el botón de células.
9. Eliminar el sobrenadante con pipeta y resuspender el botón de células en 1 ml de RPMI con SFB al 10%.
10. Realizar el conteo con azul tripan en cámara de Neubauer (20  $\mu$ l azul tripan + 20  $\mu$ l de suspensión celular utilizando la siguiente fórmula, # x 10 000 x 2 x ml).

#### MARCAJE EXTRACELULAR/INTRACELULAR PARA CÉLULAS TH17

1. Colocar  $1.5 \times 10^6$  células en 1 ml de medio RPMI por condición (contemplando los tubos necesarios para los isotipos y controles).
2. Agregar 1  $\mu$ l de Golgi Plug (BD Biosciences, Cat No. 555029) a cada tubo durante 2 horas a temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
4. Realizar dos lavados con 1 ml de PBS 1x estéril frío a 1500 rpm durante 10 minutos. Retirar el sobrenadante.
5. Bloquear las proteínas inespecíficas con 1  $\mu$ l de suero de conejo sano diluido en 96  $\mu$ l de PBS estéril (1:100) durante 10 minutos.
6. Marcar las moléculas de superficie previo al marcaje intracelular. Incubar los anticuerpos durante 20 minutos en oscuridad con la siguiente concentración:
 

	<u>Células Th17 (Rat anti mouse):</u>
	PBS .....96 $\mu$ l
	Suero conejo.....1 $\mu$ l
	Esperar 10 minutos y agregar:
	(T) PE CD3 ..... 1 $\mu$ l
	(V) FITC CD4..... 2 $\mu$ l
	100 $\mu$ l
7. Realizar 2 lavados con PBS (1500 rpm/10 minutos).
8. Retirar sobrenadante y agregar 150  $\mu$ l de BD Cytotfix/Cytoperm, Fixation and
9. Permeabilization Solution (BD Biosciences, Cat.No. 554722) durante toda la noche a 4°C (ó durante 20 minutos a temperatura ambiente como mínimo).
10. Realizar 1 lavado con PBS estéril a 2000 rpm/10 minutos.
11. Realizar 2 lavados con 200  $\mu$ l de PermWash buffer 1X (DB Biosciences, Cat No. 554723) a 2000 rpm durante 10 minutos y retirar el sobrenadante.
12. Bloquear las proteínas inespecíficas agregando 1  $\mu$ l de suero de conejo sano diluido en 98  $\mu$ l de Perm Wash buffer estéril (1:100) durante 10 minutos.

13. Incubar con el anticuerpo de marcaje intracelular durante 20 minutos en oscuridad:
14. Realizar 2 lavados con Perm/Wash buffer (BD Perm/Wash, BD Biosciences, Cat. No. 554723) a 2000 rpm durante 10 minutos.
15. Aforar a 300 µl con PBS y llevar la suspensión celular a sus respectivos tubos de citometría.

Células Th17  
 PBS .....98 µl  
 Suero conejo.....1 µl  
 Esperar 10 minutos y agregar:  
 APC IL-17 ..... 1 µl  
 100 µl

### MARCAJE EXTRACELULAR PARA NEUTRÓFILOS

1. Colocar 1 x 10<sup>6</sup> células por condición en tubos eppendorf de 1.5 ml (contemplando los isotipos y controles) y realizar dos lavados con PBS 1x estéril a 1500 rpm durante 10 minutos. Retirar el sobrenadante.
2. Bloquear las proteínas inespecíficas con 1 ul de suero de conejo sano diluido en 98 ul de PBS estéril (1:100) durante 10 minutos.
3. Marcar las moléculas de superficie. Incubar el anticuerpo durante 20 minutos en oscuridad con la dilución 1:100.

Neutrófilos (Rat anti mouse):  
 PBS .....98 µl  
 Suero conejo.....1 µl

4. Realizar 1 lavado con PBS (1500 rpm/10 minutos) e incubar con el anticuerpo secundario (FITC IgG Rat, 1:100) en oscuridad durante 20 minutos:

Esperar 10 minutos y agregar:  
 (180) NIMPR-R14 .....1 µl  
 100 µl

5. Realizar 2 lavados con PBS (1500 rpm/10 minutos).
6. Retirar sobrenadante y agregar 150 µl de BD Cytotfix/Cytoperm, Fixation and Permeabilization Solution (BD Biosciences, Cat.No. 554722) durante toda la noche a 4°C (ó durante 20 minutos a temperatura ambiente como mínimo).
7. Realizar 1 lavado con PBS estéril a 2000 rpm/10 minutos.
8. Aforar a 300 µl con PBS y llevar la suspensión celular a sus respectivos tubos de citometría.

Neutrófilos  
 PBS 1x .....99 µl  
 FITC IgG anti Rat.....1 µl  
 100 µl

### ELISA

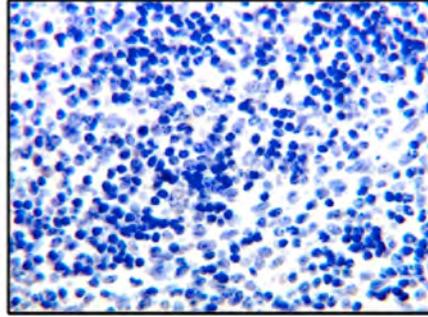
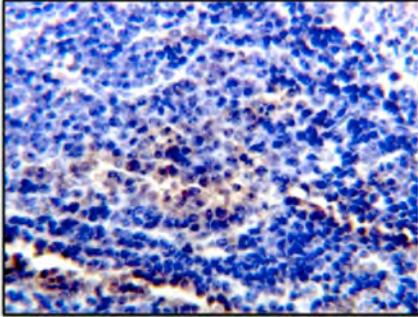
(Mouse IL-17AF (heterodimer) ELISA Ready-SET-Go! (2nd Generation) Cat.88-8711).

Rango de curva estándar: 16 - 2000 pg/mL.

