



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

“PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS  
CEBADAS EN LA RESPUESTA INMUNE  
INNATA CONTRA LEISHMANIASIS”

# **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**MÓNICA IRAÍS VILLASEÑOR CARDOSO**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER

MÉXICO, D. F.

JUNIO DE 2008



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**

- Agradezco al **Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM** por el apoyo para realizar mis estudios de Doctorado.
- Este trabajo fue apoyado por CONACyT: 47256 y PAPIIT: IN221806-3
- Durante la realización de los estudios de doctorado se me otorgó la beca de CONACyT con número de registro 176722 y beca mixta para estancias en el extranjero.de CONACyT
- Agradezco a mi Comité Tutorial: Dra Ingeborg Becker Fauser, Dra Edda Sciutto Conde y Dr Edgar Zenteno Galindo.
- Agradezco a los sinodales por la revisión de esta tesis: Dra Ingeborg Becker Fauser, Dra Edda Sciutto Conde y Dr Edgar Zenteno Galindo, Dra Ana Flisser Steinbruch, Dra Claudia González Espinosa, Dr Constantino III Roberto López Macías y Dr Enrique Ortega Soto.
- Este trabajo se realizó en el laboratorio de inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Dra Becker por haberme permitido realizar mis estudios de doctorado bajo su tutoría y en el laboratorio a su cargo.
- A la Dra Norma Salaiza del laboratorio de inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental por el apoyo técnico en el conteo de células.
- Al Dr Armando Pérez del laboratorio de biología celular y tisular de la Facultad de Medicina por su ayuda en la interpretación de las preparaciones histológicas.
- Al M en C José Delgado del laboratorio de inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental por su ayuda con los ensayos de citometría de flujo.
- Al M en C Espiridión Ramos Martínez del laboratorio de patología experimental del Departamento de Medicina Experimental por su ayuda en la revisión y crítica de este manuscrito.
- Al MVZ Daniel Sánchez del bioterio del Departamento de Medicina Experimental por su apoyo en el mantenimiento de los animales empleados para la elaboración de este trabajo.
- Al técnico en computación Marco Gudiño del Departamento de Medicina Experimental por su apoyo en la digitalización de las imágenes.

# **DEDICATORIA**

**A MIS PADRES EDITH Y JAIME**

**A MI HERMANA EDITH M**

**A ESPIRI**

<b>INDICE</b>	24
Lista de Figuras-----	I 24
Lista de Tablas-----	II 25
Abreviaturas-----	III 26
Resumen-----	V 26
Abstract-----	VI 26
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> -----	1 27
1.1 Formas clínicas de leishmaniasis-----	1 28
1.2 Ciclo de vida-----	3 28
1.3 Moléculas en la superficie del parásito-----	4 28
1.3.1 LPG-----	5 29
1.4 Evasión de la respuesta inmune-----	6 30
1.5 Respuesta inmune del hospedero-----	7 30
1.5.1 Respuesta inmune adaptativa-----	7 31
1.5.2 Respuesta inmune innata-----	8 34
1.6 Células cebadas-----	10 30
1.6.1 Células cebadas en la inmunidad innata-----	10 30
1.7 Activación de las células cebadas-----	13 33
1.7.1 Receptores de manosa-----	13 33
1.7.2 Receptores de complemento-----	14 34
1.7.3 Receptores Fc-----	14 34
1.7.4 Receptores TLR-----	14 34
1.7.5 TLR en el reconocimiento de patógenos-----	16 36
1.8 Modelos murinos de leishmaniasis-----	17 37
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> -----	20 37
<b>III. HIPÓTESIS</b> -----	22 39
<b>IV. OBJETIVOS</b> -----	22 39
4.1 Objetivos Generales-----	22 39
4.2 Objetivos Particulares-----	22 39
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	

5.1 Ratones-----	24
5.2 Purificación de LPG-----	24
5.3 Generación de células cebadas derivadas de médula ósea de ratón-----	25
5.3.1 Estimulación <i>in vitro</i> de células cebadas-----	25
5.4 Cuantificación de citocinas-----	26
5.5 Análisis de la expresión de TLR2 en la membrana de las células cebadas	26
5.6 Liberación de $\beta$ -hexosaminidasa-----	27
5.7 Infección de ratones con parásitos de <i>L. mexicana</i> -----	28
5.7.1 Conteo de parásitos en lesiones de ratones infectados con <i>L. mexicana</i>	28
5.7.2 Estudios de microscopía electrónica-----	28
5.8 Análisis estadístico-----	29
<b>VI. RESULTADOS</b>	
6.1 Obtención de células cebadas-----	30
6.2 Cuantificación de citocinas y quimiocinas-----	31
6.3 Expresión de TLR2 en la membrana de células cebadas-----	34
6.4 Desgranulación de células cebadas <i>in vitro</i> , estimuladas con LPG-----	36
6.5 Cuantificación del número de células cebadas en lesiones de ratones	40
infectados con <i>L. mexicana</i> -----	38
6.6 Desgranulación <i>in vivo</i> de células cebadas en lesiones de ratones	41
infectados con <i>L. mexicana</i> -----	39
6.7 Número de parásitos en lesiones de ratones infectados con <i>L. mexicana</i>	40
6.8 Análisis histológicos en lesiones de ratones infectados con <i>L. mexicana</i>	42
6.9 Microscopía electrónica en lesiones de ratones infectados con <i>L.</i>	
<i>mexicana</i> -----	42
<b>VII. DISCUSIÓN</b> -----	44
<b>VIII. CONCLUSIÓN</b> -----	51
<b>IX. REFERENCIAS</b> -----	52
<b>X. ANEXOS</b> -----	56



**Lista de Figuras.**

Figura 1. Formas clínicas de leishmaniasis-----	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> -----	4
Figura 3. Estructura de LPG de <i>Leishmania</i> -----	6
Figura 4. Diagrama de la respuesta inmune adaptativa durante una infección causada por <i>Leishmania</i> -----	9
Figura 5. Tinción de células cebadas y expresión del receptor CD117-----	30
Figura 6. Cuantificación de citocinas y quimiocinas producidas por células cebadas estimuladas con LPG de <i>L. mexicana</i> -----	32
Figura 7. Expresión de TLR2 en la membrana celular de células cebadas estimuladas con LPG de <i>L. mexicana</i> -----	35
Figura 8. Desgranulación <i>in vitro</i> de células cebadas estimuladas con LPG de <i>L. mexicana</i> -----	37
Figura 9. Número de células cebadas en lesiones de ratones infectados con <i>L. mexicana</i> -----	38
Figura 10. Desgranulación <i>in vivo</i> de células cebadas en lesiones de ratones infectados con <i>L. mexicana</i> -----	40
Figura 11. Número de parásitos en lesiones de ratones infectados con <i>L.</i> <i>mexicana</i> -----	41
Figura 12. Análisis histológico en lesiones de ratones infectados con <i>L.</i> <i>mexicana</i> -----	41



## Lista de Tablas

Tabla 1. Participación de las células cebadas en infecciones causadas por diferentes patógenos-----

13

BMMC	Célula Cebada Derivada de Médula Ósea
C3bi	C3b inactivo
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CR	Receptor de Complemento
CTMC	Célula Cebada de Tejido Conectivo
DC	Célula Dendrítica
ELISA	Ensayo de inmuno Absorción Ligado a Enzima
FcεR	Receptor de IgE
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
ICAM	Molécula de Adhesión Intracelular
LRR	Repeticiones Ricas en Leucina
IFN-γ	Interferón Gama
IL	Interleucina
JAK	Janus Cinasa
LCD	Leishmaniasis Cutánea Diseminada
LCL	Leishmaniasis Cutánea Localizada
LMC	Leishmaniasis Mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
LV	Leishmaniasis Visceral
MAC	Complejo de Ataque a la Membrana
MAPK	MAP Cinasas
MBP	Proteína Unidora de Manosa
MCP-1	Proteína 1 Quimiofáctica para Macrófagos
MCT	Célula Cebada con Triptasa

## Abreviaturas

<b>AB/S</b>	Azul Alciano/Safranina
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>BMMC</b>	Célula Cebada Derivada de Médula Ósea
<b>C3bi</b>	C3b inactivo
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CR</b>	Receptor de Complemento
<b>CTMC</b>	Célula Cebada de Tejido Conectivo
<b>DC</b>	Célula Dendrítica
<b>ELISA</b>	Ensayo de Inmuno Absorción Ligado a Enzima
<b>FcεR</b>	Receptor de IgE
<b>GM-CSF</b>	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>ICAM</b>	Molécula de Adhesión Intracelular
<b>LRR</b>	Repeticiones Ricas en Leucina
<b>IFN-γ</b>	Interferón Gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>JAK</b>	Janus Cinasa
<b>LCD</b>	Leishmaniasis Cutánea Diseminada
<b>LCL</b>	Leishmaniasis Cutánea Localizada
<b>LMC</b>	Leishmaniasis Mucocutánea
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LT</b>	Leucotrieno
<b>LV</b>	Leishmaniasis Visceral
<b>MAC</b>	Complejo de Ataque a la Membrana
<b>MAPK</b>	MAP Cinasas
<b>MBP</b>	Proteína Unidora de Manosa
<b>MCP-1</b>	Proteína 1 Quimiotáctica para Macrófagos
<b>MCt</b>	Célula Cebada con Triptasa

<b>MCtc</b>	Célula Cebada con Triptasa-Quimasa
<b>mg</b>	Miligramos
<b>MHCII</b>	Complejo Principal de Histocompatibilidad II
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Proteína Inflamatoria de Macrófagos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>MMC</b>	Célula Cebada de Mucosas
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>NK</b>	Célula Asesina Natural
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>O<sub>2</sub></b>	Anión Superóxido
<b>PAMP</b>	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
<b>PAR</b>	Receptores de Proteasas
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PGN</b>	Peptidoglicano
<b>PMA</b>	Acetato Formol Miristato
<b>PTK</b>	Proteína Tirosina Cinasa
<b>sAP</b>	Fosfatasa Ácida secretada
<b>SCF</b>	Factor de Células Progenitoras
<b>sPPG</b>	Proteofosfoglicano secretado
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante $\beta$
<b>Th</b>	T ayudadora
<b>TLR</b>	Receptor tipo-toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
<b>WT</b>	Cepa Silvestre
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitros

## **Resumen.**

El efecto regulador de las células cebadas en la patogénesis de leishmaniasis aun no es del todo claro. En este trabajo se realizó un análisis comparativo de la expresión de TLR2 en la membrana, producción de TNF- $\alpha$ , IL-10 y MIP-1 $\alpha$  y desgranulación de células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC) de ratones susceptibles BALB/c y resistentes C57BL/6, estimulados *in vitro* con LPG de *Leishmania mexicana*. Adicionalmente, se estudió la cinética de desgranulación y número de parásitos en las lesiones de ambas cepas de ratón infectadas con *Leishmania mexicana*. Encontramos que las BMMC de los ratones C57BL/6 expresaron más TLR2 y produjeron altos niveles de TNF- $\alpha$ , IL-10 y MIP-1 $\alpha$ , mientras que las células de los ratones BALB/c aumentaron la liberación de gránulos. Las lesiones de los ratones BALB/c mostraron altos niveles de desgranulación a las 3 horas de infección, después de 3 días de infección, el número de células cebadas desgranuladas en C57BL/6 fue mayor que en las lesiones de los ratones BALB/c. A través de la infección, los ratones BALB/c presentaron mayor carga parasitaria. El efecto regulador de las células cebadas parece depender del fondo genético del hospedero: las células cebadas de los ratones BALB/c facilitan la progresión de la enfermedad debido al aumento de la respuesta inflamatoria en etapas tempranas de la infección, mientras que las células cebadas de los ratones C57BL/6 producen citocinas que regulan la inflamación y mantienen elevado el número de células inmunes en las lesiones, promoviendo el control de la enfermedad.

**Abstract**

The regulatory effect of mast cells on the pathogenesis of leishmaniasis is unclear. We report a comparative analysis of TLR2 membrane expression, TNF- $\alpha$ , IL-10 and MIP-1 $\alpha$  production and granule release of bone marrow-derived mast cells (BMMC) from susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice, stimulated *in vitro* with *Leishmania mexicana* LPG. We studied the kinetics of mast cell degranulation and parasite numbers in lesions of both mouse strains infected with *Leishmania mexicana*. We found that BMMC of C57BL/6 mice expressed more TLR2 and produced higher levels of both cytokines and MIP-1 $\alpha$ , whereas BALB/c BMMC significantly augmented their granule release. Lesions of BALB/c mice showed higher levels of degranulated mast cells at three hours of infection, whereas after three days of infection, the number of degranulated mast cells in C57BL/6 was higher than in BALB/c lesions. Throughout infection, BALB/c mice harbored more parasites. The regulatory effect of mast cells seems to depend on the genetic background of the host: mast cells of BALB/c mice facilitate disease progression due to an augmented inflammatory response early in the infection, whereas mast cells of C57BL/6 mice produce cytokines that regulate inflammation and maintain an elevated number of immune cells in the lesions, promoting disease control.

## I. Introducción.

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria con una prevalencia estimada de 12 millones de personas infectadas en el mundo y la población en riesgo es de 350 millones. La leishmaniasis tiene distribución mundial y afecta a 88 países [1]. Es endémica en 60 países incluyendo los de Europa, el norte de África, de América del sur, América central y la India. No es endémica en Australia ni en el sureste de Asia [2].

Las primeras descripciones de la enfermedad datan de los años 1500 a 255 A.C. En 1824 en la India se publicaron los primeros reportes del Kala azar, una forma clínica de leishmaniasis que afecta el hígado y la cual fue confundida con otras enfermedades principalmente malaria. Fue hasta 1900 cuando se descubre el parásito *Leishmania donovani* por Leishman y Donovan [3].

**Formas Clínicas de leishmaniasis.** Existen 4 formas clínicas de la leishmaniasis: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), leishmaniasis cutánea difusa (LCD), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV). Figura 1.

Leishmaniasis cutánea localizada (LCL): Se caracteriza por la presencia de úlceras únicas e indoloras. En algunas ocasiones las lesiones pueden curar espontáneamente en un periodo que comprende de los 6 meses a los 2 años; sin embargo, pueden quedar recidivas. Las lesiones de estos pacientes presentan infiltrados de macrófagos vacuolados llenos de amastigotes en la dermis y dan al infiltrado la apariencia de granuloma. En general, se considera que los pacientes con LCL presentan una respuesta inmune celular adecuada con predominio de células CD4+ tipo Th1 [4].



Leishmaniasis cutánea difusa (LCD): Se caracteriza por nódulos en toda la piel del cuerpo, exceptuando cuero cabelludo y plantas de pies y manos. En esta forma clínica los parásitos se diseminan por vía linfática o hemática. En los pacientes con LCD existe una respuesta tipo Th2, la cual puede exacerbar el cuadro clínico [5].

Leishmaniasis mucocutánea (LMC): En esta forma clínica los pacientes comienzan con eritema y ulceraciones en la nariz, llevando a la perforación del septo nasal y lesiones inflamatorias destructivas. Posteriormente puede ocurrir obstrucción de la faringe o laringe y producir desfiguraciones [5].

Leishmaniasis visceral (LV): Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre, debilidad, sudor nocturno, anorexia, pérdida de peso, esplenomegalia, leucopenia o trombocitopenia e hipergamaglobulinemia. Con el paso del tiempo si no se trata la enfermedad su puede producir caquexia, sangrado, susceptibilidad a infecciones secundarias y muerte [4].

## Formas clínicas de leishmaniasis

Leishmaniasis Cutánea Localizada



Leishmaniasis Mucocutánea (LMC)



Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)



Leishmaniasis Visceral (LV)



Figura 1. Formas clínicas de leishmaniasis: Leishmaniasis cutánea Localizada y Cutánea Difusa. Leishmaniasis Mucocutánea. Leishmaniasis Visceral.

**Ciclo de vida.** En la leishmaniasis el mamífero se infecta cuando es picado por el vector flebótomino *Lutzomyia*. Cuando el insecto pica al huésped vertebrado, introduce la probóscide en la piel y lacera los vasos sanguíneos causando hemorragias. Se alimenta a partir de estas lesiones y durante su alimentación regurgita los parásitos (de 1 a 1000) en forma de promastigotes metacíclicos. Los promastigotes son fagocitados por macrófagos, transformándose en amastigotes dentro de vacuolas lisosomales en donde posteriormente se dividen por fisión binaria causando ruptura del macrófago y liberando a los parásitos, los cuales infectan a células aledañas. El ciclo continua cuando un mosquito se alimenta del huésped infectado. En el intestino del vector, el parásito se diferencia a

promastigote metacíclico, en este estado migra hacia la probóscide del mosquito y es introducido al nuevo hospedero cuando el vector pica para alimentarse [6]. Figura 2.

### Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

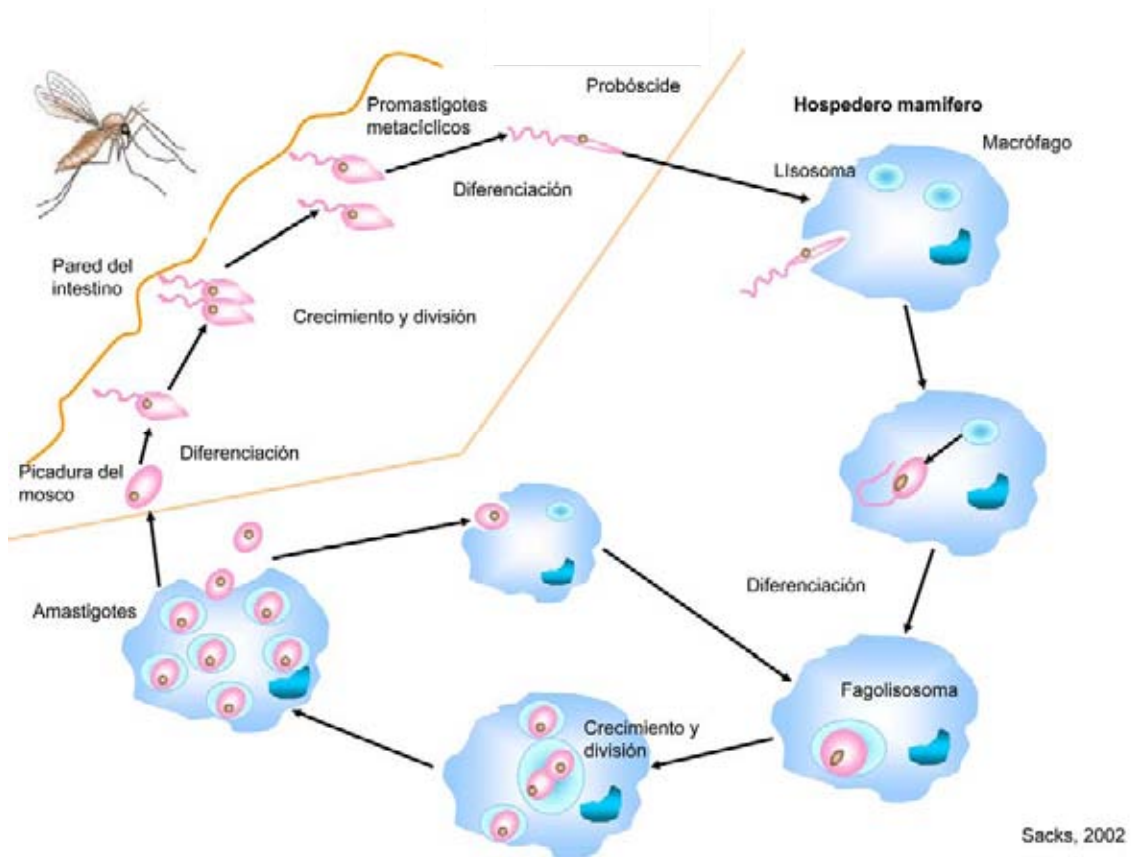


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania*.