1. Cubrir las placas de ELISA Corning Costar 9018 (o Maxisorp® Nunc) con 100 ul de anticuerpo de captura diluido en Coating buffer. Sellar la placa e incubar durante la noche a 4° C.
2. Aspirar y lavar los pozos tres veces con > 250 ul / pozo con Wash Buffer. El permitir un tiempo de lavado (~ 1 minuto) durante cada paso de lavado aumenta la eficacia de los lavados. Secar la placa de transferencia sobre papel absorbente para eliminar cualquier tampón residual.
3. Diluir 1 parte del concentrado 5X Assay Diluent con 4 partes de agua destilada. Bloquee los pozos con 200 µL/ pozo del diluyente a 1X. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. Opcional: Aspirar y lavar al menos una vez con Wash Buffer.
4. Sample Diluent A Al usar el Diluyente de Muestra A (sample diluent), diluya los estándares como se indica en el C de A para preparar la concentración máxima del estándar. Añadir 100 µL / pozo de concentración estándar superior a los respectivos pozos. Realice dos diluciones seriales de los estándares más altos para hacer la curva estándar.
5. De 8 puntos. Agregue 100 µl / pozo de sus muestras a los pozos apropiados. Se recomienda diluir las muestras de suero al menos 2 veces en el Diluyente de muestra A (Sample Diluent) antes de su evaluación en este ensayo. Sellar la placa e incubar a temperatura ambiente durante 2 horas (o durante la noche a 4° C para máxima sensibilidad). Aspirar / lavar como en paso 2. Repetir un total de 3-5 lavados.
6. Añadir 100 µl / pozo del anticuerpo de detección diluido en 1X Diluyente de ensayo. Sellar la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. Aspirar / lavar como en paso 2. Repetir un total de 3-5 lavados.
7. Añadir 100 µL / pozo de Avidin-HRP diluido en 1X Diluyente de ensayo. Sellar la placa e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Aspire y lave como en paso 2. En este paso de lavado, humedezca los pozos en el buffer de lavado durante 1 a 2 minutos antes de la aspiración. Repetir 5-7 lavados.
8. Añadir 100 µl / pozo de solución de sustrato (Substrate Solution) a cada pozo. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos.
9. Añadir 50 µl de Stop Solution a cada pozo y leer la placa a 450 nm. Si la resta de longitud de onda está disponible, restar los valores de 570 nm de los de 450 nm y analizar los datos.

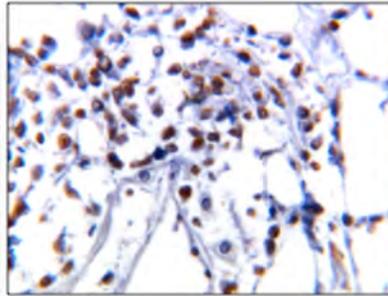
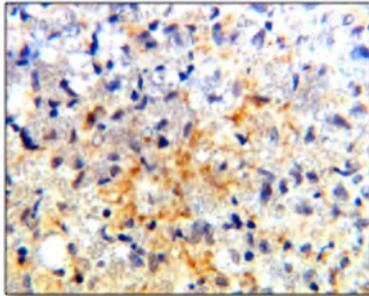
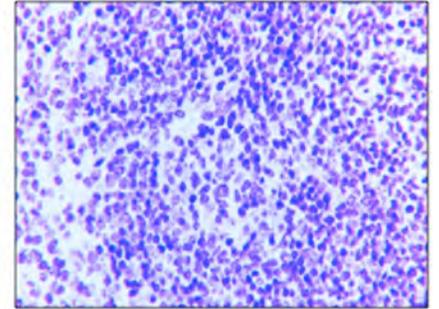
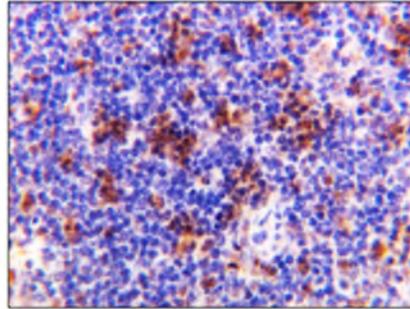
## INMUNOHISTOQUÍMICA

### CONTROLES

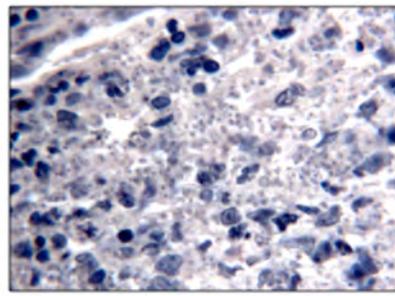
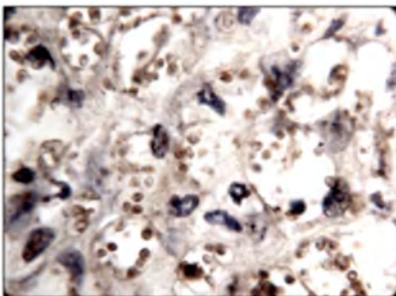


Se observa una imagen a 40X que corresponde a un bazo de ratón sano, el tejido está marcado con el anticuerpo CD3 y revelada con DAB. La imagen derecha muestra el control secundario con el que aseguramos que la tinción es específica contra la molécula.

En la estandarización del anticuerpo CD4 se utilizó bazo de ratón sano, podemos apreciar la marca del CD4 distribuida a lo largo del tejido. La imagen derecha muestra el control secundario con el que aseguramos que la tinción es específica contra la molécula.

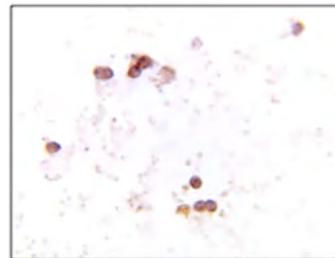


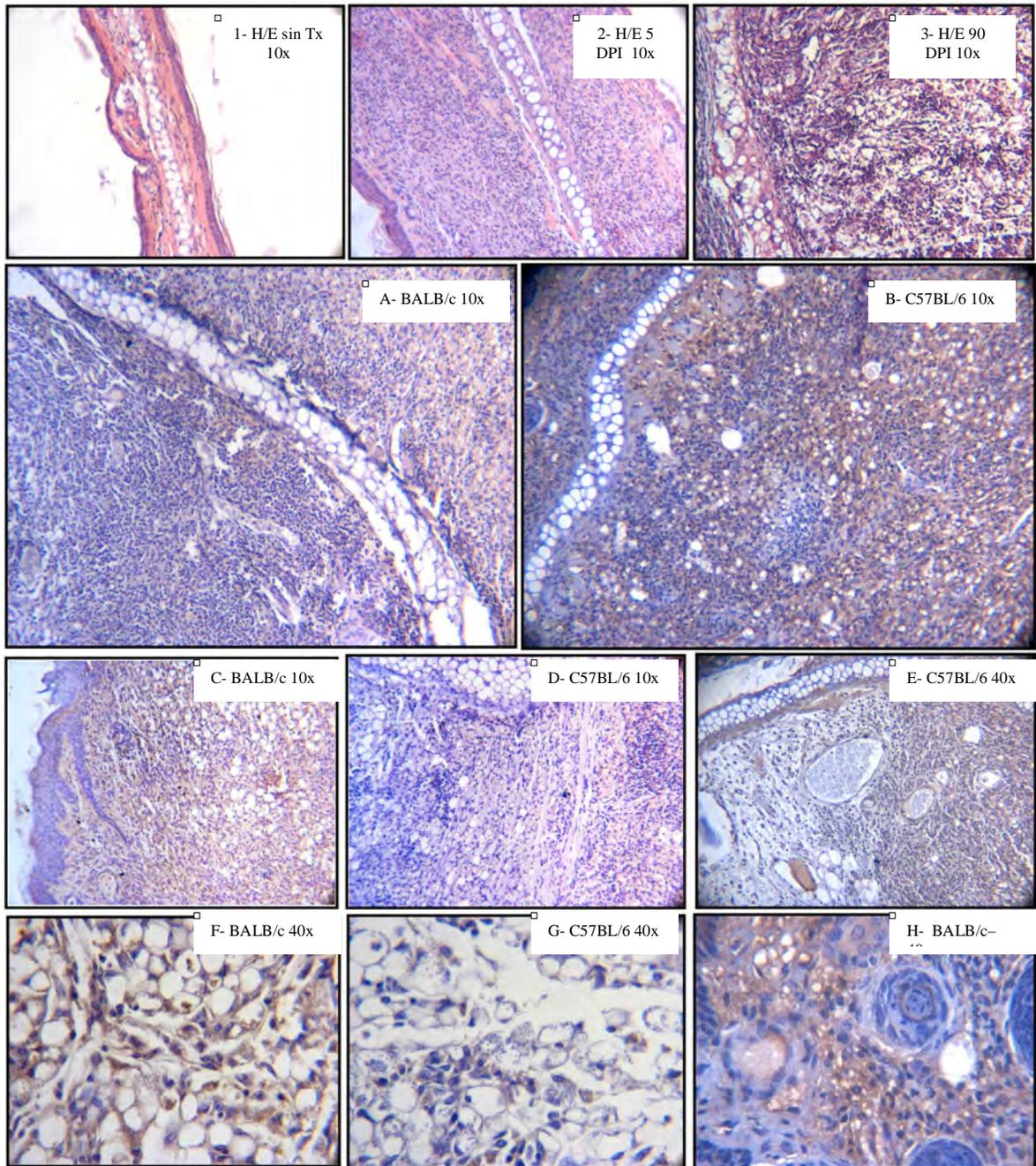
Estandarización inmunohistoquímica del anticuerpo IL-17, se utilizó cojinete plantar de ratón infectado con *L. mexicana* (3 m.p.i.) (IZQ) y pulmón de ratón infectado con *M. Tuberculosis* (15 d.p.i.) (DER) como controles positivos. Se puede apreciar la marca de la citocina entre el infiltrado inflamatorio que se asocia a la presencia de parásitos. En la imagen derecha tenemos el parénquima pulmonar y septos alveolares mostrando células positivas a IL-17 (la mayoría probablemente neumocitos).



IHQ anti-leishmania estandarizada en cojinete plantar de ratón infectado con *L. mexicana* (3 m.p.i.). Se puede apreciar la marca por técnica de peroxidasa en los pequeños núcleos de los parásitos que se localizan entre el infiltrado linfocitario (IMAGEN IZQ 63X/ DER 40X).

Para la estandarización de neutrófilos se utilizó sangre periférica de ratón, la cual se separó por gradientes para seleccionar las células polimorfonucleares y realizar inmunocitoquímica contra los neutrófilos.



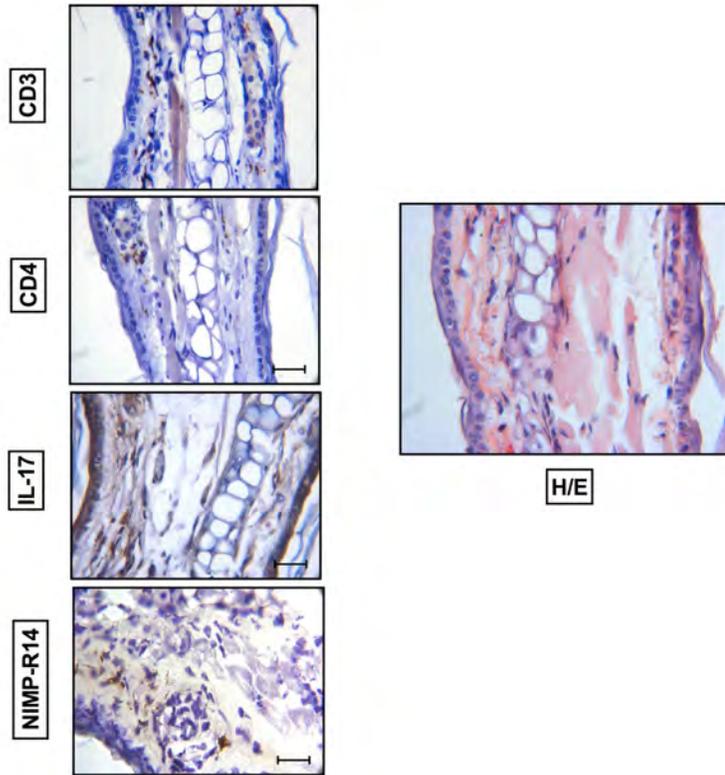


Tinción H/E de ratones BALB/c (1- sin tratamiento/ 2- día 5 post-infección/ 3- día 90 post-infección).

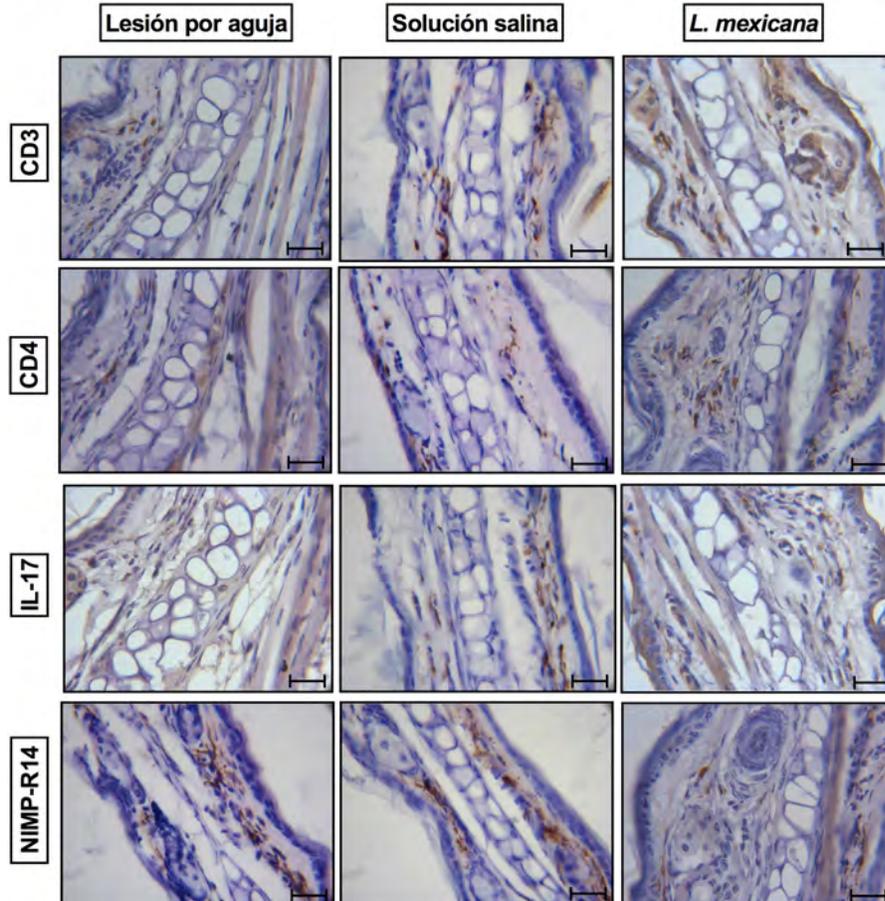
Hallazgos microscópicamente similares entre ambas cepas de ratón (A-BALB/c y B-C57BL6) donde pueden observarse cambios en el grosor del epitelio y tejido conectivo debido al aumento de la densidad celular asociada a la inflamación, también es posible apreciar acantosis (C), mayor producción de queratina (D y H) y la presencia de vasos sanguíneos (E) relacionados a numerosos parásitos ya sea libres en el tejido o contenidos dentro de queratinocitos, fagosomas, VPs o en estructuras similares a NETs (F y G). Estas diferencias se resumen en la tabla 1 de resultados.

INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES C57BL/6: DÍA 0

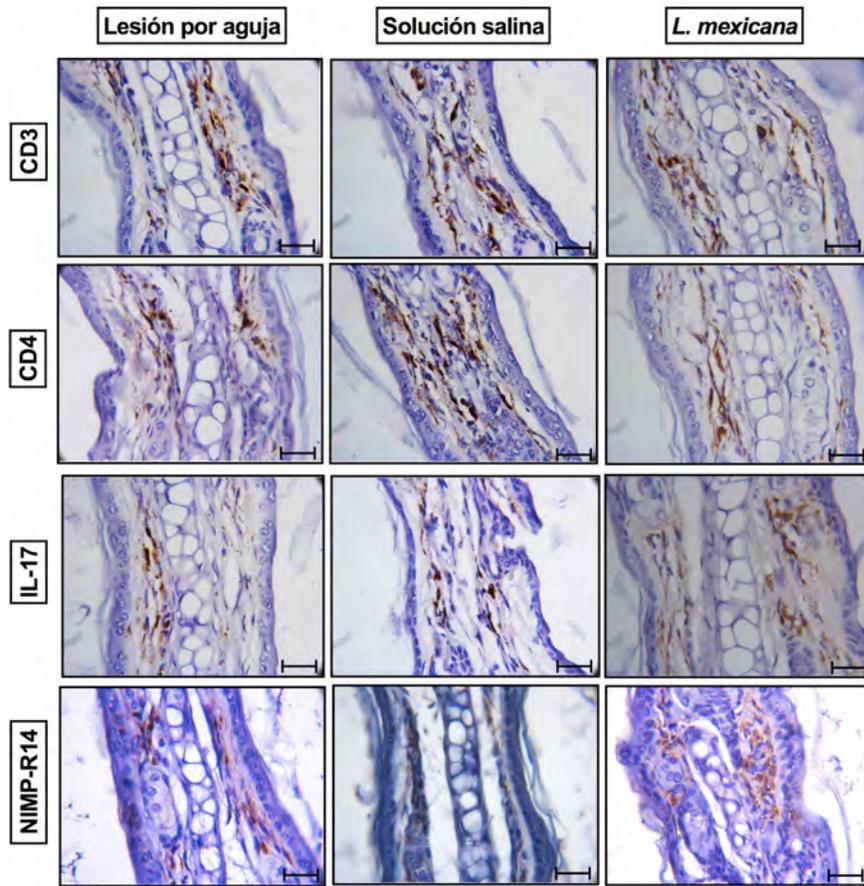
SIN TRATAMIENTO



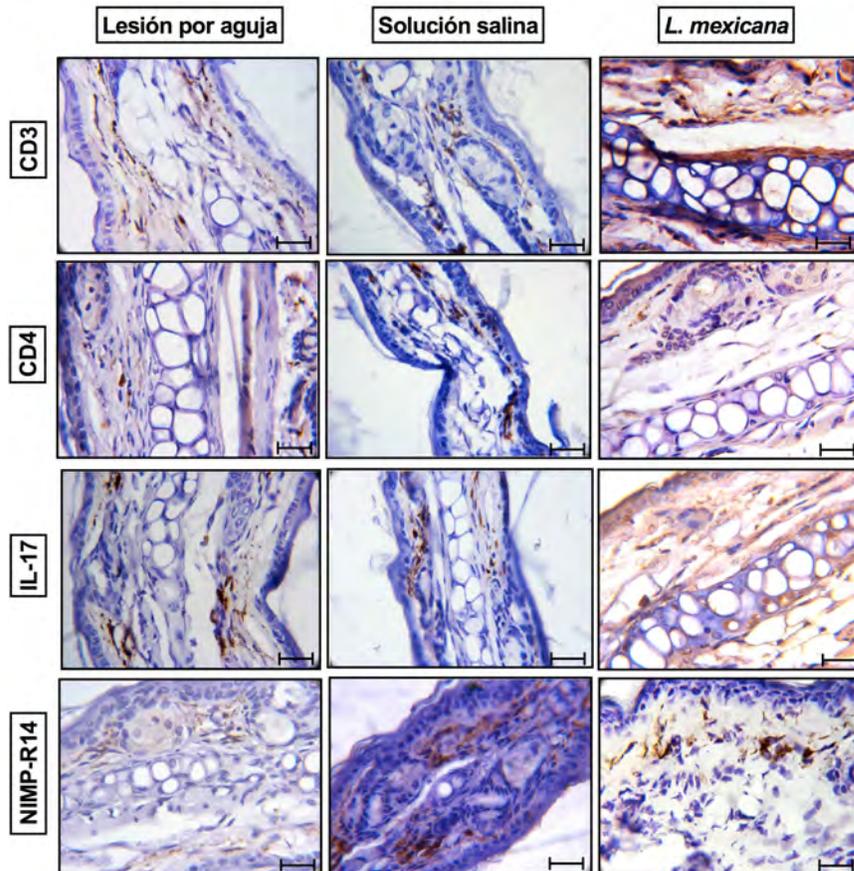
INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES C57BL/6: DÍA 1