**Moléculas en la superficie del parásito.** *Leishmania* expresa en su superficie moléculas que tienen un papel importante en la defensa del parásito en contra de los mecanismos microbicidas del hospedero. La atención se ha enfocado hacia una familia de glicoconjugados llamados fosfoglicanos, que comparten la

estructura:  $\text{PO}_4\text{-6Gal } (\beta \text{ 1-4) Man } \alpha \text{ 1}$ . Estas moléculas están unidas a la superficie celular por anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que incluye lipofosfoglicano (LPG), proteofosfoglicano (PPG) y la metaloproteasa gp63. También pueden ser secretadas como proteínas que contienen fosfoglicanos, estas incluyen el proteofosfoglicano secretado (sPPG) y la fosfatasa ácida secretada (sAP). Todas las especies de *Leishmania* expresan por lo menos dos de estos fosfoglicanos [7].

**LPG.** La molécula más abundante es LPG, forma un denso glicocálix, que cubre la superficie del parásito incluyendo el flagelo, por lo que es importante en la virulencia y sobrevivencia del parásito en el vector y dentro del huésped.

Estructuralmente la LPG consta de cuatro dominios: 1) un casquete de sacáridos, 2) unidades repetidas de fosfodisacáridos compuestos de galactosa y manosa, 3) un centro de fosfosacáridos y 4) un lisofosfatidilinositol [8]. (Figura 3).

Las cadenas de fosfoglicanos de las LPGs están cubiertas con pequeñas estructuras de oligosacáridos que contienen manosa, las cuales varían en cantidad y composición en diferentes especies. Por ejemplo, en *L. donovani* no se cambia la cadena de fosfoglicanos, mientras que en *L. mexicana* el 30 % de estas cadenas se cambian por glucosa y en *L. major* por galactosa y arabinosa. En todas estas LPGs, las cadenas laterales se unen exclusivamente en la posición C-3 de la galactosa en la columna de disacáridos. [9].

### Estructura de LPG de *Leishmania*

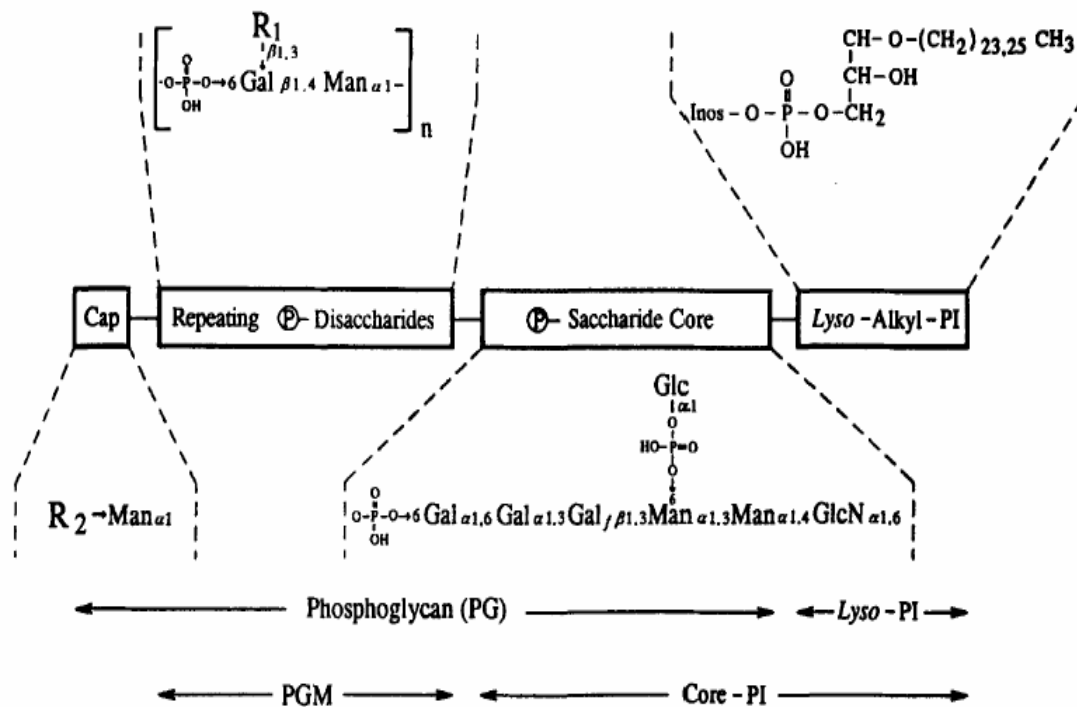


Figura 3. Estructura de LPG de *Leishmania*. Se muestra la región del casquete de sacáridos, región de fosfodisacáridos, centro de sacáridos fosforilados y región de liso fosfatidilinositol (Turco, 1996)

**Evasión de la respuesta inmune.** Cuando los parásitos son inoculados dentro del mamífero, tienen que enfrentarse a la respuesta inmune del hospedero para poder establecer la infección.

En el torrente sanguíneo, se protege de la lisis del complemento debido a que las largas cadenas de LPG que cubren a los promastigotes metacíclicos evitan el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana (MAC). *L. donovani* evita la formación de MAC y lisis mediante distintos mecanismos, como la formación de C3bi la cual no participa en la formación de la convertasa C5 [10].

El siguiente paso durante el proceso infeccioso es la unión del parásito con la célula hospedera. Las terminaciones de manosa presentes en el casquete de LPG se unen a componentes del suero como la proteína que une manosas (Manose-binding protein: MPB) que actúa como activador de la cascada del complemento llevando a la formación de C3 convertasa y C3b, la cual participa en la unión al macrófago [10]. Una vez que el parásito se adhiere a las células fagocíticas, los promastigotes opsonizados con C3b y C3bi son fagocitados mediante receptores de complemento CR1 y CR3, evitando la activación del estallido respiratorio, uno de los mecanismos leishmanicidas más potentes. *Leishmania* puede utilizar otros receptores de la célula hospedera para ser fagocitado como receptores Fc, receptores de manosa-fucosa y receptores tipo lectina que reconocen a LPG [11].

Dentro de la célula hospedera, el parásito se ubica dentro del fagosoma, el cual poco tiempo después se fusiona con lisosomas para formar el fagolisosoma o vacuola parasitófora, que es un compartimiento ácido que es rico en péptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas [12]. Sin embargo, LPG de *Leishmania* puede inhibir la fusión fagosoma-lisosoma evitando la unión de las membranas [10,12].

**Respuesta inmune del hospedero.** La respuesta inmune en leishmaniasis es tanto adaptativa como innata, ésta se ha estudiado en modelos murinos, encontrándose que el ratón BALB/c es naturalmente susceptible a la leishmaniasis, mientras que el ratón C7BL/6 es resistente.

**1.5.1 Respuesta inmune adaptativa.** En modelos murinos de leishmaniasis se encontró que el control de la infección es dependiente del desarrollo de una respuesta Th1. El control de la enfermedad se inicia con el reclutamiento de



linfocitos Th1 CD4+ y CD8+ específicas para *Leishmania* hacia los sitios de infección. El IFN- $\gamma$  liberado por el infiltrado de células Th1 activa a los macrófagos y les permite producir oxígeno reactivo e intermediarios de nitrógeno (óxido nítrico), lo que favorece la eliminación de los amastigotes que se encuentran dentro de los macrófagos infectados [13].

Los ratones susceptibles BALB/c no pueden controlar la enfermedad debido al predominio de la respuesta inmune tipo Th2 que inhibe la liberación de IL-12 a causa de la producción de IL-4 en etapas tempranas de la infección [13]. Figura 4. Al igual que los linfocitos T CD4+, los linfocitos T CD8+ también son requeridos para controlar la leishmaniasis y contribuir a una eficiente respuesta inmune protectora. Por ejemplo, después de infectar ratones con bajas dosis de parásitos, las células T CD8+ aseguran una respuesta Th1, más que una respuesta Th2 y contribuir a proteger durante una infección secundaria. [14].

**Respuesta inmune innata.** En la leishmaniasis, muchos de los eventos inmunológicos descritos hasta el momento son debidos a estudios realizados en modelos murinos. La respuesta inmune anti-*Leishmania* puede ser dividida en distintas fases enfatizando los tipos celulares que son activados en cada etapa. La primera fase consiste en migración y activación de células de la respuesta inmune innata (células cebadas, neutrófilos y monocitos) y se desarrollan lesiones en la piel. La segunda fase se caracteriza por la infiltración de células dendríticas y linfocitos T en la lesión. Finalmente, en el estado crónico, la persistencia de parásitos contribuye a la progresión de la enfermedad [15]. Los macrófagos residentes de la piel son los encargados del reclutamiento de células efectoras

(neutrófilos, eosinófilos y células cebadas), las cuales están involucradas en la formación del granuloma y la eliminación de microorganismos en el sitio de infección.

### Respuesta inmune durante una infección por *Leishmania*

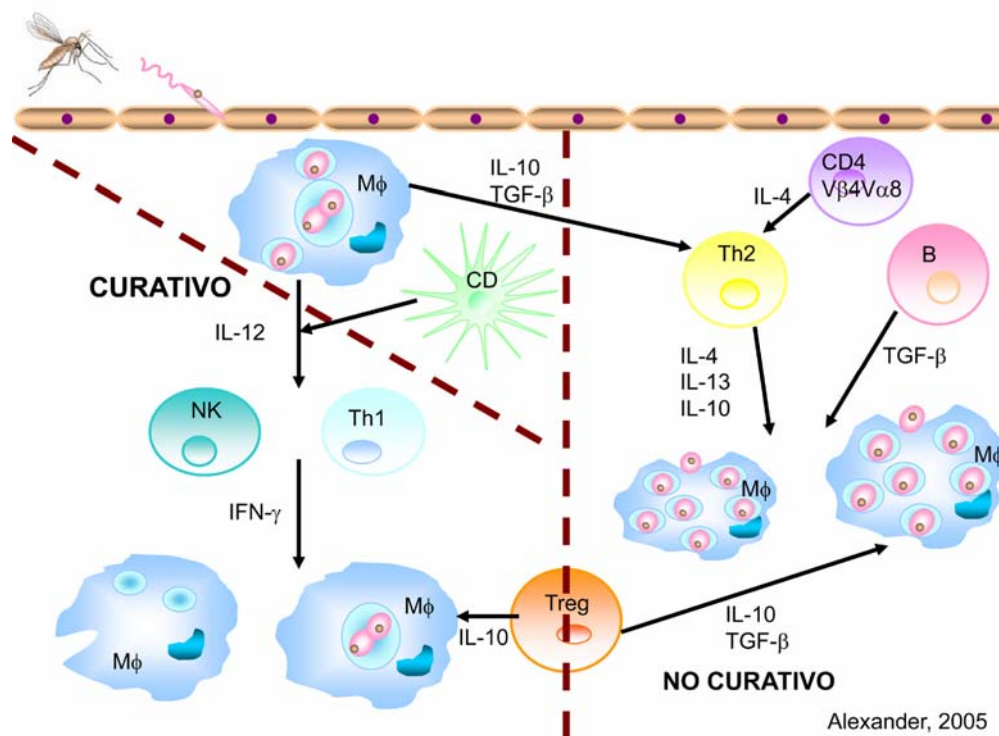


Figura 4. Diagrama de la respuesta inmune adaptativa durante una infección causada por *Leishmania*. El promastigote es inoculado a través de la picadura del vector, el cual se convierte en amastigote dentro del macrófago o la célula dendrítica. La célula infectada produce IL-12 que induce activación de células NK, diferencia linfocitos CD4<sup>+</sup> hacia un tipo Th1 e induce producción de IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  estimula en el macrófago la producción de óxido nítrico, que media la muerte del parásito induciendo una respuesta curativa. La inhibición de IL-12 o la producción de IL-4/IL-13 permiten la replicación del parásito dentro de la célula, la cual produce IL-10. La IL-10 producida por células Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> puede favorecer una enfermedad no curativa y mantener latente la infección.

Aun no está claro como se inicia este flujo inflamatorio durante la primera fase, pero existen indicios que señalan al complemento y a las células cebadas como responsables de este evento. Recientemente se ha demostrado que las células cebadas secretan TNF- $\alpha$  que promueve el flujo de neutrófilos, mientras que las quimiocinas atraen macrófagos al sitio de infección. Este hecho se basa

en estudios que demuestran que las células cebadas desgranulan intensamente en el sitio de inoculación de *Leishmania* [15].

**Células cebadas.** Las células cebadas se derivan de células madre de origen hematopoyético y presentan en su superficie el marcador CD34+, terminan su maduración migrando hacia tejido conectivo o mucosas, donde generalmente residen. En los mamíferos, las células cebadas se localizan en piel, vías respiratorias y tracto gastrointestinal, se distribuyen cerca de vasos sanguíneos, nervios, células del músculo liso, glándulas productoras de moco y folículos pilosos [16]. Las células cebadas tienen un periodo de vida largo (6 meses) y proliferan después de un estímulo adecuado. El aumento en el número de células cebadas, así como su distribución en los tejidos y cambios en el fenotipo pueden ocurrir después de un proceso infeccioso [16]. La supervivencia y proliferación de estas células puede ser regulado a nivel sistémico y localmente en los tejidos. Los factores iniciales que influyen en el número de células y su fenotipo son stem cell factor (SCF), que es el ligando del receptor c-kit, IL-3, IL-4 e IL-9, entre otros [16].

Las células cebadas de roedores son heterogéneas y se dividen en células de mucosas o de tejido conectivo. Esta clasificación se basa en su localización en el tejido, los patrones de tinción, el contenido de proteasas y su reactividad. Las células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC) pueden producirse cultivando progenitores de médula ósea en presencia de IL-3. Mientras que las células cebadas de tejido conectivo, que se encuentran principalmente en la piel y cavidad peritoneal, pueden obtenerse *in vitro* cultivando BMMC en medio con SCF [17].

**Células cebadas en la inmunidad innata.** Además de ser importantes en reacciones alérgicas, las células cebadas también juegan un papel importante en

la inmunidad innata iniciando respuestas en contra de patógenos como bacterias, virus, hongos y parásitos. Los mecanismos efectores de las células cebadas incluyen: reclutamiento celular a los sitios inflamados, activación de linfocitos, presentación de antígenos (debido a que expresan MHCII y moléculas co-estimuladoras como CD40 y CD80), polarización de células T (secreción de citocinas como IL-4, IL-13 e IL-5) y remodelación del tejido [18].

Las células cebadas murinas secretan citocinas como TNF- $\alpha$  y quimiocinas como MIP-2 (análogo en humanos a IL-8), que reclutan neutrófilos y linfocitos T, mientras que leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) atrae al sitio de infección linfocitos CD8+. El TNF- $\alpha$  además de funcionar como quimiocina, también puede contribuir a la migración de células dendríticas [19]. Otros mediadores secretados por las células cebadas, como IL-4, IL-13 y LTC<sub>4</sub> (además de TNF- $\alpha$ ), contribuyen a la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales [18].

Las células cebadas secretan mediadores preformados como histamina que tiene diversos efectos sobre la respuesta inmune: estimula precursores de colonias de granulocitos, promueve la diferenciación de monocitos a macrófagos, favorece una respuesta Th2, inhibiendo la secreción de IFN- $\gamma$ . Además, la histamina influye en el aumento en la secreción de otras citocinas como IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-16, RANTES y GM-CSF. También puede inhibir la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6, e inhibir la expresión de ICAM-1 e IL-12 en monocitos [20]. La histamina también causa una polarización de las células dendríticas hacia una respuesta tipo DC2 [21]. Las células cebadas también producen péptidos

antimicrobianos como catelicidinas y defensinas, las cuales causan una ruptura en las membranas de patógenos, induciendo su lisis [22].

Las células cebadas se activan de diversas formas, dependiendo del patógeno al que son expuestas (Tabla 1). Al contacto con algunos microorganismos secretan citocinas y desgranulan, mientras que con otros patógenos solo hay producción de citocinas. Por ejemplo, las células cebadas humanas infectadas con el virus del dengue, producen IL-1 $\beta$  e IL-6 en asociación con grandes cantidades de CCL5, pero no producen GM-CSF o CXCL8 [22]. Por otro lado, células cebadas expuestas a *P. aeruginosa*, generan grandes cantidades de CCL20, IL-1, IL-1 $\beta$ , CXCL8 y GM-CSF, pero no producen CCL5 [23].

**Participación de las células cebadas en infecciones causadas por diversos patógenos**

<b>Estímulo</b>	<b>Mediadores Preformados</b>	<b>Citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Bacterias</b>			
FimH	+	+	Disminución en la sobrevivencia de ratones deficientes de células cebadas
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Bajo	+	
Toxina colérica	-	+	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			Disminución en la sobrevivencia de ratones deficientes de células cebadas
<i>Listeria monocytogenes</i>			Reclutamiento de células efectoras al sitio de infección dependiente de células cebadas
<b>Virus</b>			
Virus Sendai	+	?	Hiperplasia de células cebadas asociada con infecciones en ratas.
Virus sincicial respiratorio	-	+	Activación de células cebadas en roedores.
Dengue	-	+	
<b>Parásitos</b>			
<i>Schistosoma mansoni</i>	+	?	
<i>Leishmania major</i>	+	+	
<i>Trichuris muris</i>			Expulsión del nemátodo dependiente de células cebadas
<i>Haemaphysalis longicornis</i> , <i>Strongyloides venezuelensis</i> y <i>Trichinella spiralis</i>			Retardo de la respuesta inmune y expulsión retardada de nemátodos en ratones deficientes de células cebadas.

Tabla 1. Participación de las células cebadas en infecciones causadas por diferentes patógenos. Se muestra la secreción de mediadores preformados, citocinas y la respuesta *in vivo* en modelos experimentales (Marshall, 2000; Galli, 2005)

**Activación de las células cebadas.** Las células cebadas liberan diversos mediadores preformados y sintetizados *de novo*, así como citocinas y quimiocinas



mediante la activación de receptores como: de manosa, de complemento, para citocinas y quimiocinas, Fc, activados por proteasas y tipo Toll (TLR).

**Receptores de manosa.** Estos receptores pueden reconocer diversas proteínas de patógenos, una de ellas es FimH, la cual es una estructura presente en *E.coli* y activa a CD48 (receptor de manosa en células cebadas), induciendo desgranulación y secreción de TNF- $\alpha$  [23].

**Receptores de complemento.** Los factores del complemento son proteínas solubles presentes en el suero que tienen funciones de opsonización y lisis celular. Las células cebadas tienen receptores para factores de complemento como CR2, CR4, C5aR y C3aR. La expresión de estos receptores de complemento puede variar dependiendo del estado de maduración y de los componentes del medio de cultivo de las células cebadas [23].

La presencia de factores de complemento en células cebadas es crucial para combatir infecciones bacterianas, ya que en ratones con infecciones peritoneales y deficientes en C3 y C4, se observa disminución en la activación de células cebadas [24].

**Receptores Fc.** Las células cebadas humanas expresan constitutivamente Fc $\epsilon$ RI (receptor de alta afinidad para IgE) y Fc $\gamma$ RII (receptor de baja afinidad para IgG), mientras que la expresión de Fc $\gamma$ RI (receptor de alta afinidad para IgG) y Fc $\gamma$ RIII (receptor de baja afinidad para IgG) son inducidos por la exposición a IFN- $\gamma$ . La activación de Fc $\gamma$ Rs contribuye a la activación de células cebadas llevando a la desgranulación, producción de mediadores lipídicos, quimiocinas y citocinas [23].

**Receptores TLR.** Los TLR son glicoproteínas integrales de membrana que se caracterizan por presentar un dominio extracelular de repeticiones ricas en leucina (LRR), las cuales se unen al ligando y una región de señalización citoplásmica que es homóloga al receptor de IL-1 (IL-1R), llamada dominio homólogo al receptor de IL-1 (TIR) [25].

La expresión y activación de TLR en células cebadas ha sido estudiada *in vivo* e *in vitro* y se ha reportado la presencia de todos los TLR en estas células con excepción de TLR5. TLR4 se expresa en células cebadas de roedores que responden a LPS produciendo TNF- $\alpha$  e IL-6. TLR2 se expresa en células cebadas de roedores y humanas, las cuales responden a PGN. TLR9 se activa en células cebadas de roedores y humanas estimuladas con CpG, lo cual induce la producción de citocinas. TLR3 está presente en células cebadas derivadas de piel fetal murina e induce producción de citocinas pro-inflamatorias. También se ha confirmado la presencia de TLR1 y TLR6 en células cebadas de roedores y de humanos. Estos receptores son de particular interés, ya que pueden formar heterodímeros con TLR2 y de esta forma aumentar la capacidad de responder a una gran variedad de ligandos. TLR7 y TLR8 responden a RNA de cadena sencilla que está asociado con infecciones virales, estos receptores se expresa en células cebadas humanas y de roedores [22].

La capacidad de activación de células cebadas a través de los TLR depende en gran medida del origen de donde fueron aisladas y del ambiente de citocinas a las cuales hayan sido expuestas. Por ejemplo, las células cebadas humanas derivadas de cordón umbilical expresan TLR1, TLR2, TLR3 y TLR4, sin embargo,

bajo algunas condiciones de cultivo éstas células cebadas carecen de la expresión de TLR4, lo cual se revierte después de la exposición a IL-4 o IFN- $\gamma$  que inducen una sobre-expresión de TLR4 y la restauración de la respuesta hacia LPS [22]

**TLR en el reconocimiento de patógenos.** La activación en el sistema inmune innato está dada por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que son reconocidos por los TLR. Los PAMP son estructuras vitales en la pared microbiana y que han sido poco alteradas evolutivamente como son: LPS, peptidoglicanos, GPI, lipoarabinomananas, oligosacáridos, etc [26].

La molécula glicosilfosfatidilinositol (GPI) es un PAMP presente en varios microorganismos que se expresa abundantemente en parásitos protozoarios como *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* y *Plasmodium falciparum*, entre otros, y puede activar diferentes tipos celulares a través de TLR. [26]. Se ha reportado que la GPI derivada de *T. cruzi* induce la fosforilación de MAPK y de NF- $\kappa$ B y ambos factores son inducidos por la activación de TLR [26]. En otros kinetoplastidos como *Leishmania*, la GPI tiene unidas moléculas como LPG que inducen activación de TLR. Se ha demostrado que LPG de *L. major* estimula a células NK humanas través de TLR2, las cuales producen citocinas y activan factores nucleares como NF- $\kappa$ B [27].

Por otro lado, en infecciones causadas por patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, la activación de TLR2 y TLR4 está relacionada con el control de la enfermedad [28]. La importancia de los TLR para controlar diversas enfermedades ha sido estudiada en infecciones causadas por *Borrelia burgdorferi*, en la que ratones deficientes en TLR2 no muestran una respuesta inflamatoria a las

lipoproteínas de *Borrelia*, además se observa un aumento en el número de espiroquetas en el tejido después de la infección [28].

**Modelos murinos de leishmaniasis.** Los roedores han sido usados para estudiar aspectos de enfermedades humanas ya que pueden ser infectados con los mismos parásitos que infectan a los humanos. Las infecciones producidas por *L. major*, que causa leishmaniasis cutánea en humanos, resulta en lesiones muy similares en los ratones. Los modelos murinos han sido usados para estudiar la biología del parásito, la fisiopatogenia de la enfermedad y la respuesta inmune adaptativa. Se ha encontrado una diferencia en el cuadro clínico en las diferentes cepas de ratones infectadas con distintas cepas de *Leishmania*, lo cual ha sido utilizado para estudiar la genética de la respuesta inmune en leishmaniasis. Ratones de diferentes cepas (C57BL/6, C3H/He, CBA y 129Sv/Ev) desarrollan lesiones cutáneas que curan espontáneamente. Estos ratones no desarrollan lesiones después de un segundo reto con *L. major*, por lo que representan un fenotipo resistente. Ratones de la cepa BALB/c y SWR/J desarrollan lesiones severas e incurables, estos ratones representan un fenotipo susceptible [29].

Existen genes candidatos para la susceptibilidad a la forma cutánea causada por *L. major*. Originalmente se sugería que la susceptibilidad a lesiones cutáneas era controlada por un solo locus: *Sc1* (susceptibility to cutaneous leishmaniasis-1). Sin embargo, algunas cepas de ratones son altamente resistentes, aun cuando llevan el mismo alelo *Sc1*, lo cual indica que este locus es solamente uno de los muchos factores involucrados en la susceptibilidad. Otros estudios han demostrado que la susceptibilidad en ratones BALB/c involucra la participación de múltiples genes. Se han analizado múltiples loci que controlan la

resistencia a *L. major* en 3 cepas resistentes (B10.D2, C57BL/6 y STS). Los estudios indican que la resistencia a leishmaniasis cutánea producida por *L. major* en ratones C57BL/6 es controlada por los loci *Lmr1*, *Lmr2* y *Lmr3*. Otros loci como *Lmrq6* y *Lmrf2* se han asociado a la susceptibilidad y al control sérico de IgE, IL-4 y TNF- $\alpha$ . Estos loci colocalizan con el locus *Dice1* (determination of interleukin-4, commitment 1), el cual controla la expresión de IL-4 en ratones no infectados, lo que podría indicar que *Dice1* puede tener un papel en la susceptibilidad a *L. major*. El mapeo genético ha subdividido a *Dice1* en subloci: *Dice1a* controla la expresión de citocinas mientras que *Dice1b* tiene influencia en el desarrollo de lesiones en la piel y la carga parasitaria dentro de éstas [30]. Otro estudio analizó siete loci que controlan parámetros inmunológicos y patológicos en leishmaniasis, 10 de ellos influyen solo parámetros inmunológicos. Los loci *Lmr13* y *Lmr4* determinan solo las lesiones cutáneas, *Lmr5* y *Lmr10* lesiones cutáneas y esplenomegalia, *Lmr14* y *Lmr3* esplenomegalia y hepatomegalia, *Lmr3* (débilmente lesiones cutáneas y *Lmr15* solo hepatomegalia [31].

Otro factor que puede influir en la susceptibilidad o resistencia a *Leishmania* en modelos murinos son las células de la respuesta inmune innata. Un estudio indica que en los ratones susceptibles existen mayor número de neutrófilos en las lesiones comparado con ratones resistentes y que la eliminación de neutrófilos en ratones BALB/c reduce la carga parasitaria y suprime el desarrollo de una respuesta Th2 [15]. Por otro lado, se ha investigado el ambiente de células dendríticas en ratones BALB/c, se observó que las capacidades fagocíticas de células dendríticas en BALB/c y C57BL/6 son similares, así como su activación,

producción de IL-12 y migración hacia la piel en ratones infectados con *L. major*. Sin embargo, se observó que las células dendríticas de los ratones C57BL/6 producen más IL-1  $\alpha/\beta$  que las células dendríticas de los ratones BALB/c. Esta citocina IL-1  $\alpha/\beta$  induce una respuesta Th1 e inmunidad protectora [15].

## II. Justificación.

La leishmaniasis es una enfermedad que causa un gran número de muertes a nivel mundial. En México podemos encontrar las dos formas de leishmaniasis cutánea, ambas producidas por *Leishmania mexicana*: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), que es la forma benigna y leishmaniasis cutánea difusa (LCD), para la cual aún no hay una cura efectiva. En ambos casos se han establecido modelos murinos para estudiar la enfermedad. La forma localizada está representada por los ratones resistentes C57BL/6, que desarrollan una respuesta inmune tipo Th1 con secreción de citocinas como IL-12. La leishmaniasis difusa tiene analogía con los ratones susceptibles BALB/c, que muestran una respuesta tipo Th2 y secretan IL-4, IL-5 e IL-13.

Las fuentes de las citocinas en etapas tempranas de la infección aun se desconocen. Un posible candidato es la célula cebada. Las células cebadas han sido ampliamente estudiadas como iniciadoras de reacciones alérgicas, no obstante, se ha reconocido su importancia como protagonistas de procesos pro inflamatorios y de eliminación de patógenos. Debido a su localización en lugares estratégicos son las primeras células en entrar en contacto con patógenos. Se encuentran en tejido conectivo, mucosas, cerca de nervios y vasos sanguíneos.

La activación de las células cebadas no es exclusiva a través de receptores para IgE, también pueden participar receptores TLR, receptores manosilados, receptores de complemento y receptores de citocinas y de quimiocinas. Una vez que las células cebadas son activadas por un receptor, secretan mediadores preformados y sintetizados *de novo*. Se ha reportado que las células cebadas pueden reconocer bacterias a través de TLR2 y TLR4. Sin embargo, la

participación de las células cebadas durante una infección causada por *Leishmania* sigue siendo controversial, ya que aun no queda establecido si contribuyen al control o a la progresión de la enfermedad. Algunos autores señalan que las células cebadas contribuyen a la progresión de la enfermedad, debido a un incremento en la producción IL-4 [32] y al aumento en el tamaño de las lesiones [33]. En contraste, otros autores señalan que las células cebadas pueden contribuir al control de la enfermedad, induciendo desgranulación y secreción de citocinas al contacto con parásitos de *L. major* y *L. donovani* [34], que favorecen el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Es interesante señalar que en ratones deficientes en células cebadas e infectados con *L. major* existe una disminución de IL-12 secretada por células dendríticas y aumento en la carga parasitaria [35].

Los estudios anteriores han dejado muchas incógnitas acerca del papel que juegan las células cebadas durante la infección causada por *Leishmania*. En este trabajo se analizó la participación de las células cebadas estimuladas con LPG y parásitos completos de *L. mexicana* en modelos murinos, usando ratones resistentes (C57BL/6) y susceptibles (BALB/c) que semejan las dos formas clínicas de leishmaniasis cutánea (LCL y LCD, respectivamente). Se buscó si existe una correlación entre la activación de estas células y la resolución o progresión de la enfermedad.



### **III. Hipótesis.**

- El lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana* activa diferencialmente a células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC) de ratones susceptibles BALB/c y resistentes C57BL/6.

### **IV. Objetivos**

#### **Objetivos Generales.**

- Analizar el efecto que ejerce LPG de *L. mexicana* sobre BMCC de ratones susceptibles y resistentes a la leishmaniasis.
- Analizar la cinética de desgranulación y el número de BMMC en tejido de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con promastigotes de *L. mexicana*, así como determinar el número de parásitos en las lesiones.

#### **Objetivos Particulares.**

- Generar células cebadas a partir de médula ósea de ratón.
- Analizar la secreción de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 y TNF- $\alpha$  y de la quimiocina MIP-1 $\alpha$  en células cebadas estimuladas con LPG de *L. mexicana*, mediante ELISA.
- Determinar la desgranulación en células cebadas estimuladas con LPG de *L. mexicana*, mediante el ensayo de liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa.
- Determinar la expresión de TLR2 en membrana de células cebadas, estimuladas con LPG de *L. mexicana*, mediante citometría de flujo.
- Determinar el número de células cebadas en lesiones de ratones BALB/c y C57BL/6, infectados con *L. mexicana*.

- Analizar la desgranulación *in vivo* de las células cebadas en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*, mediante tinciones con azul de toluidina en tejido infectado.
- Determinar el número de parásitos en lesiones de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*.
- Realizar un análisis histológico en lesiones de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*.

## **V. Material y Métodos.**

**Ratones.** Se utilizaron ratones machos BALB/c y C57BL/6 (de 8 semanas de edad). Los ratones se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, siguiendo las normas nacionales para el manejo ético de los animales.

**Purificación de LPG.** Los promastigotes de *Leishmania mexicana* se crecieron en medio agar sangre (medio NNN) con RPMI 1640 (Life Technologies, MD, USA), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (previamente inactivado por calor) a 28°C. Los parásitos se cultivaron durante 3-4 días a una densidad de  $1 \times 10^7$ /ml. Para la purificación de LPG, se cosecharon  $1 \times 10^{10}$  promastigotes, se extrajo y se purificó LPG como lo describe McConville *et al* [36], con algunas modificaciones. Brevemente, se decantó el sobrenadante y el precipitado se sometió a un proceso de extracción de lípidos con cloroformo/metanol/agua (1:2:0.5 v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente. El material insoluble fue usado para extracción de LPG con 9 % de 1-butanol en agua (2 x 50 ml) y los precipitados fueron liofilizados. El LPG se purificó en una columna de octil sefarosa por cromatografía de alta presión usando un gradiente de propanol (5-60 %) en 0.1M de acetato de amonio. Las preparaciones fueron negativas para la presencia de endotoxinas según la prueba de *Limulus* sp (E-Toxate Kit, Sigma, MO, USA), de igual forma se usó polimixina B (5 µg/ml) para confirmar la ausencia de contaminación con lipopolisacáridos (LPS). Una muestra del LPG purificado fue analizada para descartar contaminación con proteínas usando tinción de plata. La preparación se encontró libre de contaminantes.

**Generación de células cebadas derivadas de médula ósea de ratón.** BMMC se obtuvieron de fémur de ratones BALB/c y C57BL/6. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el fémur y se eliminó la piel y el músculo, se cortaron los extremos de los huesos y se extrajo la médula pasando medio RPMI 1640 (Gibco, NY, USA) con la ayuda de una aguja de insulina. Se recolectaron las médulas y se cultivaron en medio RPMI conteniendo 10 % de suero fetal bovino libre de endotoxinas (Gibco, NY, USA), penicilina/estreptomicina/glutamina (Gibco, NY, USA), HEPES 1M (Sigma, MO, USA), aminoácidos no esenciales (Sigma, MO, USA), MEM de piruvato de sodio 100mM (Gibco, NY, USA), 10 ng/ml de IL-3 (Peprotech, NJ, USA), y SCF 10 ng/ml (Peprotech, NJ, USA). Se realizaron cambios de medio cada semana, para lo cual se centrifugaron las células (329 ×g, 20°C durante 10 minutos), después de 8 semanas de cultivo las células se recolectaron y se midió la pureza de las células por tinción con azul de toluidina, que permite la observación de los gránulos metacromáticos, y con tinción de azul alciano/safranina (Alcian Blue/Safranin, ABS Sigma, MO, USA) para determinar su diferenciación a células cebadas de tejido conectivo [37]. Adicionalmente se analizó la expresión del receptor CD117 (c-kit) (Pharmingen, CA, USA) por citometría de flujo. Debido a que IL-3 induce aumento en la expresión de mRNA de algunas citocinas, las células se cultivaron en medio RPMI en ausencia de IL-3 y Stem Cell Factor (SCF) 4 horas antes del estímulo con LPG [38].

**Estimulación *in vitro* de células cebadas.** Después de 8 semanas de cultivo se cosecharon las células y se colocaron  $1 \times 10^6$  células/ml con 5 % de SFB en placas de 24 pozos, se estimularon con 10  $\mu$ g/ml de LPG de *L. mexicana* y 500

ng/ml de Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> como control positivo (EMC microcollections, Tübingen, Germany) durante 18 horas. Los sobrenadantes se utilizaron para cuantificar citocinas y las células se utilizaron para analizar TLR2 en la superficie de la membrana celular por medio de citometría de flujo.

**Cuantificación de citocinas.** Se cuantificaron las citocinas IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$  (BD Pharmingen, CA, USA) y la quimiocina MIP-1 $\alpha$  (R&D Systems, MN, USA) en los sobrenadantes de  $1 \times 10^6$ /ml células cebadas estimuladas con LPG durante 18 horas, mediante ELISA, utilizando un sistema de anticuerpos de captura y anticuerpos de detección (BD Pharmingen, CA, USA). Se utilizó como revelador estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina y como sustrato p-nitrophenyl phosphate (pNPP) (Sigma, MO, USA). Se leyeron las muestras a 405 nm en un lector de ELISA (EL-312e Bio-Tek Instruments, USA).

**Análisis de la expresión de TLR2 en la membrana de células cebadas.** Se analizó la expresión de TLR2 en la membrana de células cebadas por medio de citometría de flujo. Se incubaron las células en medio RPMI durante 18 horas a 37°C con 10  $\mu$ g/ml de LPG de *L. mexicana*. Transcurrido este tiempo se fijaron las células con paraformaldehído al 2 % durante 2 horas y se bloquearon con suero de ratón al 0.5 %, posteriormente se realizó la doble tinción con anticuerpo anti TLR2 dilución 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) y anti CD117 dilución 1:50 (c-kit Pharmingen, CA, USA) y se incubaron las células toda la noche a 4°C. La expresión de los receptores se examinó por citometría de flujo (FACScalibur,

USA) y se analizó con el programa Cellquest (BD Immunocytometry Systems, CA, USA).

**Liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa.** Se siguió el protocolo descrito por Ikeda [39], con algunas modificaciones. Se incubaron  $1 \times 10^6$  células/ml en placas de 24 pozos con medio Tyrode's (NaCl 135 mM, KCl 5mM,  $MgCl_2$  1mM, CaCl 1.8 mM, glucosa 5.6 mM, HEPES 20 mM, 0.05% BSA) enriquecido con 5 % de SFB. Se estimularon las células durante 60 min con 10  $\mu$ g/ml de LPG de *L. mexicana* y con PMA (50  $\mu$ M)/ionomicina (1M) como control positivo. Se centrifugaron las células (329  $\times$ g, 10 min a 4°C) se separó el sobrenadante y se lisaron las células con 0.5 % de Tritón x-100 (Sigma, MO, USA). Se colocaron 20  $\mu$ l de sobrenadante del cultivo o del lisado celular en una placa de 96 pozos con amortiguador de citrato de sodio 0.1M pH 4.5 y se mezcló con 50  $\mu$ l de sustrato (1.3 mg/ml de p-nitrofenil-N-acetyl- $\beta$ -D glucosamida) (Sigma, MO, USA) diluido en amortiguador de citrato de sodio 0.1M pH 4.5 (1 U de enzima rompe 1  $\mu$ mol de sustrato por hora a 37°C). Después de incubar durante 60 min a 37°C se paró la reacción adicionando 150  $\mu$ l de glicina 0.2 M pH 10.5 y se midió la absorbancia a 405 nm. El porcentaje de liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa se calculó usando la siguiente fórmula: liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa=  $(D.O \text{ sobrenadante estimulado} - D.O \text{ sobrenadante sin estimular}) \times 100 / (D.O \text{ células lisadas} - D.O \text{ sobrenadante de células sin estímulo})$ .

**Infección de ratones con parásitos de *L. mexicana*.** Se infectaron ratones BALB/c y C57BL/6 con  $1 \times 10^6$  parásitos de *L. mexicana* o PBS en el cojinete plantar (20  $\mu$ l). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y los tejidos se procesaron para realizar cortes histológicos. El tejido se cortó con biopunch de 4 mm de diámetro (Amherst, NY, USA), se fijó en formol al 10 %, se incluyó en parafina y posteriormente se realizaron cortes para teñir con azul de toluidina para contar el número de células cebadas así como desgranulación de las mismas y tinción con hematoxilina eosina para realizar análisis histológicos. Se contaron 100 células y se determinó el número de células desgranuladas y no desgranuladas en el tejido. Para analizar la densidad de las células cebadas en el tejido, se contaron las células por  $\text{mm}^2$ . El análisis se realizó con un aumento de 1000X.