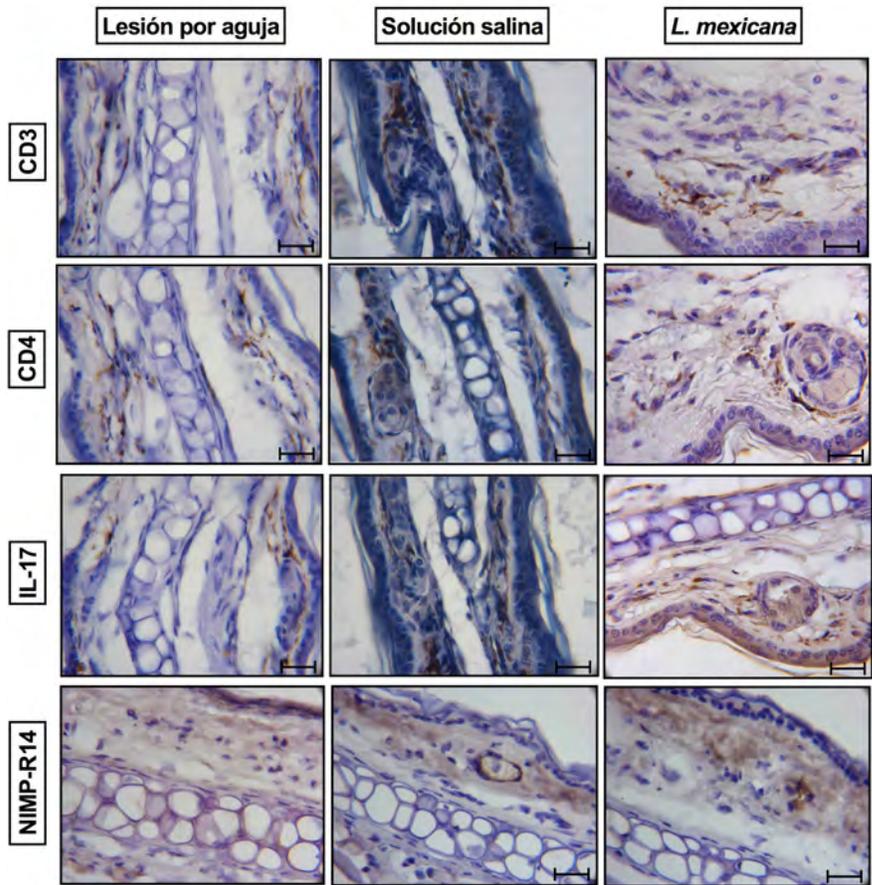
INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES C57BL/6: DÍA 4



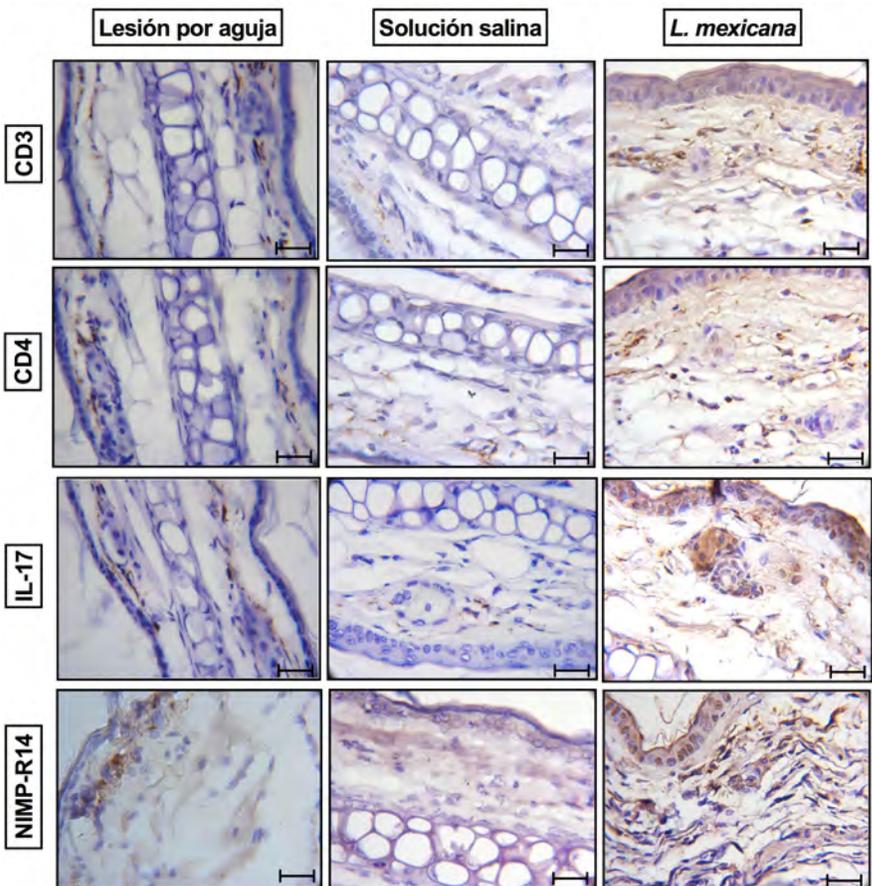
INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES C57BL/6: DÍA 5



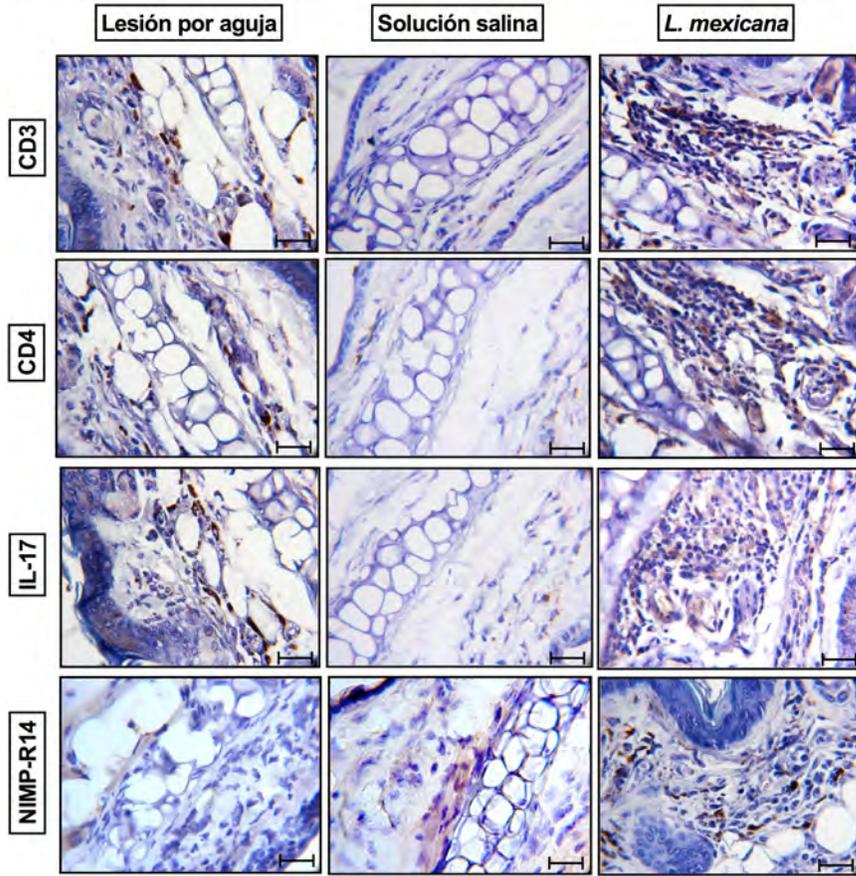
INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES C57BL/6: DÍA 7