**Conteo de parásitos en lesiones de ratones infectados con *L. mexicana*.** Se cuantificaron parásitos en lesiones de ratones BALB/c y C57BL/6, y se utilizaron los mismos tejidos que se habían analizado para cuantificar células cebadas. Los cortes del tejido infectado incluido en parafina se tiñeron con hematoxilina/eosina y se cuantificó el número de parásitos en 3 campos

**Estudios de microscopía electrónica.** Se realizó un análisis ultraestructural de las lesiones de los cojinetes plantares de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*. Los tejidos se fijaron con 2.5 % de glutaraldehído en amortiguador de cacodilato 0.1 M, pH 7.2, durante 2 horas a 4°C. Se lavaron 3 veces con amortiguador de cacodilato 0.15 M, pH 7.2, adicionado con 0.025 M de sacarosa y 0.05 % de cloruro de sodio, posteriormente los tejidos se fijaron con 1 % de  $\text{OsO}_4$

en buffer de cacodilato 0.2 M (pH 7.2) durante 45 minutos a 4°C, y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol, se transfirieron a óxido de propileno y se embebieron en Araldita 6005. Se realizaron cortes ultra delgados con una navaja de diamante y se contra tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, los cortes se analizaron con un microscopio electrónico marca Zeiss EM-109.

**Análisis estadístico.** Se realizaron 3 experimentos independientes. Se compararon los resultados de células cebadas de ratones BALB/c y C57BL/6 usando la prueba estadística ANOVA y posthoc de Bonferroni. Para el conteo en el número de células cebadas, degranulación in vivo y conteo del número de parásitos se usó la prueba estadística U-Mann Whitney. Se consideró diferencia estadística significativa con  $p < 0.05$ . Se utilizó el programa de análisis estadístico SPSS versión 14.0.



## VI Resultados

**Obtención de células cebadas.** Se determinó el efecto que ejerce LPG de *L. mexicana* en BMMC de ratones BALB/c y C57BL/6. Se determinó la pureza de las células cebadas por tinción con azul alciano/ safranina (tinción para caracterizar células cebadas de tejido conectivo), azul de toluidina y expresión del receptor CD117. Después de 8 semanas de cultivo se identificó el 98 % de células cebadas por tinción con azul de toluidina, 80 % de las células fueron positivas por azul alciano/safranina, y 90 % de las células expresaron CD117 en la membrana celular en ambos grupos de ratones (Figura 5)

### Generación de células cebadas derivadas de médula ósea

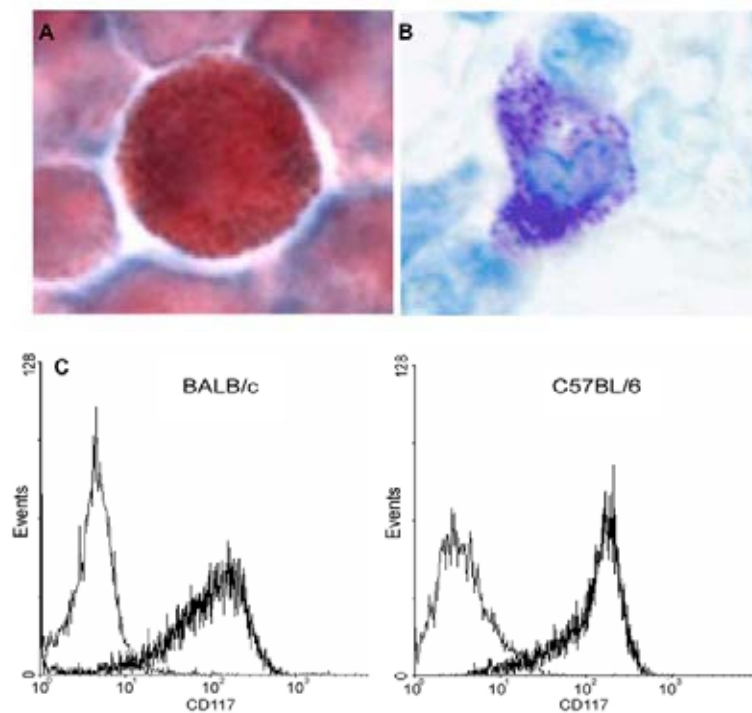


Figura 5. *Tinción de células cebadas y expresión del receptor CD117.* A) Tinción con azul alciano/safranina para determinar la diferenciación a células de tejido conectivo, se observa la tinción de los gránulos con una mezcla de azul y rojo. B) Tinción con azul de toluidina para determinar la diferenciación a células cebadas, se observa la tinción de gránulos metacromáticos en el citoplasma. C) Expresión del receptor CD117 en la membrana de células cebadas determinado por citometría de flujo en ratones BALB/c y C57BL/6, se muestra la intensidad de fluorescencia de las células positivas (línea oscura) y control de isotipo (línea clara).

**Cuantificación de citocinas y quimiocinas.** Se ha reportado que distintos activadores de TLR2 inducen diferente secreción de mediadores en las células cebadas (29). La respuesta a estos activadores también depende del subtipo de células cebadas utilizadas (de mucosas, tejido conectivo o de piel de ratón), el origen de estas células (humano o ratón) y el microambiente de citocinas con las que se hayan diferenciado (23). En el presente trabajo se estimularon las células cebadas durante 18 horas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPG de *L. mexicana*. Como control positivo se utilizó el ligando para TLR1/TLR2 Pam<sub>3</sub>Cys (500 ng/ml) y se analizó la secreción de IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$  y de la quimiocina MIP-1 $\alpha$  por medio de ELISA. Los resultados mostraron que las células cebadas estimuladas con LPG y con Pam<sub>3</sub>Cys de ratones resistentes y de ratones susceptibles no secretaron IL-4 ni tampoco IL-5 (datos no mostrados).

## Secreción de citocinas y quimiocinas en células cebadas estimuladas con LPG de

### *L. mexicana*

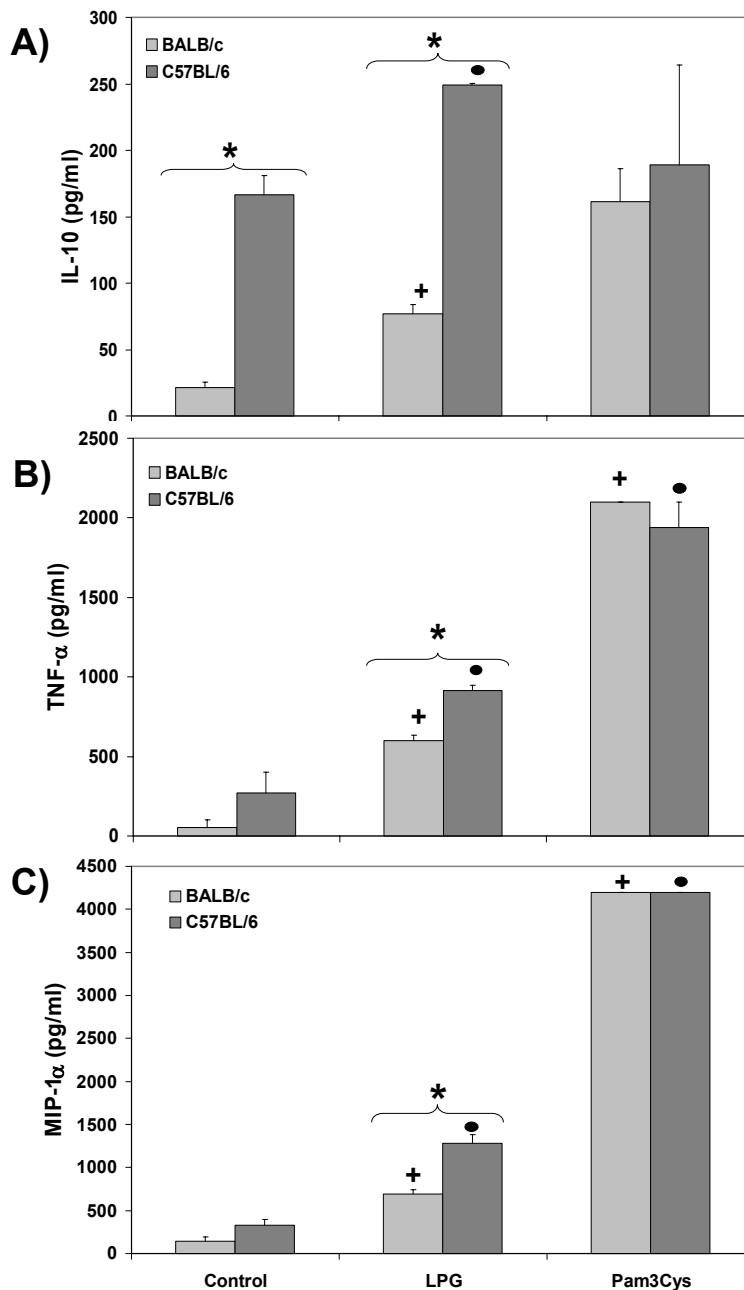


Figura 6. Cuantificación de citocinas y quimiocinas secretadas por células cebadas estimuladas con LPG. Se analizó la secreción de IL-10 (A), TNF- $\alpha$  (B) y la quimiocina MIP-1 $\alpha$  (C), en células cebadas de ratones BALB/c ■ y C57BL/6 ■ estimuladas con 10  $\mu$ g/ml de LPG o con 500 ng/ml de Pam<sub>3</sub>Cys durante 18 hrs. Las células sin estimular fueron usadas como control negativo. Se determinó la cantidad de citocinas en los sobrenadantes por ELISA. Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes. El símbolo \* indica diferencias entre los grupos. + indica diferencias entre el control y las células estimuladas de los ratones BALB/c. • indica diferencias entre el control y las células estimuladas de los ratones C57BL/6. Los símbolos representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

En la figura 6A se observa la producción de IL-10. Cuando las células cebadas se estimularon con LPG, se encontró que las células de ratones C57BL/6 secretaron mayor cantidad de IL-10 ( $249 \pm 1$  pg/ml) que las células cebadas de ratones BALB/c ( $77 \pm 7$  pg/ml) y esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). En estado basal las células cebadas de los ratones C57BL/6 secretaron mayor cantidad de IL-10 ( $166 \pm 14$  pg/ml) que los ratones BALB/c ( $21 \pm 4$  pg/ml) y esta diferencia también fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Con el estímulo de Pam<sub>3</sub>Cys no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre células cebadas de ratones BALB/c ( $161 \pm 25$  pg/ml) y células cebadas de ratones C57BL/6 ( $189 \pm 75$ ). Sin embargo, solo las células cebadas de los ratones BALB/c con el estímulo de Pam<sub>3</sub>Cys aumentaron la secreción de IL-10 con respecto a su control sin estimular.

El análisis de TNF- $\alpha$  secretado por células cebadas estimuladas con LPG (Figura 6B), reveló que las células de ratones C57BL/6 secretaron significativamente más ( $913 \pm 35$  pg/ml) que células de ratones BALB/c ( $600 \pm 32$  pg/ml) ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, en estado basal las células cebadas de los ratones C57BL/6 secretaron mayor cantidad de TNF- $\alpha$  ( $271 \pm 132$  pg/ml) comparado con los ratones BALB/c ( $54 \pm 46$  pg/ml). Con el estímulo positivo de Pam<sub>3</sub>Cys, esta citocina se secretó en grandes cantidades tanto en ratones C57BL/6 ( $1941 \pm 159$  pg/ml) como en ratones BALB/c ( $2100 \pm 0$  pg/ml).

El análisis de secreción de la quimiocina MIP-1 $\alpha$  por células cebadas estimuladas con LPG (Figura 6C) reveló que las células cebadas de ratones C57BL/6 secretaron significativamente más MIP-1 $\alpha$  ( $1284 \pm 98$  pg/ml) que las

células cebadas de ratones BALB/c ( $690 \pm 52$  pg/ml) ( $p < 0.05$ ). En estado basal las células cebadas de ratones C57BL/6 secretaron mayor cantidad ( $325 \pm 71$  pg/ml) de esta quimiocina que ratones BALB/c ( $143 \pm 49$  p/ml). Con el estímulo de Pam<sub>3</sub>Cys, la secreción de MIP-1 $\alpha$  fue mucho mayor que con el estímulo de LPG en ambos grupos de ratones ( $4200 \pm 0$  pg/ml).

En resumen, las células cebadas de los ratones C57BL/6 secretaron mayor cantidad de IL-10, TNF- $\alpha$  y MIP-1 $\alpha$  cuando fueron estimulados con LPG, comparado con los ratones BALB/c. En ninguna de las dos cepas de ratones se observó secreción de IL-4 ni de IL-5.

**Expresión de TLR2 en la membrana de células cebadas.** Está reportado que los receptores de la respuesta inmune innata como TLR pueden estar regulados (sobre-expresión o inhibición) por ciertos estímulos microbianos. Becker y cols [27] demostraron que LPG de *L. major* es capaz de unirse al receptor TLR2 en células NK y estas aumentan el número de receptores al ser estimuladas con LPG. En este trabajo se analizó la expresión del receptor TLR2 ante el estímulo de LPG de *L. mexicana* en células cebadas, durante 18 hrs y se cuantificó por citometría de flujo.

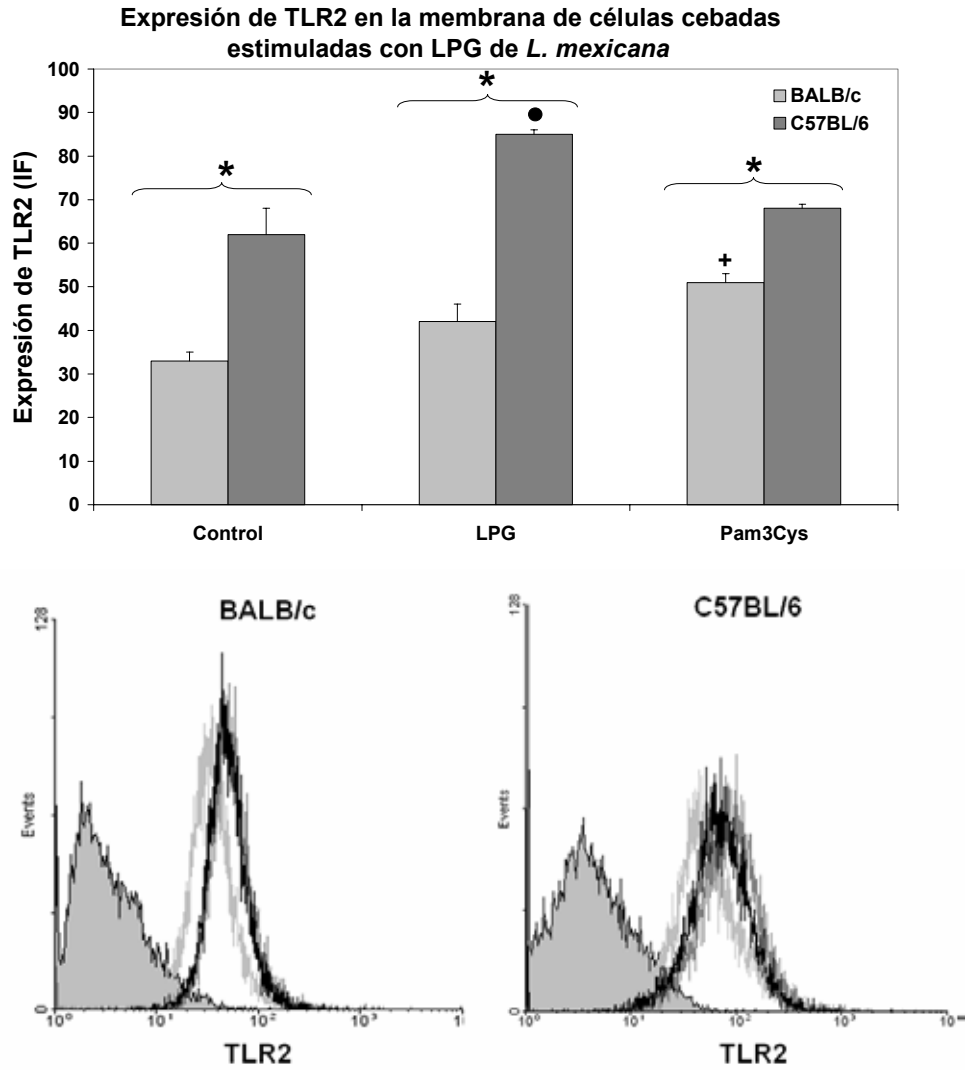


Figura 7. Expresión de TLR2 en la membrana de células cebadas estimuladas con LPG de *L. mexicana*. Se determinó la expresión del TLR2 por citometría de flujo en células cebadas de ratones BALB/c ■ y C57BL/6 ■ estimuladas durante 18 hrs con 10  $\mu$ g/ml de LPG o con 500 ng/ml de Pam<sub>3</sub>Cys. A) Las barras muestran el promedio de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia. B) Los histogramas son representativos de un experimento, la línea clara son células sin estímulo, la línea oscura son células estimuladas con LPG. Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes. \* indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. + indica diferencias entre el control y las células estimuladas de los ratones BALB/c. • indica diferencias entre el control y las células estimuladas de los ratones C57BL/6. Los símbolos representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

En la figura 7 se muestra la expresión de TLR2 en células cebadas de ratones BALB/c y C57BL/6. Las células cebadas de ratones BALB/c expresaron significativamente ( $p < 0.05$ ) más TLR2 que las de BALB/c, tanto en estado basal como cuando fueron estimuladas con LPG o con Pam<sub>3</sub>Cys. Se observó que la intensidad de fluorescencia (IF) para TLR2 ( $85 \pm 1$  media geométrica de intensidad de fluorescencia) y las células cebadas de ratones C57BL/6 estimuladas con LPG fue el doble que la de ratones BALB/c ( $42 \pm 4$  IF). Esto mismo se observó en estado basal, ya que las células cebadas de los ratones C57BL/6 expresaron 2 veces mas receptores ( $62 \pm 11$  IF) que los de BALB/c ( $33 \pm 3$  IF). El estímulo con Pam<sub>3</sub>Cys de las células cebadas de los ratones C57BL/6 incrementó más la expresión de receptores ( $85 \pm 1$  IF) con respecto a las células cebadas de los ratones BALB/c ( $51 \pm 2$  IF). Las células cebadas de los ratones BALB/c estimuladas con Pam<sub>3</sub>Cys incrementaron significativamente la expresión de TLR2 con respecto al control no estimulado, mientras que en los ratones C57BL/6 este estímulo no modificó significativamente con respecto a su control sin estimular y de hecho hubo una disminución en la expresión de TLR2. En resumen, las células cebadas de los ratones C57BL/6 siempre expresaron más TLR2 en su membrana que las células cebadas de BALB/c y fueron la únicas que incrementan significativamente su expresión de TLR2 cuando fueron estimuladas con LPG.

**Desgranulación de células cebadas *in vitro*, estimuladas con LPG.** Existe evidencia que demuestra que los parásitos de *Leishmania* inoculados en ratones inducen desgranulación de las células cebadas [34,35]. Reportes recientes indican que LPG es capaz de inducir desgranulación y liberación de histamina en células estimuladas con *L. donovani* [40]. En el presente trabajo se estimularon las células

cebadas con LPG de *L. mexicana* y se analizó la desgranulación por medio del ensayo de liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa.

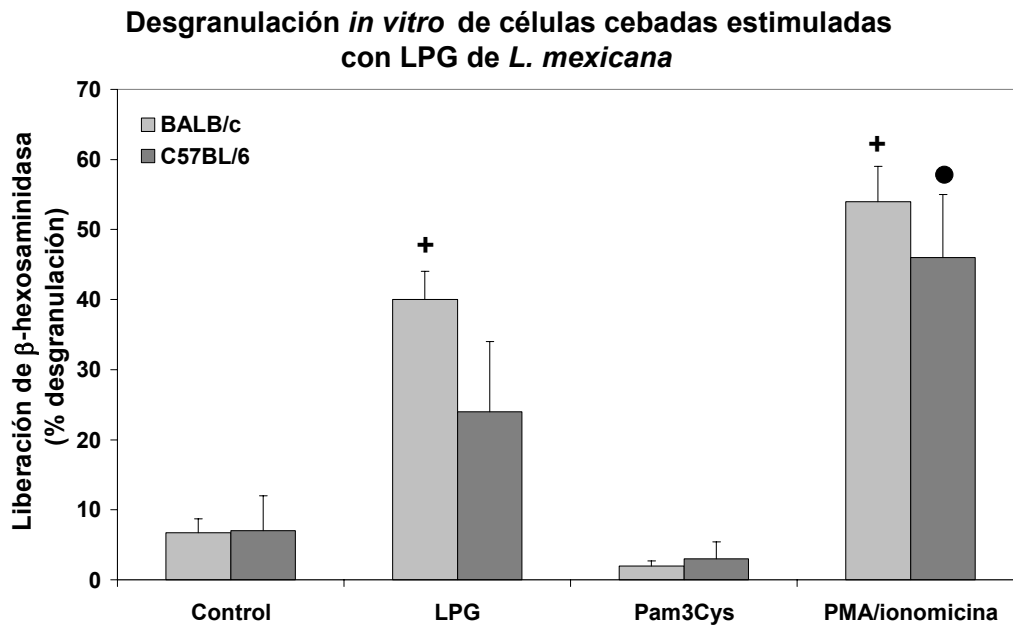


Figura 8. *Desgranulación in vitro* de células cebadas estimuladas con LPG de *L. mexicana*. Se determinó la degranulación de las células cebadas por medio del ensayo de liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa. Las células de ratones BALB/c y C57BL/6 fueron estimuladas con 10  $\mu$ g/ml de LPG o con 500 ng/ml de Pam<sub>3</sub>Cys durante 1 hora, como control positivo se utilizó PMA/ionomycin. Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes. \* indica diferencias entre los grupos. + indica diferencias entre el control y las células estimuladas de los ratones BALB/c. • indica diferencias entre el control y las células estimuladas de los ratones C57BL/6. Los símbolos representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

En la figura 8 se observa que el porcentaje de desgranulación de las células cebadas de ratones BALB/c incrementó significativamente cuando fueron estimuladas con LPG (40 %  $\pm$  4), con respecto al valor basal (6 %  $\pm$  2). Aunque las células cebadas de ratones C57BL/6 también incrementaron su liberación de gránulos cuando fueron estimulados con LPG (24 %  $\pm$  10), este fue menor que en células de BALB/c y no fue significativo con respecto al valor basal (7  $\pm$  5). Se observó que el ligando específico para TLR2 (Pam<sub>3</sub>Cys) no indujo liberación de la enzima en ratones BALB/c (2  $\pm$  0) ni tampoco en C57BL/6 (3  $\pm$  2) en una



concentración en la que si se observó liberación de citocinas. El estímulo con PMA/ionomicina indujo desgranulación similar en ambos grupos de ratones C57BL/6 ( $46 \pm 9$ ) y BALB/c ( $54 \pm 5$ ).

**Cuantificación del número de células cebadas en lesiones de ratones infectados con *L. mexicana*.** Se analizó el efecto que inducen los parásitos de *L. mexicana* sobre las células cebadas en lesiones de ratones. Se infectaron ratones BALB/c y C57BL/6 con promastigotes de *L. mexicana*. Los ratones se sacrificaron en diferentes tiempos y se cuantificó el número de células cebadas por  $\text{mm}^2$  (por medio de tinciones con azul de toluidina). Asimismo se analizó el porcentaje de células cebadas desgranuladas y el número de parásitos en los mismos tejidos en los que se analizó el número de células cebadas.

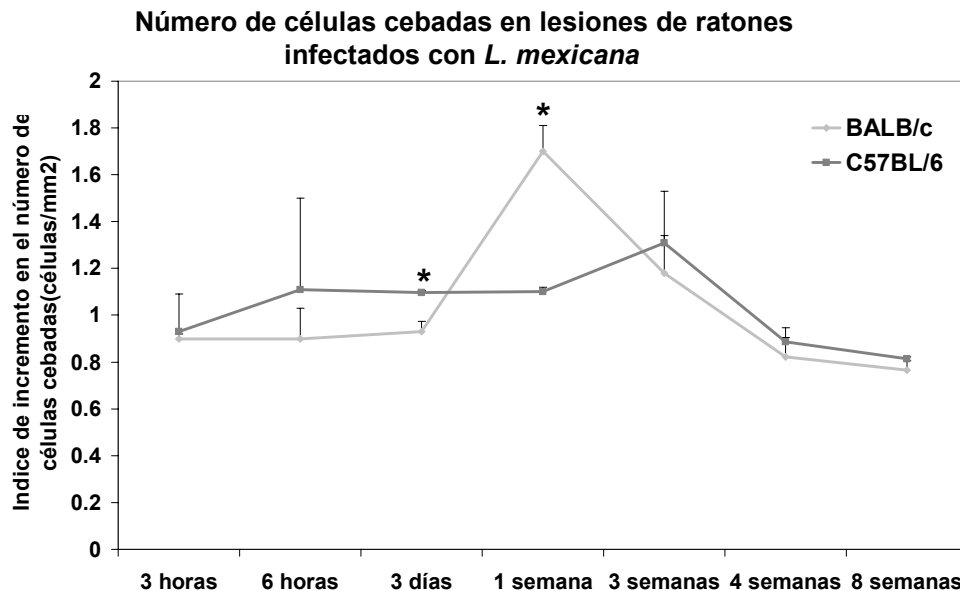


Figura 9. Número de células cebadas en tejido de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*. Se infectaron en el cojinete plantar ratones de ambas cepas (BALB/c  $\_$  y C57BL/6  $\_$ ) con  $1 \times 10^6$  parásitos de *L. mexicana*, después de los tiempos determinados (3, 6 horas, 3 días, 1, 3 semanas, 1 y 2 meses) los ratones se sacrificaron, los tejidos fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes que se tiñeron con azul de toluidina. Se determinó el número de células cebadas por  $\text{mm}^2$  con un aumento de 1000 X. La gráfica indica el incremento en el número de células cebadas en los tejidos infectados con respecto al mismo tejido en ratones controles, no infectados. Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes

La figura 9 muestra que a los 3 días después de la infección el número de células cebadas en las lesiones de los ratones C57BL/6 incrementó significativamente ( $1.09 \pm 0.01$ ) con respecto a BALB/c ( $0.93 \pm 0.04$ ) ( $p < 0.05$ ). Después de 1 semana de infección el número de células cebadas en los ratones BALB/c aumentó ( $1.7 \pm 0.11$ ) significativamente comparado con los ratones C57BL/6 ( $1.1 \pm 0.02$ ). Después de este tiempo, el número de células cebadas disminuyó en las lesiones de ambas cepas de ratón.

**Desgranulación *in vivo* de células cebadas en lesiones de ratones infectados con *L. mexicana*.** Se analizó el porcentaje de células desgranuladas durante diferentes tiempos de infección en ratones BALB/c y C57BL/6. Esta desgranulación indica que las células se encuentran activas y secretando mediadores preformados como histamina, TNF- $\alpha$  y proteasas. La figura 10 muestra que a las 3 horas postinfección hay significativamente más desgranulación en los ratones BALB/c comparado con C57BL/6, posteriormente disminuye gradualmente el porcentaje de células cebadas desgranuladas en ratones BALB/c y aumentan en los ratones C57BL/6. A la semana postinfección se invierte esta relación y se observa significativamente mayor desgranulación en C57BL/6 que en células cebadas BALB/c, lo cual continúa así durante las 8 semanas estudiadas.

**Desgranulación *in vivo* de células cebadas en lesiones de ratones infectados con *L. mexicana***

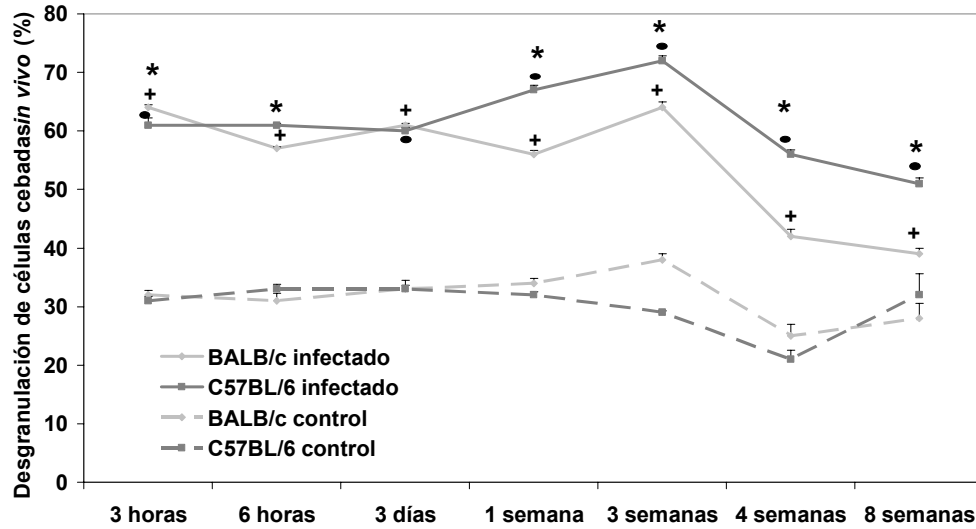


Figura 10. *Desgranulación in vivo* de células cebadas en lesiones de ratones infectados con parásitos de *L. mexicana*. Se infectaron en el cojinete plantar ratones BALB/c – y C57BL/6 – con  $1 \times 10^6$  parásitos de *L. mexicana*, después de los tiempos determinados (3, 6 horas, 3 días, 1, 3 semanas, 1 y 2 meses) los ratones se sacrificaron, los tejidos fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes que se tiñeron con azul de toluidina. Para determinar la degranulación de células cebadas en lesiones de ratones infectados, se contaron 100 células y se determinó el número de células desgranuladas y no desgranuladas. Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes. \* indica diferencias entre los grupos. + indica diferencias entre el control y las células estimuladas de los ratones BALB/c. • indica diferencias entre el control y las células estimuladas de los ratones C57BL/6. Los símbolos representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Aumento 1000X

**Número de parásitos en lesiones de ratones infectados con *L. mexicana*.** Se cuantificaron los parásitos en las lesiones de los ratones infectados con *L. mexicana* y se analizó la posible correlación entre la desgranulación y el número de parásitos en las lesiones. En la figura 11 se observa que los ratones BALB/c presentaron significativamente más parásitos en las lesiones que ratones C57BL/6 durante todo el ensayo.

### Número de parásitos en lesiones de ratones infectados con *L. mexicana*

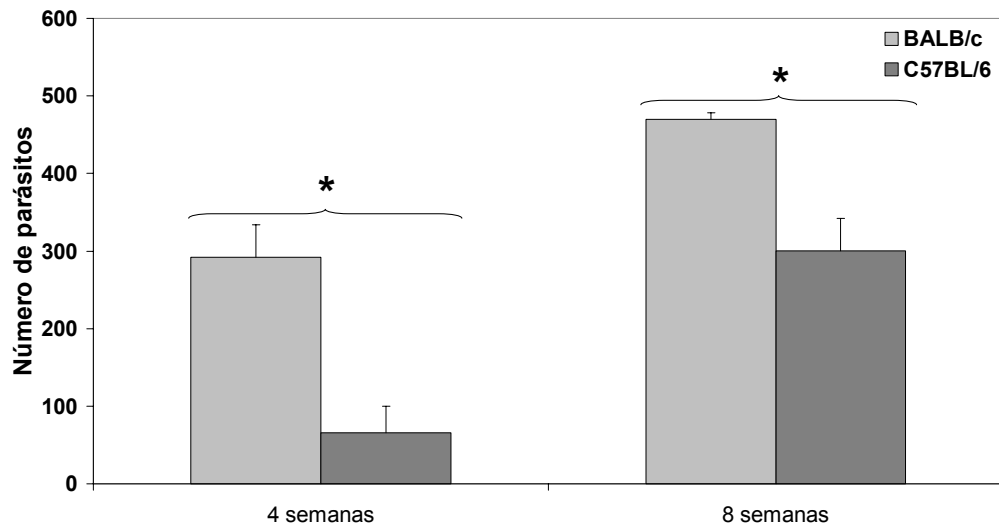


Figura 11. *Cuantificación de parásitos en lesiones de ratones infectados L.mexicana*. Se realizó el conteo de parásitos en las lesiones de ratones BALB/c ■ y C57BL/6 ■ infectados con *L. mexicana*, en los tiempos determinados se sacrificaron los ratones, los tejidos se fijaron en formol. Los cortes embebidos en parafina se tiñeron con hematoxilina/eosina y se determinó la carga parasitaria por conteo de 3 campos en ambos grupos de ratones. Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes. Aumento 1000X.

### Análisis histológico en lesiones de ratones infectados con *L. mexicana*

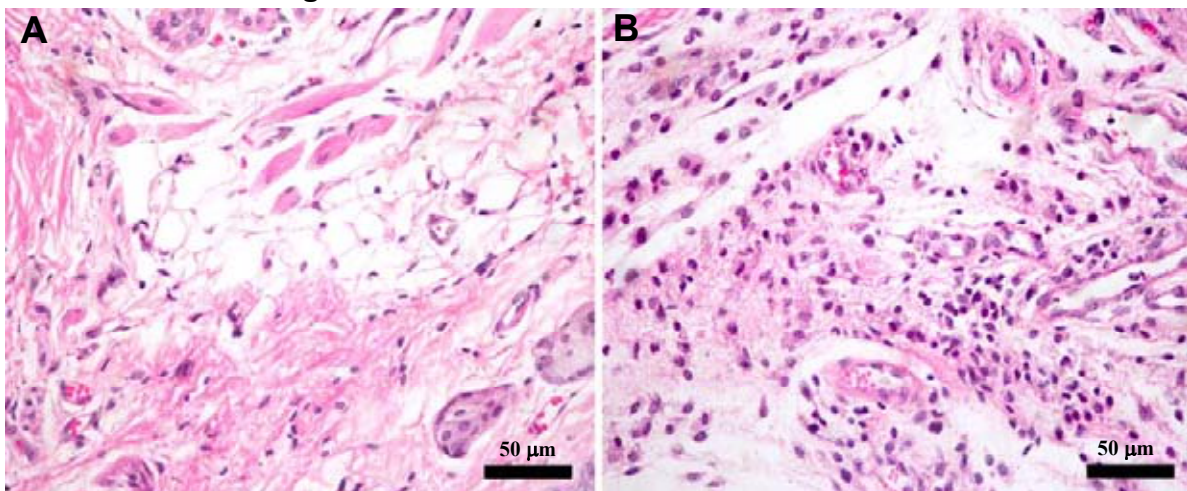


Figura 12. *Análisis histológico en lesiones de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con Leishmania mexicana a las 3 semanas postinfección*. Se realizaron análisis histológicos en lesiones de ambas cepas de ratones utilizadas previamente para contar número de parásitos. Los ratones se sacrificaron después de los tiempos determinados (3, 6 horas, 3 días, 1, 3 semanas, 1 y 2 meses), los cortes de parafina se tiñeron con hematoxilina/eosina. Los análisis se realizaron con un aumento de 1000X. A) Se observa una inflamación moderada en las lesiones de ratones BALB/c después de 3 semanas de infección. B) Se observa un intenso proceso inflamatorio en ratones C57BL/6 después de 3 semanas de infección. Las lesiones muestran presencia de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos.

**Análisis histológico en lesiones de ratones infectados con *L. mexicana*.** Para analizar los grupos celulares presentes en las lesiones de ratones infectados con *L. mexicana* se realizaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina/eosina en los diferentes tiempos determinados. Encontramos que en etapas tempranas de la infección (3 días y 1 semana) las lesiones de los ratones BALB/c presentaron un proceso inflamatorio con neutrófilos, eosinófilos y algunos fibroblastos, mientras que en las lesiones de los ratones C57BL/6 la inflamación no fue tan evidente. Este evento se revirtió a las 3 semanas post infección, cuando las lesiones de los ratones C57BL/6 mostraron un proceso inflamatorio evidente conformado por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, fibroblastos, algunos linfocitos, macrófagos espumosos (indicio de haber fagocitado y eliminado el contenido, quedando solo las vacuolas vacías), bandas de eosinófilos (formas jóvenes que indican reclutamiento en contra de una infección). También se observó edema de la epidermis. En este tiempo las lesiones de los ratones BALB/c no mostraron inflamación. La Figura 12 muestra las lesiones histológicas a las 3 semanas de infección.

**Microscopía electrónica en lesiones de ratones infectados con *L. mexicana*.**

El análisis de microscopía electrónica en las lesiones mostró que en los tejidos de los ratones BALB/c se observaron abundantes parásitos de *Leishmania* los cuales se encontraron infectando varios tipos celulares entre ellos neutrófilos y eosinófilos. Algunos parásitos se encontraron dentro de vasos linfáticos que fueron identificados por la presencia de un endotelio muy delgado y la ausencia de lámina

basal. También se observaron parásitos extracelulares cerca de vasos linfáticos (Figura 13).

### Microscopía electrónica de lesiones.

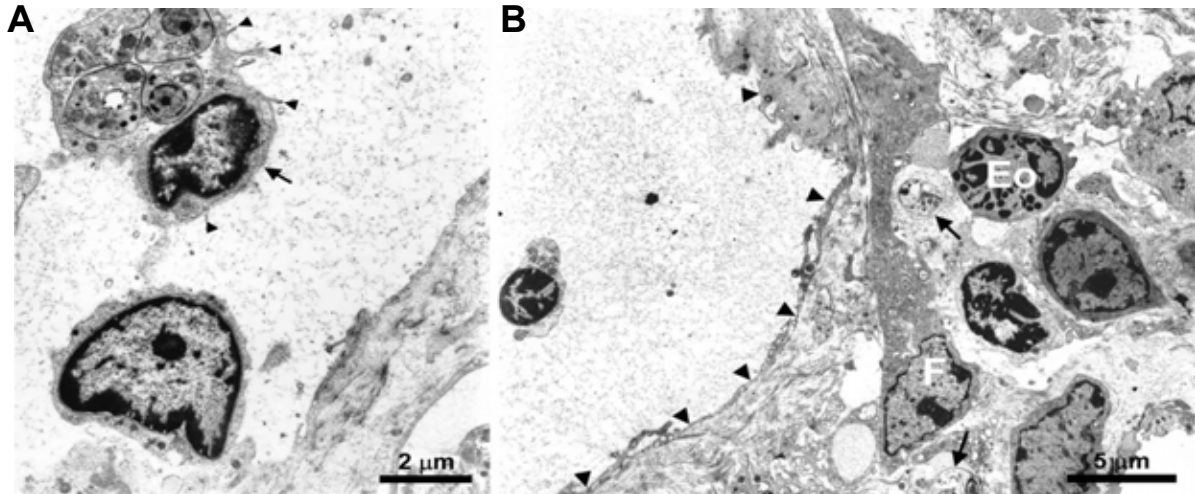


Figura 13. *Microscopía electrónica de lesiones del cojinete plantar de ratones BALB/c infectados con Leishmania mexicana.* A) Se observaron parásitos dentro de las células veladas que circulan en vasos linfáticos (flechas), B) Los capilares linfáticos se identifican por un endotelio muy delgado carentes de lámina basal y rodeados por fibras de colágena (cabezas de flecha). Se observaron *Leishmanias* extracelulares (flechas) cerca de vasos linfáticos. Se indica la presencia de fibroblastos (F), eosinófilos (Eo) y otros leucocitos.