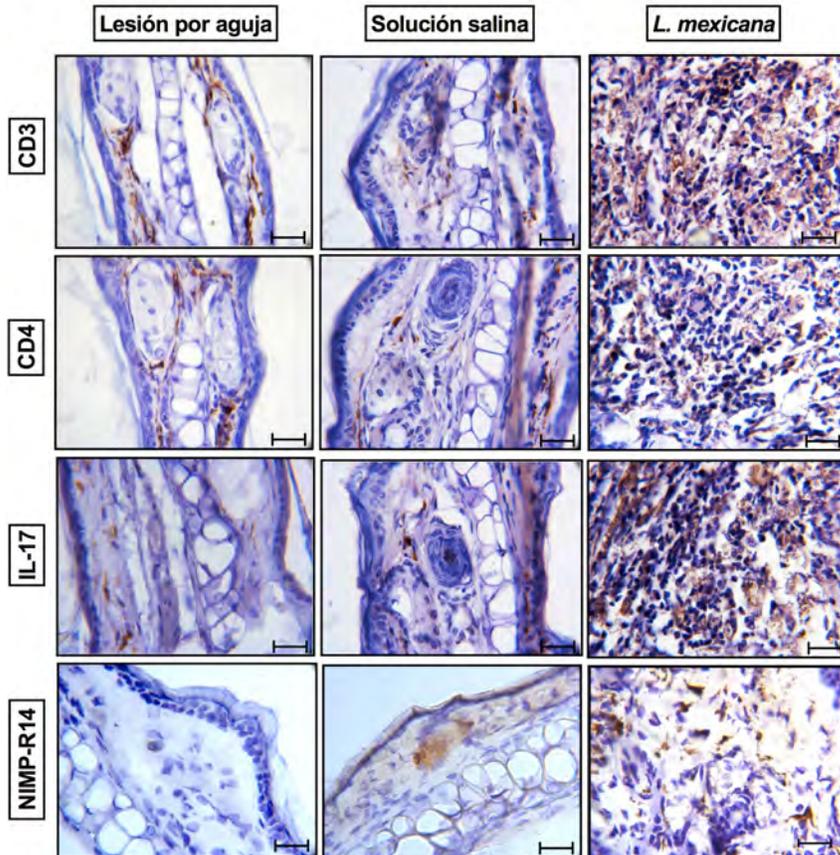
INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES C57BL/6: DÍA 14



INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES C57BL/6: DÍA 28

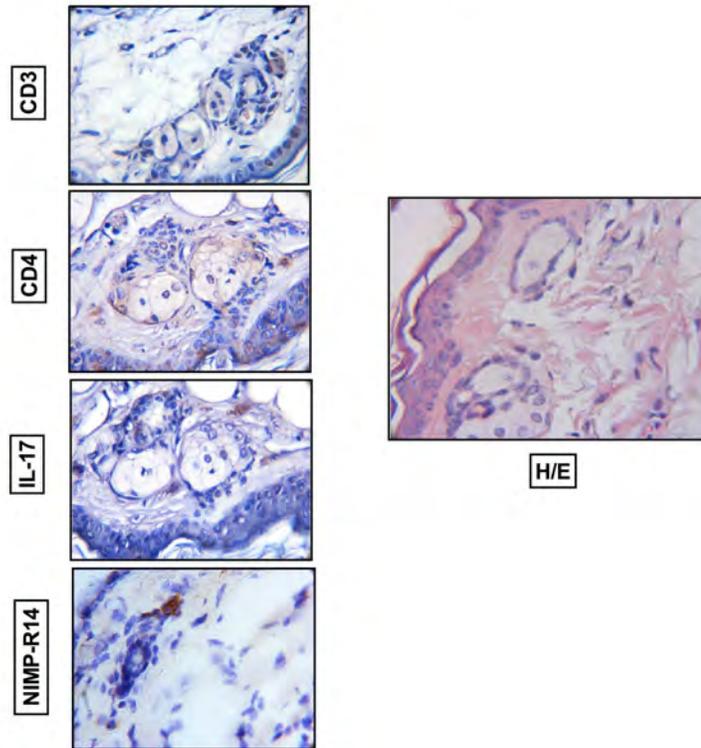


INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES C57BL/6: DÍA 90

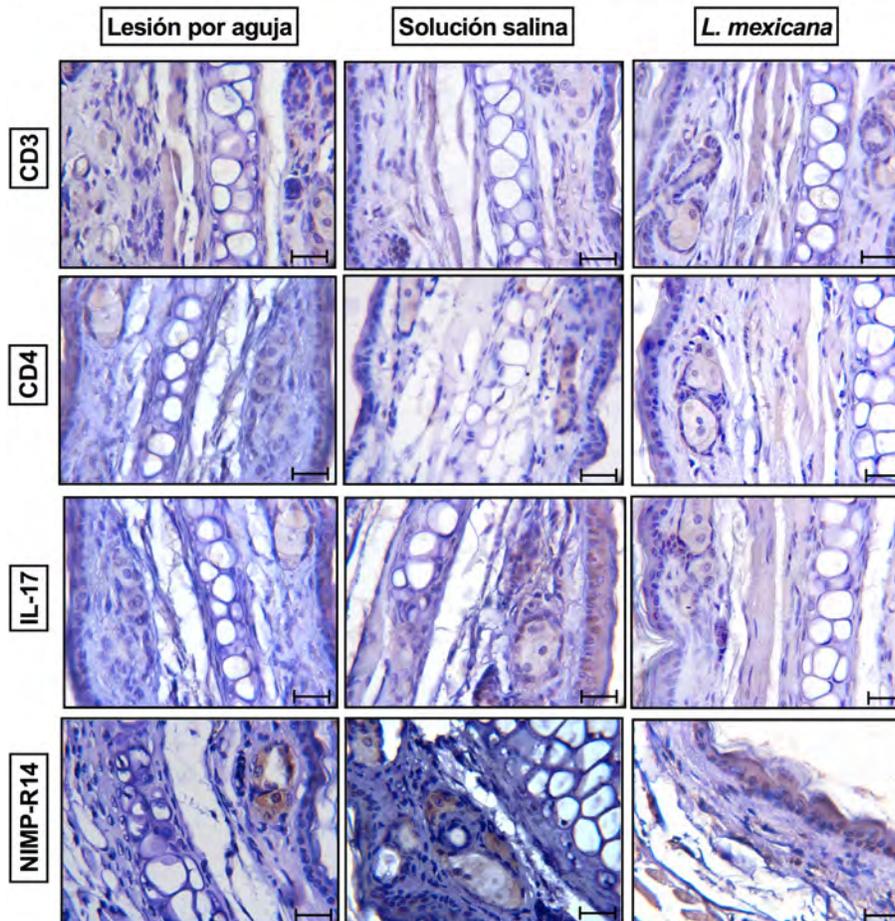


INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES BALB/c: DÍA 0

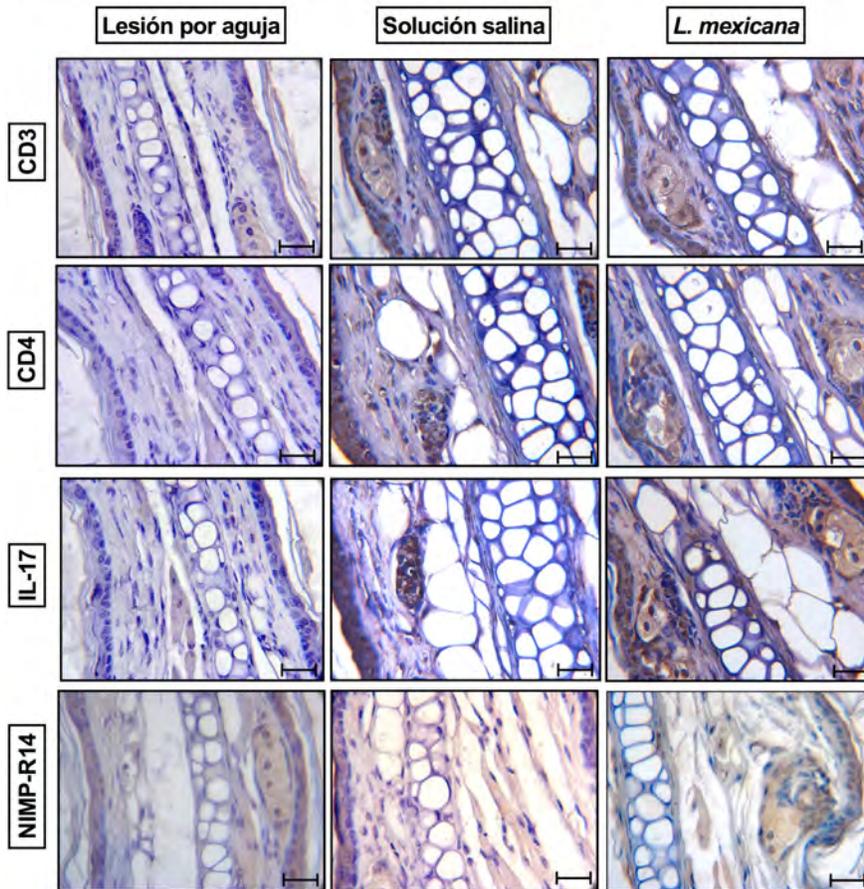
SIN TRATAMIENTO



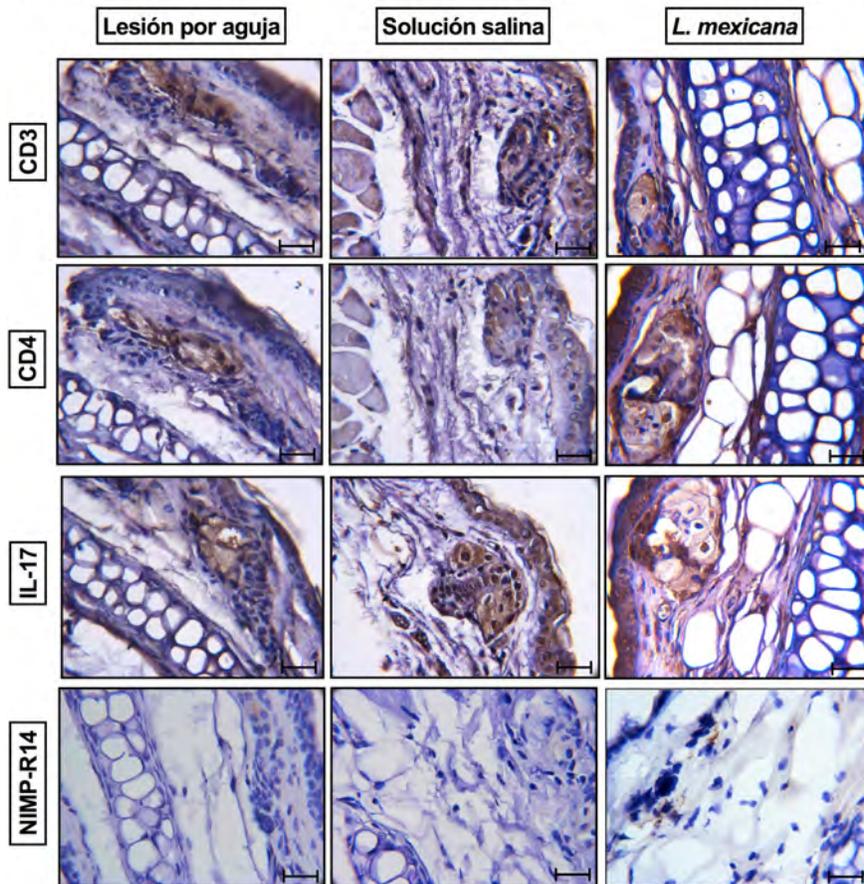
INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES BALB/c: DÍA 1



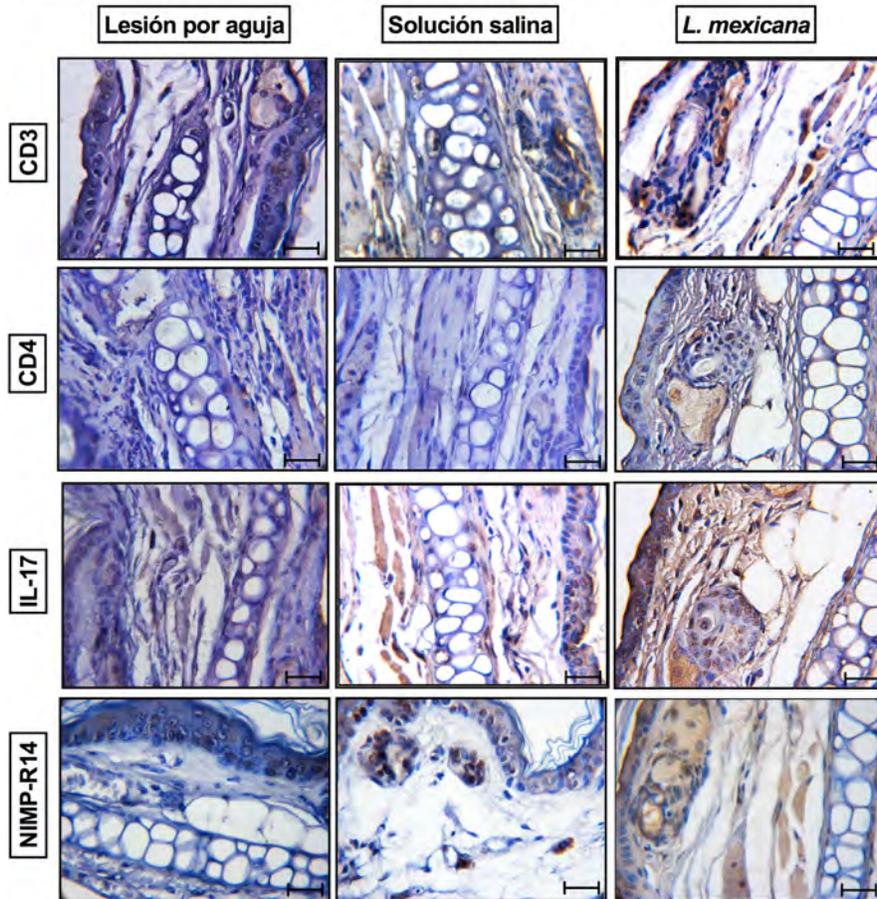
INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES BALB/c: DÍA 4