## VII. Discusion

La participación de las células cebadas durante la infección por *Leishmania* sigue siendo controversial, ya que aun no queda establecido si éstas contribuyen al control o a la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, en este trabajo se analizó de manera comparativa la participación de las células cebadas en modelos murinos usando ratones resistentes (C57BL/6) y susceptibles (BALB/c) a la leishmaniasis.

Se utilizaron BMMCs de ratones BALB/c y C57BL/6, estimuladas *in vitro* con LPG de *L. mexicana* y se analizó la producción de citocinas y quimiocinas, la expresión de TLR2, así como la desgranulación. Adicionalmente, se estudió el número de células cebadas, su cinética de desgranulación y el número de parásitos en las lesiones de ambas cepas de ratón infectadas con *L. mexicana*.

Las células cebadas desempeñan un papel de centinelas en la respuesta inmune innata, ya que se encuentran distribuidas por debajo de los epitelios, en sitios estratégicos que les permite entrar en contacto tempranamente con los patógenos. Además, poseen receptores para PAMP, como los TLR y entre ellos, TLR2. Antecedentes señalan que TLR2 puede reconocer a LPG de *L. major* [27], por lo tanto, LPG también podría activar a las células cebadas a través de TLR2.

En el presente trabajo de tesis estudiamos comparativamente la respuesta de células cebadas de ratones susceptibles BALB/c y resistentes C57BL/6, cuando son estimuladas con LPG de *L. mexicana*. Estudiamos la respuesta de TLR2, la producción de citocinas y la desgranulación de células cebadas *in vitro* e *in vivo*, así como las características histológicas de lesiones de ratones susceptibles y resistentes a la infección por *L. mexicana*.

Encontramos que las células cebadas se comportan de manera distinta en ambas cepas. En los ratones resistentes C57BL/6, encontramos que las células cebadas estimuladas *in vitro* con LPG, aumentaron significativamente su expresión de TLR2, así como su secreción de IL-10, TNF- $\alpha$  y MIP-1 $\alpha$ , en comparación con ratones susceptibles BALB/c. Existen reportes señalando que en una infección causada por *L. donovani*, el silenciamiento de TLR2 en macrófagos inhibe la producción de óxido nítrico, mientras que la sobre-expresión de TLR2 causa una sobre-activación de NF- $\kappa$ B, resultando en mayor activación de genes para citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  [41]. La mayor producción de TNF- $\alpha$  en las células cebadas de ratones resistentes C57BL/6 se correlaciona con los datos obtenidos en pacientes con leishmaniasis cutánea localizada, la forma más “benigna” de la enfermedad, los cuales también producen más TNF- $\alpha$  en comparación con pacientes con leishmaniasis cutánea difusa, la forma progresiva y mortal de la enfermedad [43]. El papel crítico de TNF- $\alpha$  en el control de la enfermedad también ha sido demostrado en ratones que no expresan TNF- $\alpha$  [44]. La citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  ejerce un papel central en la inflamación, ya que activa al endotelio vascular induciendo sobre-expresión de E-selectinas y VCAM, induce vasodilatación, edema y expresión de proteínas pro-coagulantes [44]. Estos sucesos, aunado a la secreción de MIP-1 $\alpha$ , preparan al endotelio para reclutar células efectoras como neutrófilos, células dendríticas, macrófagos y linfocitos T. Adicionalmente, MIP-1 $\alpha$  induce un aumento en la citotoxicidad y proliferación de células NK [45] e induce la activación de la sintasa de óxido nítrico, la cual es esencial para activar los mecanismos leishmanicidas de



macrófagos [46]. Nuestros resultados también concuerdan con los estudios realizados por Antoniazzi [47], quien infectó ratones C57BL/6 con *L. major* y observó un aumento en la expresión de MIP-1 $\alpha$  en cojinete plantar y ganglios linfáticos. Esto demuestra que MIP-1 $\alpha$  tiene un papel importante en leishmaniasis, no solo al reclutar células al sitio de infección, sino también al activar a células que entran en contacto directo con el parásito y de esta manera favorecer la protección.

Además de la mayor producción de TNF- $\alpha$  y de MIP-1 $\alpha$  por células cebadas de ratones resistentes C57BL/6, encontramos que únicamente las células cebadas de estos ratones y no las de BALB/c, producen IL-10 cuando son estimuladas *in vitro* con LPG. La participación de IL-10 en leishmaniasis es controversial, ya que algunos autores reportan que IL-10 induce aumento en la carga parasitaria en ratones infectados [48], mientras que otros autores señalan que en ratones inoculados con IL-10 recombinante, disminuye el tamaño de la lesión [49]. En nuestro trabajo proponemos que la secreción de IL-10 por células cebadas de ratones resistentes C57BL/6 induce disminución del proceso inflamatorio causado por TNF- $\alpha$  y MIP1- $\alpha$ . Esta regulación posiblemente es crucial ya que se ha observado que en ratones deficientes en IL-10, infectados con *T. gondii*, el aumento de IL-12 provoca una inflamación intensa que resulta en choque séptico [50]. El papel modulador de IL-10 en la inflamación se ha demostrado en ratones deficientes de IL-10, infectados con *L. major*, en los cuales existe un aumento severo de citocinas proinflamatorias IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ , y de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y MIP-2 en etapas tempranas de la inflamación [51]. Asimismo, se ha

encontrado que pacientes con leishmaniasis mucocutánea, que cursan con una inflamación severa asociada a daño extenso del tejido, presentan niveles elevados de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  en asociación con bajos niveles de IL-10 y una reducción en el número de receptores para IL-10 [52].

Tomando en cuenta lo anterior proponemos que las células cebadas en ratones resistentes C57BL/6 posiblemente ayuden a controlar la progresión de la leishmaniasis debido a la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  y MIP-1 $\alpha$ , que activan el endotelio para favorecer el reclutamiento y activación de células efectoras, en asociación con la citocina reguladora IL-10, que controla la magnitud de la inflamación, evitando daño al tejido.

En este trabajo también encontramos diferencias en las características de desgranulación de células cebadas entre ambas cepas de ratón, tanto en los estudios *in vitro*, como en el número y la cinética de desgranulación de células cebadas en lesiones de ratones de ambas cepas, infectados con *L. mexicana*. Observamos que el estímulo con LPG de *Leishmania* indujo mayor desgranulación *in vitro* de las BMMC de ratones BALB/c, en comparación con células de ratones C57BL/6. La desgranulación de células ante la presencia de LPG ha sido reportada en la línea celular HMC-1, estimulada con LPG de *L. braziliensis* [40]. El mecanismo mediante el cual LPG induce desgranulación pudiera ser por el aumento de la concentración de calcio en el interior de la célula [53,54], que es necesario para la desgranulación de las células cebadas [55]. La mayor desgranulación *in vitro* de células cebadas de ratones BALB/c susceptibles a *Leishmania*, también se asocia con una mayor desgranulación *in vivo*, durante las

primeras 3 horas de infección. Estos resultados sugieren que la desgranulación temprana de las células cebadas en ratones BALB/c induce liberación inmediata de mediadores preformados como TNF- $\alpha$ , histamina, proteoglicanos, proteasas como triptasa, quimasa y carboxipeptidasa, los cuales pueden ejercer diferentes efectos inflamatorios como vasodilatación, extravasación de plasma, degradación o remodelación de tejido, reclutamiento y activación de neutrófilos, eosinófilos, basófilos [56,57]. La inducción de la expresión de moléculas de adhesión e incremento en la permeabilidad vascular, contribuyen al eficaz reclutamiento de células del sistema inmune innato, las cuales pueden ser infectadas por *Leishmania* y migrar a otros tejidos por medio de los vasos linfáticos (Figura 13). Por otro lado, el edema al igual que la permeabilidad vascular también favorecerían a que los promastigotes, que aun no se han internalizado, también pudieran diseminar por la linfa o torrente sanguíneo. La inflamación temprana en los ratones susceptibles BALB/c se confirmó mediante el análisis histológico de las lesiones, donde el infiltrado inflamatorio se pudo observar a los 3 días y 1 semana postinfección, y posteriormente disminuye progresivamente y a las 3 semanas de infección ya no se encontró infiltrado inflamatorio.

En contraste, las células cebadas de los ratones C57BL/6 resistentes a *Leishmania*, presentaron una reducida desgranulación cuando fueron estimulados *in vitro* con LPG y adicionalmente observamos un retraso en su máxima desgranulación en las lesiones *in vivo*, con respecto a lo observado en ratones BALB/c. Encontramos en los ratones C57BL/6 que la mayor desgranulación ocurre después de la primera semana de infección y, a diferencia de BALB/c, permanece

elevada durante las 4 semanas posteriores a la infección. Fue interesante encontrar también en los ratones C57BL/6, que la desgranulación coincidió con el aumento del proceso inflamatorio. En los ratones C57BL/6 la desgranulación y la inflamación ocurren en etapas tardías (después de la primera semana) y son más prolongadas, lo cual posiblemente se asocie con protección. El retraso en la desgranulación y en la inflamación permite reclutar tanto a células efectoras de la respuesta inmune innata como también a células efectoras de la respuesta inmune adaptativa, como linfocitos específicos, activadores de macrófagos infectados. La inflamación tardía y prolongada posiblemente favorece a que el parásito permanezca durante más tiempo en el sitio del inóculo, dando tiempo para la llegada de células efectoras cuyos mecanismos leishmanicidas son estimulados por linfocitos específicos. Adicionalmente, la mayor liberación de IL-10 encontrada en células cebadas de esta cepa de ratones, posiblemente también ayude a controlar la inflamación evitando daño en el tejido.

En nuestros resultados observamos que el estímulo del TLR2 de células cebadas con Pam<sub>3</sub>Cys indujo mayor producción de TNF- $\alpha$  y MIP-1 $\alpha$  que el estímulo con LPG. Se sabe que Pam<sub>3</sub>Cys activa a las células a través del heterodímero TLR1/TLR2 [58]. Sin embargo, aun se desconoce si en el reconocimiento de LPG por TLR2 también participan otros TLR, para formar heterodímeros. Con el estímulo de Pam<sub>3</sub>Cys no ocurrió desgranulación *in vitro* por células cebadas en ninguna de las dos cepas de ratones, lo cual concuerda con la literatura que ha reportado que no existe desgranulación en células cebadas de ratón (pero si en la línea celular humana LAD2, al ser estimuladas con Pam<sub>3</sub>Cys)

[55]. Falta por investigar si el estímulo de LPG que indujo la desgranulación en las células cebadas derivadas de médula ósea, ocurre solo a través de TLR2 o de si participa algún otro receptor en dicho estímulo.

En resumen, la desgranulación temprana de células cebadas en lesiones de ratones BALB/c produce inflamación, favoreciendo a la diseminación del parásito; mientras que la desgranulación constante de células cebadas de ratones C57BL/6 en etapas tardías de la infección, ejerce una respuesta a favor del huésped, ya que la inflamación induce un flujo permanente de células efectoras que cuentan con mecanismos microbicidas, las cuales son capaces de controlar la carga parasitaria y adicionalmente existe control de la inflamación.

## VIII. Conclusión

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que los ratones resistentes C57BL/6 tienen una respuesta inmune más eficaz contra *L. mexicana*, debido al aumento de receptores TLR2 que ayudan al reconocimiento de *Leishmania* y a activar a las células cebadas, con el subsecuente incremento en la secreción de citocinas y quimiocinas, además de poder controlar la inflamación mediante producción de citocinas reguladoras como IL-10. La desgranulación de células cebadas en las lesiones de estos ratones en tiempos tardíos de la infección y de manera más prolongada, le permite controlar la carga parasitaria, posiblemente debido a que las células reclutadas cuentan con mejor activación de sus mecanismos leishmanicidas, ya que pueden estar acompañadas por células de la respuesta inmune adaptativa específica.

Por otro lado, en los ratones BALB/c, la desgranulación en estados tempranos de la infección, en ausencia de IL-10, lleva a un proceso inflamatorio intenso y pasajero, el cual permite la diseminación del parásito ya que durante esta etapa temprana únicamente se reclutan células de la respuesta inmune innata, que no cuentan con el apoyo de linfocitos específicos para incrementar su actividad leishmanicida. Queda por establecerse, si estos fenómenos inflamatorios también participan en las distintas formas clínicas de leishmaniasis en humanos.

## IX.

## Referencias

- [1] Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27 (5):305-18.
- [2] Piscopo TV, Mallia Azzopardi C. Leishmaniasis. *Postgrad Med J* 2007;83 (976):649-57.
- [3] Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev* 2002;15 (4):595-612.
- [4] Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99 (3):239-51.
- [5] Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005;366 (9496):1561-77.
- [6] de Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98 (7):861-70.
- [7] Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:453-83.
- [8] Ho JL, Kim HK, Sass PM, He S, Geng J, Xu H, Zhu B, Turco SJ, Lo SK. Structure-function analysis of *Leishmania* lipophosphoglycan. Distinct domains that mediate binding and inhibition of endothelial cell function. *J Immunol* 1996;157 (7):3013-20.
- [9] McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J* 1995;310 (Pt 3):807-18.
- [10] Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp Mol Pathol* 2002;72 (2):132-41.
- [11] Handman E, Bullen DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol* 2002;18 (8):332-4.
- [12] Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania* major infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100 (16):9536-41.
- [13] von Stebut E, Udey MC. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect* 2004;6 (12):1102-9.
- [14] Scott P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol* 2005;7 (12):1707-13.
- [15] von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol* 2007;17 (2):115-22.
- [16] Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6 (2):135-42.
- [17] Feger F, Varadaradjalou S, Gao Z, Abraham SN, Arock M. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends Immunol* 2002;23 (3):151-8.

- [18] Mekori YA. The mastocyte: the "other" inflammatory cell in immunopathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114 (1):52-7.
- [19] Suto H, Nakae S, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration. *J Immunol* 2006;176 (7):4102-12.
- [20] Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol* 2002;23 (5):255-63.
- [21] Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, Visintin A, Segal DM. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest* 2001;108 (12):1865-73.
- [22] Marshall JS, Jawdat DM. Mast cells in innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114 (1):21-7.
- [23] Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2004;4 (10):787-99.
- [24] Prodeus AP, Zhou X, Maurer M, Galli SJ, Carroll MC. Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature* 1997;390 (6656):172-5.
- [25] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124 (4):783-801.
- [26] Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 2006;6 (12):895-906.
- [27] Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, Gonzalez A, Maldonado C, Isibasi A. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003;130 (2):65-74.
- [28] Takeda K, Akira S. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* 2003;5 (3):143-53.
- [29] Gumy A, Louis JA, Launois P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol* 2004;34 (4):433-44.
- [30] Lipoldova M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet* 2006;7 (4):294-305.
- [31] Havelkova H, Badalova J, Svobodova M, Vojtkova J, Kurey I, Vladimirov V, Demant P, Lipoldova M. Genetics of susceptibility to leishmaniasis in mice: four novel loci and functional heterogeneity of gene effects. *Genes Immun* 2006;7 (3):220-33.
- [32] Katakura K, Saito S, Hamada A, Matsuda H, Watanabe N. Cutaneous leishmaniasis in mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice. *Infect Immun* 1993;61 (5):2242-4.
- [33] Wershil BK, Theodos CM, Galli SJ, Titus RG. Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* infection in the mouse. *J Immunol* 1994;152 (9):4563-71.



- [34] Bidri M, Vouldoukis I, Mossalayi MD, Debre P, Guillosson JJ, Mazier D, Arock M. Evidence for direct interaction between mast cells and Leishmania parasites. *Parasite Immunol* 1997;19 (10):475-83.
- [35] Maurer M, Lopez Kostka S, Siebenhaar F, Moelle K, Metz M, Knop J, von Stebut E. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in Leishmania major infections. *Faseb J* 2006;20 (14):2460-7.
- [36] McConville MJ, Bacic A, Mitchell GF, Handman E. Lipophosphoglycan of Leishmania major that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84 (24):8941-5.
- [37] Gilead L, Bibi O, Razin E. Fibroblasts induce heparin synthesis in chondroitin sulfate E containing human bone marrow-derived mast cells. *Blood* 1990;76 (6):1188-95.
- [38] Gonzalez-Espinosa C, Odom S, Olivera A, Hobson JP, Martinez ME, Oliveira-Dos-Santos A, Barra L, Spiegel S, Penninger JM, Rivera J. Preferential signaling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells. *J Exp Med* 2003;197 (11):1453-65.
- [39] Ikeda T, Funaba M. Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Immunol Lett* 2003;88 (1):21-6.
- [40] de Oliveira MP, Lima MC, Calheiros AS, Martins MA, Antas PR, De Luca PM, Pirmez C. Leishmania (Viannia) braziliensis: human mast cell line activation induced by logarithmic and stationary promastigote derived-lysates. *Exp Parasitol* 2005;109 (2):72-9.
- [41] Flandin JF, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of Leishmania donovani promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur J Immunol* 2006;36 (2):411-20.
- [42] Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Muller I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite Leishmania major. *Infect Immun* 2004;72 (4):1920-8.
- [43] Leopoldo PT, Machado PR, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, de Jesus AR, Ho JL, Guimaraes LH, Bacellar O, Carvalho EM. Differential effects of antigens from L. braziliensis isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis* 2006;6:75.
- [44] Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214 (2):149-60.
- [45] Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 2002;71 (2):173-83.
- [46] Roychoudhury K, Roy S. Role of chemokines in Leishmania infection. *Curr Mol Med* 2004;4 (6):691-6.
- [47] Antoniazzi S, Price HP, Kropf P, Freudenberg MA, Galanos C, Smith DF, Muller I. Chemokine gene expression in toll-like receptor-competent and -deficient mice infected with Leishmania major. *Infect Immun* 2004;72 (9):5168-74.
- [48] Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 2001;166 (2):1141-7.

- [49] Viana da Costa A, Huerre M, Delacre M, Auriault C, Correia Costa JM, Verwaerde C. IL-10 leads to a higher parasite persistence in a resistant mouse model of *Leishmania major* infection. *Parasitol Int* 2002;51 (4):367-79.
- [50] Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kuhn R, Muller W, Trinchieri G, Sher A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 1996;157 (2):798-805.
- [51] Ji J, Sun J, Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 2003;71 (8):4278-88.
- [52] Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Jr., Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 2005;73 (12):7853-9.
- [53] Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 2005;18 (2):293-305.
- [54] Moreno SN, Docampo R. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol* 2003;6 (4):359-64.
- [55] Zaidi AK, Thangam ER, Ali H. Distinct roles of Ca<sup>2+</sup> mobilization and G protein usage on regulation of Toll-like receptor function in human and murine mast cells. *Immunology* 2006;119 (3):412-20.
- [56] Metz M, Grimbaldston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* 2007;217:304-28.
- [57] Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *Faseb J* 2006;20 (13):2366-8.
- [58] Fehrenbach K, Port F, Grochowy G, Kalis C, Bessler W, Galanos C, Krystal G, Freudenberg M, Huber M. Stimulation of mast cells via FcγepsilonR1 and TLR2: the type of ligand determines the outcome. *Mol Immunol* 2007;44 (8):2087-94.

## **X. ANEXOS**

Dear Dr Becker

PIM-2007-0122.R1 Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host

Thank you for submitting this paper to Parasite Immunology.

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

Online Open is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via the Blackwell Synergy website. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of £1250 (equivalent to \$2500) to be met by or on behalf of the author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via the Blackwell Synergy service.

If you wish your paper to be OnlineOpen you are required to complete the combined payment and copyright licence form available from our website at:

[http://www.blackwellpublishing.com/pdf/OOF\\_PIM.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/OOF_PIM.pdf)

If you do not wish your paper to be OnlineOpen, you are required to complete the standard Exclusive Licence Form available from our website at:

[http://www.blackwellpublishing.com/pdf/ELF\\_PIM.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/ELF_PIM.pdf)

Papers cannot be published until ONE of the above two completed forms has been received. Once completed the forms should be returned by email if at all possible.

Alternatively they could be faxed to:

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

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

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



# Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host

M. I. V. CARDOSO,<sup>1</sup> N. SALAIZA,<sup>1</sup> J. DELGADO,<sup>1</sup> L. GUTIÉRREZ-KOBEH,<sup>1</sup> A. P. TORRES<sup>2</sup> & I. BECKER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Experimental, <sup>2</sup>Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

## SUMMARY

*The regulatory effect of mast cells on the pathogenesis of leishmaniasis is unclear. We report a comparative analysis of TLR2 membrane expression, TNF- $\alpha$ , IL-10 and MIP-1 $\alpha$  production, and granule release of bone marrow-derived mast cells (BMMCs) from susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice, stimulated in vitro with Leishmania mexicana lipophosphoglycan (LPG). We studied the kinetics of mast cell degranulation and parasite numbers in lesions of both mouse strains infected with L. mexicana. We found that BMMCs of C57BL/6 mice expressed more TLR2 and produced higher levels of both cytokines and MIP-1 $\alpha$ , whereas BALB/c BMMCs significantly augmented their granule release. Lesions of BALB/c mice showed higher levels of degranulated mast cells at 3 h of infection, whereas after 3 days of infection, the number of degranulated mast cells in C57BL/6 was higher than in BALB/c lesions. Throughout infection, BALB/c mice harboured more parasites. The regulatory effect of mast cells seems to depend on the genetic background of the host: mast cells of BALB/c mice facilitate disease progression due to an augmented inflammatory response early in the infection, whereas mast cells of C57BL/6 mice produce cytokines that regulate inflammation and maintain an elevated number of immune cells in the lesions, promoting disease control.*

**Keywords** cytokines, granule release, *L. mexicana*, Mast cells, TLR2

## INTRODUCTION

*Leishmania mexicana* causes a progressive disease which rapidly spreads in the susceptible BALB/c mouse, whereas in C57BL/6 mice, the disease tends to be self healing. In these mouse models it has been established that Th1 cytokines lead to disease resistance. On the other hand, the early presence of IL-4 and IL-10 in BALB/c mice has been considered a hallmark for the induction of a Th2 response and disease progression (1). The cells responsible of producing these cytokines in the early phases of the disease remain controversial, although cells of the innate immune system are a likely source. One of the possible candidates that produce these cytokines are mast cells, which are pivotal effector cells in many allergic diseases, through their capacity to release a wide range of preformed and newly synthesized pro-inflammatory mediators (2). Due to their location, mast cells are one of the first cells to encounter invading pathogens. They are found in association with blood vessels, as well as in tissues and epithelia exposed to external environment such as skin and mucosal linings, which are common portals of infection (3). Thus, they have a crucial sentinel role in host defence.

Apart from IgE receptors, that have been shown to trigger the immediate hypersensitivity response towards allergens, mast cells have a wide variety of cell-surface receptors that can interact directly with pathogens such as Toll-like receptors (TLRs) and mannosylated receptors, in addition to multiple receptors that recognize diverse stimuli such as cytokines, chemokines and complement components (4). These cells release preformed mediators such as TNF- $\alpha$  and histamine, and *de novo*-synthesized mediators such as leucotrienes, prostaglandins and various cytokines and chemokines (2). Mast cells have been reported to bind various bacteria through TLR2 and TLR4. They have also been shown to participate in parasitic infections, although their role in leishmaniasis remains controversial. In *L. major* infections in C57BL/6 mice, mast cells have been shown to contribute to the control of the disease, since mast cell-deficient mice developed larger skin lesions containing significantly

**Correspondence:** Ingeborg Becker, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Dr Balmis 148, Colonia Doctores, México D.F., 06726, México (e-mail: becker@servidor.unam.mx).

Received: 20 November 2007

Accepted for publication: 20 April 2008

more parasites with enhanced spreading of the parasites to the spleen (5). It was further demonstrated that TNF- $\alpha$  released by mast cells recruited neutrophils which in turn secrete MIP-1 $\alpha$ , leading to the influx of macrophages and dendritic cells into sites of cutaneous granuloma formation in *Leishmania* lesions, thus mediating protective immunity (6). On the other hand, extensive degranulation of cutaneous mast cells has been shown at sites of early *Leishmania* infections and has been associated with disease progression (7). It is not clear, whether mast cells from the resistant mouse strains show different inflammatory response than mast cells from susceptible mouse strains, when confronted with surface molecules of *Leishmania*, such as lipophosphoglycan (LPG), one of the most abundant molecules on the parasite surface which has previously been shown to stimulate TLR2 (8). Furthermore, it is not known whether stimulation with *Leishmania* LPG leads to different mast cell degranulation in susceptible and resistant mouse strains, and if this correlates with disease evolution.

In this study, we aim at investigating the response of bone marrow-derived mast cells (BMMCs) from resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice stimulated with *L. mexicana* LPG *in vitro*. In addition, we analysed the kinetics of mast cell degranulation in tissues of BALB/c and C57BL/6 mice infected with *L. mexicana* promastigotes and correlated the results with parasite numbers found in the tissues. We found striking differences between BMMCs of the two mouse strains, both *in vitro* and *in vivo*. The implications of these results in disease pathogenesis are discussed.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Male C57BL/6 and BALB/c mice were purchased from Harlan Laboratory (Mexico City, Mexico) and were raised at the animal facility of the Departamento de Medicina Experimental following the national guidelines for animal care.

### Cell culture

Mice were sacrificed by cervical dislocation following humane handling, as established by the ethical committee of the National Autonomous University of Mexico.

Primary BMMCs were obtained from both BALB/c and C57BL/6 mice. The leg bones were removed, cleaned and sterilized. The bone marrow was flushed from femurs and tibias of BALB/c and C57BL/6 mice by use of a syringe containing culture medium RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) containing 10% FBS, endotoxin free (Gibco), penicillin/streptomycin/glutamine (Gibco), Hepes 1 M (Sigma, St Louis, MO), non-essential amino acids (Sigma), MEM

sodium pyruvate 100 mM (Gibco), 10 ng/mL of IL-3 (Pepro- tech, Rock Hill, NJ) and SCF (stem cell factor) 10 ng/mL (Pepro- tech, Rock Hill, NJ). After 8 days, cells were replaced in RPMI medium and cultured for 8 weeks. After this time period, BMMCs were stained with toluidine blue (Merck, Germany), and connective tissue mast cells were identified by 0.5% alcian blue (Sigma), 0.1% safranin (ABS) (Sigma) staining (9). FACS analysis of cell surface expression of c-kit was done to confirm the differentiation of BMMCs.

### LPG purification

*Leishmania mexicana* promastigotes were grown in blood agar (NNN medium) overlaid with RPMI 1640 medium (Gibco), supplemented with 10% heat-inactivated FBS at 28°C. Parasites were subcultured every 3–4 days and grown to a density of  $1 \times 10^7$ /mL. For LPG purification,  $10^{10}$  promastigotes were harvested and LPG was extracted and purified as described by McConville *et al.* (10), with some modifications. Briefly, the supernatant was removed and pellet was extracted with chloroform : methanol : water (1 : 2 : 0.5 v/v) for 2 h at room temperature. The insoluble material was used for LPG extraction with 9% 1-butanol in water ( $2 \times 50$  mL) and the pooled supernatants were vacuum-dried. LPG was purified from this fraction by octyl-sepharose chromatography in a high-pressure liquid chromatography apparatus using a 1-propanol gradient (5–60%) in 0.1 M ammonium acetate. The preparations were negative when tested for the presence of endotoxin, using the *Limulus* sp. amoebocyte lysate assay (E-Toxate Kit, Sigma). Polymyxin B (5  $\mu$ g/mL) was also used to confirm the absence of contaminating lipopolysaccharide (LPS). A sample was analysed for protein contaminants using SDS-PAGE with silver staining. The preparation was devoid of protein contaminants.

### Cytokine and chemokine measurements

The effect that *L. mexicana* LPG had on the production of IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  in mast cells was analysed as follows. Because IL-3 induces cytokine mRNA responses, cells were removed from IL-3 and SCF 4 h before stimulation (11). Cells were washed with RPMI and incubated for 18 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> with 10  $\mu$ g/mL of LPG in 1 mL RPMI medium, supplemented with 10% heat-inactivated FBS. For positive controls, cells were stimulated with 500 ng/mL Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> (EMC Microcollections, Tuebingen, Germany), and nonstimulated cells were used as negative controls. The cell free supernatants from cultures were harvested and the concentrations of the cytokines were determined by standard sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. In brief, 96-well microtitre plates (Costar, Corning, NY) were coated with unconjugated anticytokine

capture antibodies and biotin-labelled detection antibodies. The antibodies used were anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-10, anti-TNF- $\alpha$  (BD Pharmingen, San Jose, CA) and anti-MIP-1 $\alpha$  ((R&D Systems, Minneapolis, MN).

### Quantification of TLR2 expression

BMMCs from BALB/c and C57BL/6 mice were stimulated as described for cytokine and chemokine measurements and fixed in 2% paraformaldehyde, blocked with 0.5% mouse serum and stained with FITC-conjugated anti-TLR2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD117 (Pharmingen), overnight at 4°C. Cells were analysed using a FACScan flow cytometer equipped with CELLQUEST software (BD Immunocytometry Systems, Mountain View, CA).

### Measurement of *in vitro* mast cell degranulation

Degranulation was determined by measuring the release of the granule marker  $\beta$ -hexosaminidase by use of a colourimetric assay, as described previously (12) with some modifications. Briefly, BMMCs ( $1 \times 10^6$ /mL) were incubated with LPG (10  $\mu$ g/mL), Pam<sub>3</sub>Cys (500 ng/mL) in Tyrode's medium (10) with 10% FBS for 60 min. As a positive control, BMMCs were incubated with 1 M ionomycin (Sigma) and 50  $\mu$ M PMA (Sigma). After centrifugation (329 g, 10 min at 4°C), the supernatant was separated and the cells were lysed in 0.5% Triton X-100 (Sigma). Thereafter, 20  $\mu$ L of the supernatant or the cell lysate were mixed with 50  $\mu$ L of the substrate, 1.3 mg/mL *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- $\beta$ -D glucosaminide (Sigma) in 0.1 M citrate (Sigma), pH 4.5. After incubation for 60 min at 37°C, 150  $\mu$ L of 0.2 M glycine pH 10.5 (Bio-Rad, Hercules, CA) were added and the absorbance was measured at 405 nm. The percentage of  $\beta$ -hexosaminidase release was calculated using the following formula: percent release = (OD of the stimulated supernatant – OD of the unstimulated supernatant)  $\times$  100/(OD of the total cell lysate – OD of the unstimulated supernatant).

### Analysis of mast cell number and percentage degranulation in tissues of BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*

Twenty micro litres of metacyclic promastigotes of *L. mexicana* ( $1 \times 10^6$ ) or PBS were injected intradermally into right hind foot pads of BALB/c and C57BL/6 mice, and the mast cell degranulation was analysed throughout the infection for 8 weeks. Animals were sacrificed by cervical dislocation and tissues were processed for histology and analysed using light microscopy. Briefly, the tissues were cut with 4 mm biopsy punch (Amherst, NY) fixed in 10% formal-saline, embedded

in paraffin, stained with toluidine blue, mounted and observed under light microscopy. Mast cells were easily identified by the metachromatic staining exhibited by their granules. Three mice of each strain were analysed at 1 and 3 h, 3 days, 1, 3, 4 and 8 weeks, and mast cell degranulation was analysed by counting 100 toluidine blue-positive cells and the number or degranulated and nondegranulated cells was determined in lesions and normal tissues using high power fields (1000 $\times$ ). The number of mast cells/mm<sup>2</sup> was counted and their increase with regard to normal tissues was determined.

### Parasite counts in lesions of BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*

Parasites were counted in the lesions of both mouse strains that had been analysed for mast cell degranulation. Serial step-sectioning of the infected tissue was followed by haematoxylin–eosin staining of the slides. Parasites were counted in 10 high power fields (1000 $\times$ ) of the lesions.

### Histological analysis of lesions

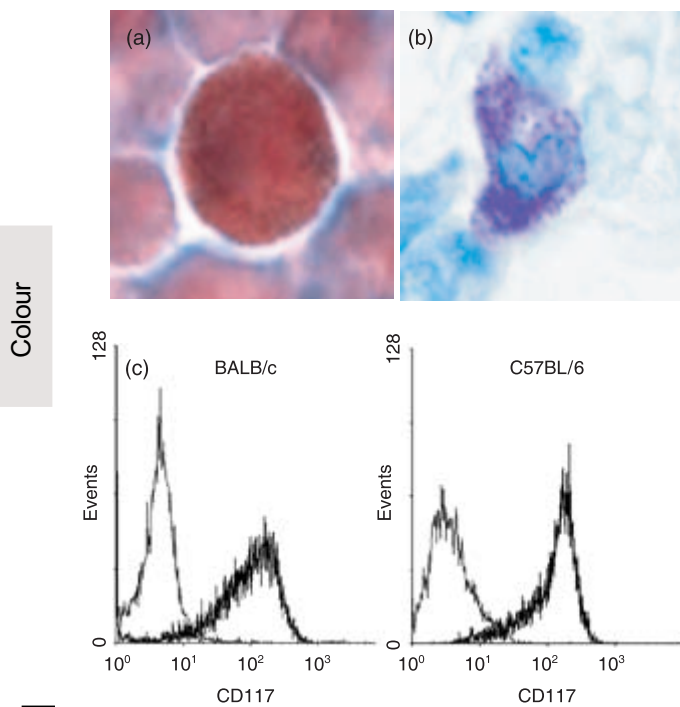
Histological analysis of lesions of BALB/c and C57BL/6 mice infected with *L. mexicana* was carried out at different time periods in the lesions of both strains that had been analysed for mast cell degranulation. Serial step-sectioning of the infected tissue was followed by haematoxylin–eosin staining of the slides. Histology analysis was done in high power fields (1000 $\times$ ) of the lesions.

### Electron microscopic studies

Ultrastructural analysis of lesions of the right hind footpad of BALB/c mice infected with *L. mexicana* was performed. The tissues were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, during 2 h at 4°C. After washing three times in 0.15 M cacodylate buffer, pH 7.2, containing 0.025 M sucrose and 0.05% calcium chloride, the tissues were post-fixed in a solution of 1% OsO<sub>4</sub> in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 45 min at 4°C, and then were dehydrated in gradually increasing concentration of ethanol, transferred to propylene oxide and embedded in Araldite 6005. Ultrathin sections, obtained with diamond knife and contrasted with uranyl acetate and lead citrate, were examined with Zeiss EM-109 electron microscope.

### Statistical analysis

Cytokine data were tested for statistical significance using one-way ANOVA and Bonferroni post-test. Degranulation *in vivo*, the number of mast cells and the number of parasites were tested using Mann–Whitney *U*-test and the data are



**1** **Figure 1** Staining of mast cells and CD117 expression. (a) Mast cells derived from murine bone marrow were stained with alcian blue/safranin to determine their differentiation into connective tissue cells, where granules stained with a combination of blue and red are shown. (b) Cells were stained with toluidine blue to determine their differentiation to mast cells. Stained metachromatic granules are present in the cytoplasm. (c) Flow cytometry profiles of the expression of CD117 in the membrane of mast cells from BALB/c and C57BL/6 mice.

expressed as mean  $\pm$  SEM. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Cell culture

After 8 weeks of culture of bone marrow cells in the presence of IL-3 and SCF, 98% of the cells stained with toluidine blue (Figure 1a) and 79% stained with alcian blue/safranin (ABS) (Figure 1b), showing that the cells had differentiated to BMMCs. Ninety percent of BMMCs from both BALB/c and C57BL/6 mice showed membrane expression of c-kit (CD117), which indicated that they had differentiated into mast cells (Figure 1c).

### Cytokine production

BMMCs from C57BL/6 mice secreted more IL-10 ( $166 \pm 14$  pg/mL) in basal conditions than BALB/c mice

( $21 \pm 4$  pg/mL). Upon stimulation with LPG, BMMCs from both mouse strains increased their IL-10 production, although BMMCs of C57BL/6 mice produced significantly higher levels ( $249 \pm 1$  pg/mL) as compared to BALB/c mice ( $77 \pm 7$  pg/mL) ( $P < 0.05$ ). On the other hand, when BMMCs were stimulated with Pam3Cys, a specific ligand for TLR2, cells from both mouse strains increased their IL-10 production in similar levels (Figure 2a).

The stimulation with LPG also increased TNF- $\alpha$  production in BMMCs of both mouse strains, yet in C57BL/6 mice the production was significantly higher ( $913 \pm 35$  pg/mL) than in BALB/c mice ( $600 \pm 32$  pg/mL) ( $P < 0.05$ ). The stimulatory effect achieved with Pam3Cys induced equally high levels of TNF- $\alpha$  production in both mouse strains, which were significantly higher than with LPG stimulation (Figure 2b).

*Leishmania* LPG stimulation also increased MIP-1 $\alpha$  production in BMMCs of both mouse strains, yet the production was significantly higher in C57BL/6 mice ( $1284 \pm 98$  pg/mL) as compared to BALB/c mice ( $690 \pm 52$  pg/mL) ( $P < 0.05$ ). The stimulation with Pam3Cys induced an equally intense MIP-1 $\alpha$  production in BMMCs of both mouse strains, which was higher than the achieved with LPG stimulus (Figure 2c).

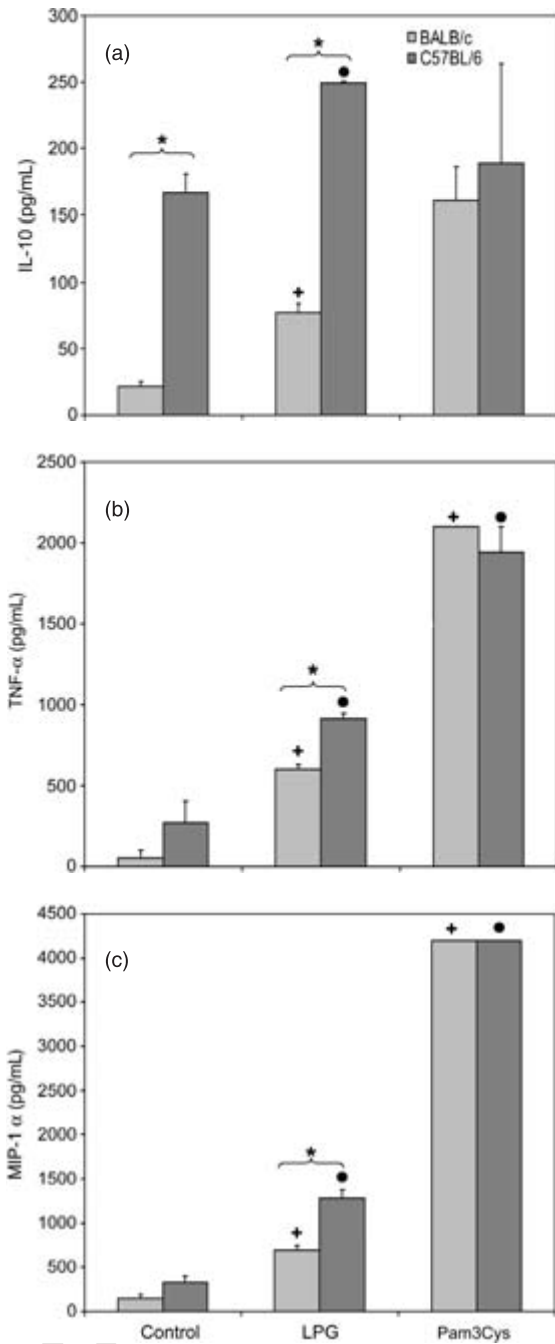
We found neither IL-4 nor IL-5 in BMMCs of both mouse strains, stimulated with LPG or with Pam3Cys (data not shown).