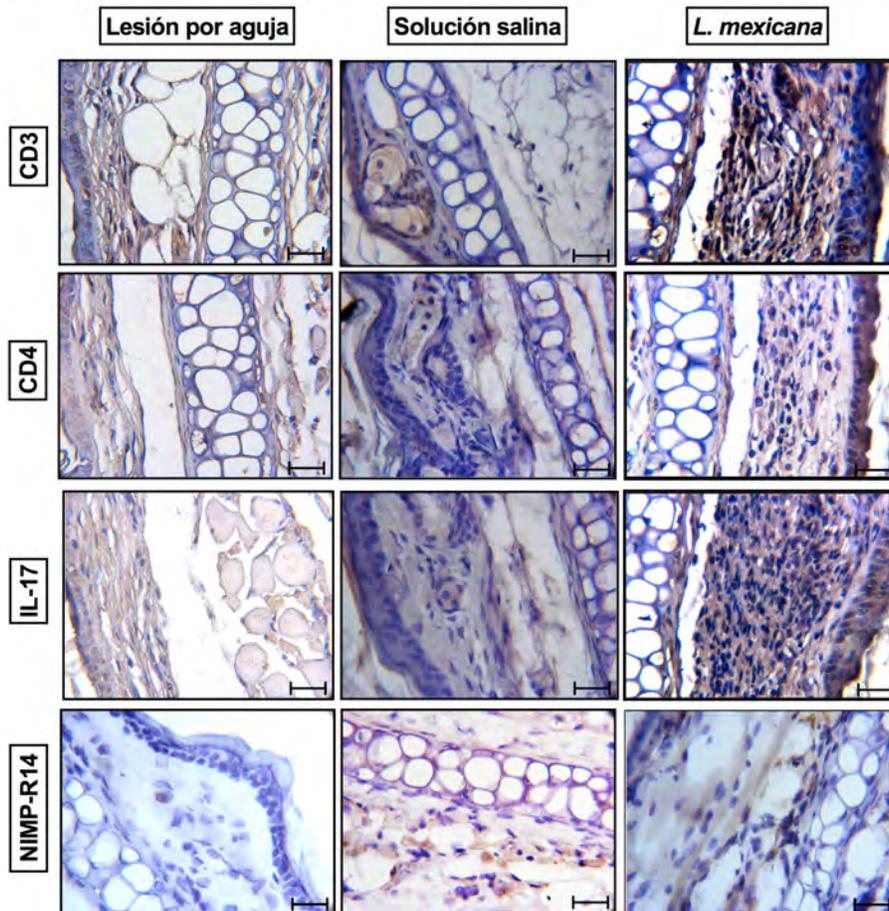
INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES BALB/c: DÍA 5



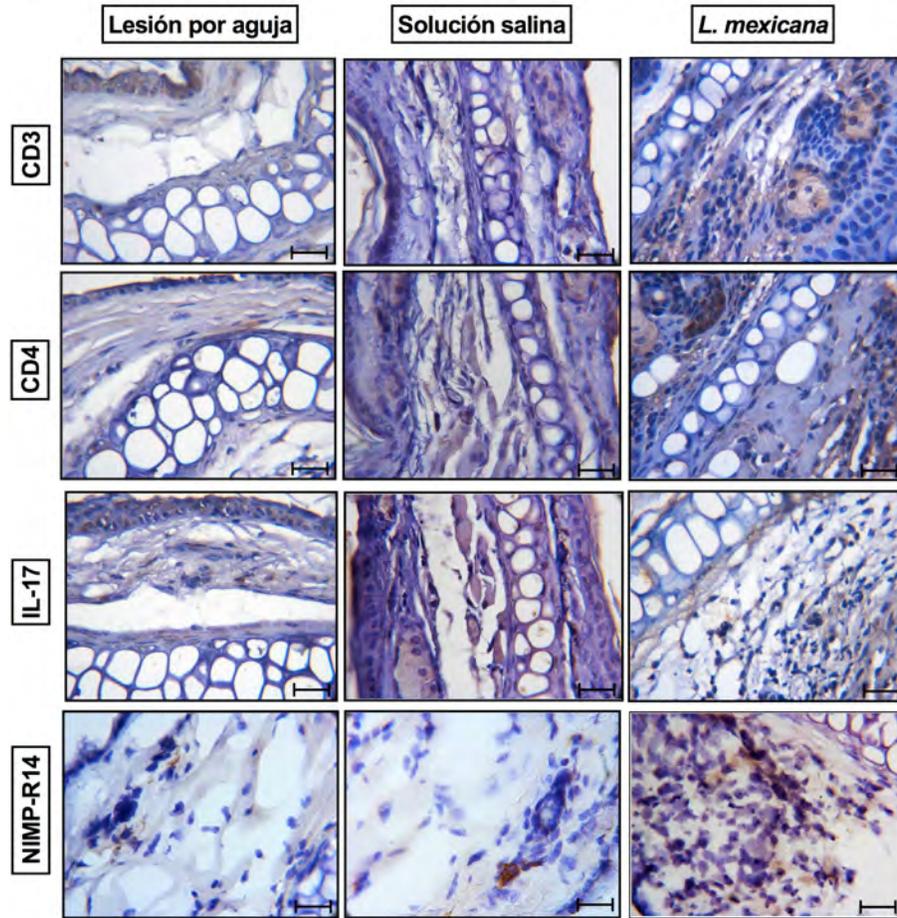
INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES BALB/c: DÍA 7



INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES BALB/c: DÍA 14



INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES BALB/c: DÍA28



INMUNOHISTOQUÍMICA DE MUESTRAS DE RATONES BALB/c: DÍA90