The surface expression of TLR2 was also analysed after stimulation of BMMCs with LPG or with Pam3Cys. In basal conditions, BMMCs of C57BL/6 mice showed a significantly higher surface expression of TLR2 as compared to BALB/c mice ( $P < 0.05$ ). After stimulation with LPG, only BMMCs of C57BL/6 mice significantly increased their TLR2 expression, whereas in BALB/c mice the surface TLR2 expression augmented to a lesser degree ( $P < 0.05$ ). The stimulation with Pam3Cys increased the TLR2 expression in BALB/c mice, but even in this condition the levels remained lower than those observed in BMMCs of C57BL/6 mice ( $P < 0.05$ ) (Figure 3).

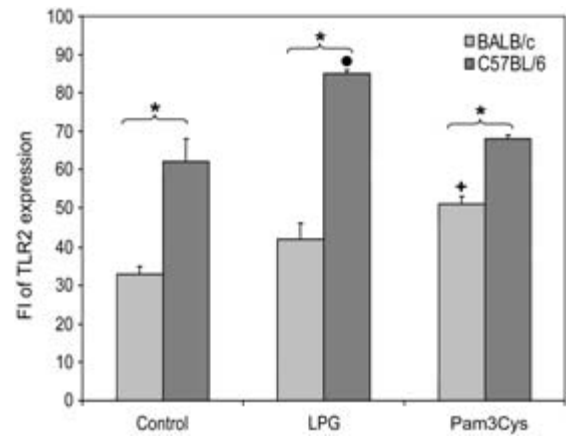
### *In vitro* degranulation

The degranulation of BMMCs *in vitro* was measured by  $\beta$ -hexosaminidase release. Stimulation with LPG led to a significant increase in degranulation of BMMCs of BALB/c mice ( $40 \pm 4\%$ ) ( $P < 0.05$ ) as compared to unstimulated cells. In contrast, LPG induced a lower degree of degranulation ( $24 \pm 10\%$ ) in C57BL/6 mice. Pam3Cys did not stimulate degranulation in cells from either mouse strain, whereas both groups of cells responded equally well to PMA/ionomycin stimulation, releasing high levels of  $\beta$ -hexosaminidase ( $P < 0.05$ ) (Figure 4).

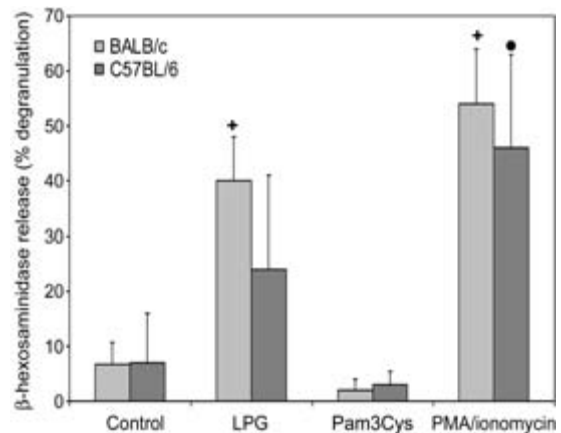




**Figure 2** LPG from *Leishmania mexicana* induced more cytokine and chemokine production in mast cells from BALB/c mice than C57BL/6. The production of IL-10 (a), TNF- $\alpha$  (b) and the chemokine MIP-1 $\alpha$  (c) was analysed in cells stimulated with LPG and Pam3Cys for 18 h. Unstimulated cells were used as control. Cytokines were determined in cell free supernatants by ELISA. Values represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* indicates differences between groups, + indicates differences between control and stimulated cells in BALB/c mice, ● indicates differences between control and stimulated cells from C57BL/6 mice. All symbols represent statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Figure 3** LPG from *Leishmania mexicana* increases the expression of TLR2 in BMDMCs. TLR2 expression was determined by flow cytometry in BMDMCs from BALB/c and C57BL/6 mice stimulated with LPG and Pam3Cys. Data are expressed as mean fluorescence intensity. Bars represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* indicates differences between groups, + indicates differences between control and stimulated cells from BALB/c mice, ● indicates differences between control and stimulated cells from C57BL/6 mice. All symbols represent statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).



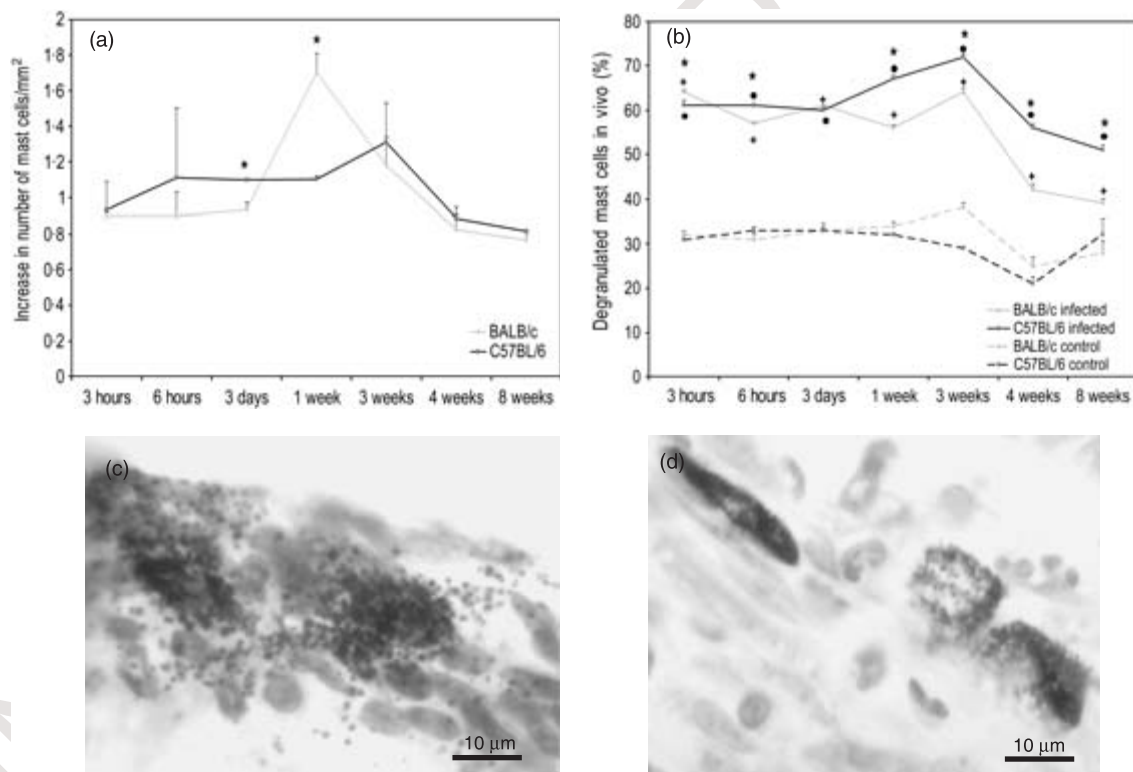
**Figure 4** LPG causes degranulation of BMDMCs from BALB/c mice. Degranulation was determined by  $\beta$ -hexosaminidase release in BMDMCs from BALB/c and C57BL/6 mice stimulated with LPG and Pam3Cys for 60 min. Cells stimulated with ionomycin were used as a positive control. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. + indicates differences between control and stimulated cells from BALB/c mice, ● indicates differences between control and stimulated cells from C57BL/6 mice. Both symbols represent statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

### Mast cell number and degranulation analysis in tissues of BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*

The analysis of mast cells in the lesions of BALB/c and C57BL/6 mice at 1 and 3 h, 3 days, 1, 3, 4 and 8 weeks after the infection with *L. mexicana* revealed that the total number of mast cells in the lesions of BALB/c began to increase after 3 days of infection and after 1 week, this increase of mast cells was significantly higher than in C57BL/6 mice. After the first week of infection, mast cells in BALB/c lesions diminished gradually throughout the 8-week observation period. In contrast, mast cells in lesions of C57BL/6 mice began to increase 1 week after the infection, reaching their peak at 3 weeks and diminishing thereafter. It is noteworthy, that the increase of mast cells in lesions of BALB/c mice occurs faster and in higher numbers as compared to C57BL/6 mice (Figure 5a). Even though mast cells

in lesions of both mouse strains degranulated significantly more than in control tissues, the number of degranulated mast cells in lesions of BALB/c mice was significantly higher than in C57BL/6 at 3 h of infection. After 1 week, the number of degranulated mast cells augmented in lesions of C57BL/6 mice and remained significantly higher than in BALB/c mice throughout the 8-week study period ( $P < 0.05$ ). Interestingly, after 3 weeks infection, the number of degranulated mast cells in the lesions of both mouse strains began to decline, albeit the significant differences between the strains remained (Figure 5b). Toluidine staining of BALB/c lesions after 3 weeks of infection still shows some mast cells in the process of degranulation (Figure 5c). The staining of C57BL/6 lesions shows some mast cells that have already degranulated at this time point (Figure 5d).

Parasite counts were done in the same lesions in which mast cells had been analysed. Throughout the 8-week period of the analysis, BALB/c mice consistently presented

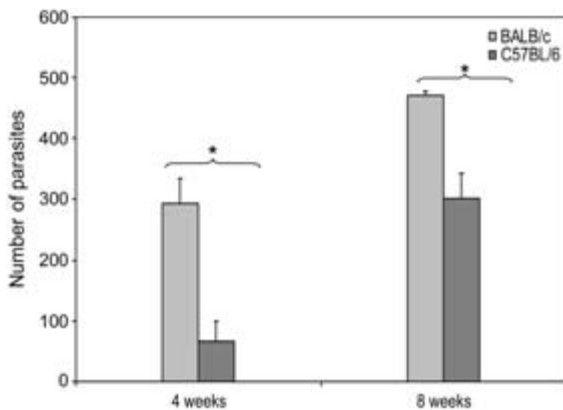


**Figure 5** Number and percentage degranulation of mast cells in lesions of BALB/c and C57BL/6 mice. Mice were infected in the hind footpad with  $1 \times 10^6$  *Leishmania mexicana* promastigotes. After 3, 6 h, 3 days, 1, 3, 4 and 8 weeks, mice were sacrificed and paraffin sections of lesional tissue were stained with toluidine blue. (a) Mast cell numbers were determined in the lesions of infected mice at different time points post-infection at 1000 $\times$  magnification. The increase in the number of mast cells/mm<sup>2</sup> in lesions with regard to normal tissue is shown. (b) Degranulation of mast cells in lesions of infected mice. 100 cells were counted and the number of degranulated cells was counted in lesions and normal tissues of BALB/c and C57BL/6 mice. (c) Degranulated mast cells of BALB/c mice after 3 weeks of infection. (d) Mast cells of C57BL/6 mice after 3 weeks of infection. \* indicates differences between groups, + indicates differences between cells of control and infected BALB/c mice, ● indicates differences between cells of control and infected C57BL/6 mice. Three mice were analysed for all the time periods. All symbols represent statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

significantly higher levels of parasites in the lesions, as compared to C57BL/6 mice ( $P < 0.05$ ) (Figure 6).

### Histological analysis of lesions

Histological analysis of lesions of BALB/c and C57BL/6 mice infected with *L. mexicana* showed different inflammatory kinetics in both mouse strains. In BALB/c mice the inflammatory infiltrate of polymorphonuclear cells and eosinophils was very intense during the first 3 days, thereafter the inflammation gradually subsided and was not very



**Figure 6** Parasite burden in lesions of infected mice. Parasites were counted in the lesions of BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. Mice were sacrificed at different time points and paraffin sections of lesional tissue stained with haematoxylin–eosin. The number of parasites was determined by counting three fields at 1000× magnification. Values represent mean ± SEM of three independent experiments. \* indicates differences between groups. Symbols represent statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

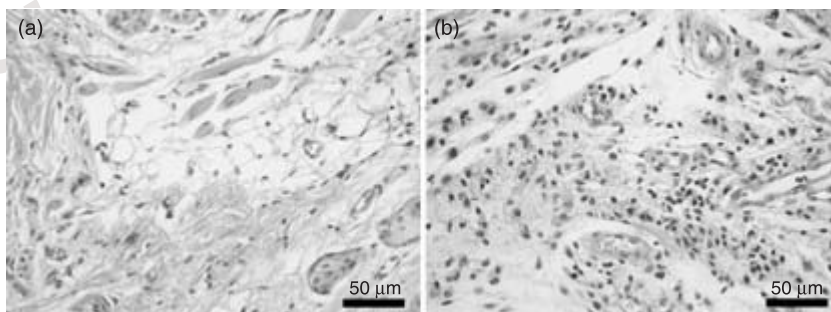
intense at 3 weeks of infection (Figure 7a). In contrast, in C57BL/6 mice the intense inflammatory infiltrate became evident only after the first week of infection and remained intense for the next 3 weeks (Figure 7b).

### Electron microscopy of lesions

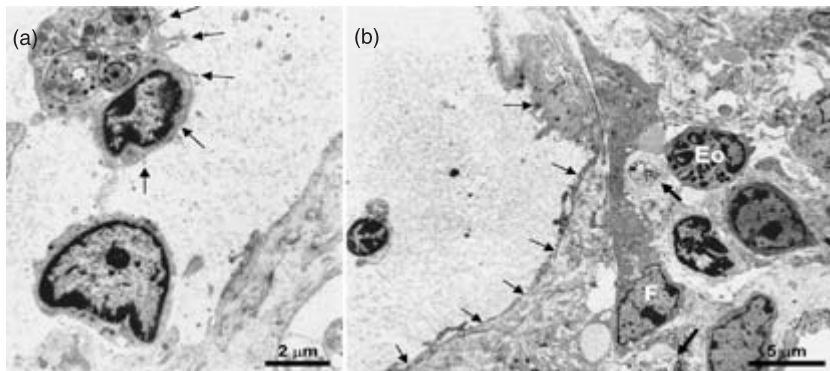
Electron microscopy analysis of the lesions in the tissue sections of BALB/c mice, show inflammatory infiltrate including neutrophils and eosinophils infected with *Leishmania*. Some *Leishmania* were found inside veiled-like cells circulating in lymphatic capillaries (Figure 7a). These vessels were identified by their very thin or attenuated endothelium and the lack of a basal lamina. Additionally, extracellular *Leishmania* could also be observed near to a lymphatic vessel (Figure 7b) (Figure 8).

### DISCUSSION

Mast cells have been extensively studied in allergies. These cells are located strategically at the host–environment interface and function as sentinel cells that can contribute to either host defence or disease progression, depending upon the mediators that they secrete. Mast cells contribute both as initiators as well as effectors of innate immunity. They promote cell migration through liberation of chemotactic factors such as MIP-1 $\alpha$  or LTB $_4$  that recruit polymorphonuclear granulocytes, macrophages, dendritic cells as well as T cells, and facilitate the influx of cells and inflammatory mediators into infected tissues through the liberation of potent vasoactive components that increase local blood flow and vascular permeability (3). One of these mediators is histamine, which not only regulates local blood flow but also participates in the regulation of the immune response by inhibiting IL-12 production, while stimulating the generation



**Figure 7** Histological analysis of lesions of infected mice with *Leishmania mexicana* at 3 weeks after infection. Histological analysis was done in the lesions of both strains that had been analysed for parasite counts. Mice were sacrificed after 3 weeks of infection and paraffin sections of lesional tissue was stained with haematoxylin–eosin. The analysis was done at 1000× magnification. (a) Moderate inflammation is present in the lesion of BALB/c mice after 3 weeks of infection. (b) An intense inflammatory infiltrate process can be observed in lesion of C57BL/6 mice after 3 weeks of infection. The lesion shows neutrophils, eosinophils and macrophages.



**Figure 8** Transmission electron microscopy of lesions of the right hind footpad of BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana* after 3 days of infection. (a) Parasites are found inside cells circulating in lymphatic vessels (arrows). (b) Extracellular *Leishmania* (arrows) can be observed near lymphatic capillaries devoid of a basal lamina surrounded by bundles of collagen fibrils (arrowheads). Note the presence of fibroblasts (F), eosinophils (Eo) and other leucocytes.

of IL-10, IL-5 and IL-6 in human monocytes and dendritic cells (3,13,14). Mast cells can also participate in the direct elimination of pathogens. Upon exposure to infections, mast cells enter the cell cycle, proliferate and secrete antimicrobial peptides. They are phagocytic cells with oxidative and non-oxidative killing systems, present fusion of lysosomes with phagocytic vacuoles and function as antigen presenting cells (15,16). These cells also possess innate receptors such as TLR2.

We have previously shown that LPG of *Leishmania* is a ligand for TLR2 (8). It is therefore feasible, that *Leishmania* LPG can also activate mast cells through TLR2. It has been reported that mast cells phagocytose *L. major* and *L. donovani*, leading to degranulation and TNF- $\alpha$  secretion (17). Yet the role of mast cells in *Leishmania* infections remains controversial, since these cells have been associated both with disease control as with disease progression, in different experimental models (5,7,18). Thus, many interrogatives remain regarding the regulatory effects of mast cells in the pathogenesis of leishmaniasis.

In the present study, we performed a comparative analysis of the response of BMMCs from susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice stimulated *in vitro* with *L. mexicana* LPG. We analysed TLR2 expression in these cells as well as their ability to respond to the ligands Pam3Cys and *Leishmania* LPG, their cytokine and chemokine production as well as their degranulation. Additionally, we studied the kinetics of mast cell numbers, their degranulation and the parasite numbers in lesions of both mouse strains infected with *L. mexicana*.

Our data show that TLR2 expression was significantly higher in BMMCs of resistant C57BL/6 mice as compared to susceptible BALB/c mice, both in basal conditions as well as after the stimulation with *L. mexicana* LPG. In accordance, production of TNF- $\alpha$ , IL-10 and MIP-1 $\alpha$ , all of which are induced by TLR2 activation (19), was higher in LPG-stimulated BMMCs of C57BL/6 mice, as compared to cells from BALB/c mice. In contrast, *Leishmania* LPG elicited a

more intense degranulation of BALB/c BMMCs *in vitro*, as compared to C57BL/6 mast cells. The increased degranulation *in vitro* also correlated with the more intense degranulation of mast cells during the very early (3 h) stages of the infection of BALB/c mice. The stimulatory effect of LPG on histamine release has previously been shown in a human mast cell line (HMC-1), stimulated with LPG from *L. braziliensis* (20). It is noteworthy that Pam3Cys stimulation did not lead to BMMCs degranulation which is in accordance with the literature (21–23). It is presently not clear whether LPG induces degranulation through stimulation of TLR2 and/or through other receptors.

After 1 week of infection, the number of degranulated mast cells in lesions of C57BL/6 mice increased and surpassed the number observed in BALB/c mice. Yet throughout the infection period, BALB/c mice consistently harboured more parasites in the lesions than in the resistant C57BL/6 strain.

The kinetics of mast cell degranulation in lesions of both mouse strains was reflected in the characteristics of the inflammatory response. In BALB/c mice, the heightened degranulation of mast cells at the beginning in the infection was associated with an early and transient inflammatory response in the tissues. In contrast, mast cell degranulation in C57BL/6 mice increased only after the first week of infection and persisted elevated throughout the observation period, this was associated with a retarded but prolonged influx of immune cells throughout the same time period.

Thus, it is tempting to speculate that the early augmented granule release in BALB/c mice possibly establishes the permissive conditions that lead to disease progression, which could be due to various mechanisms. Early histamine release favours a Th2 response and additionally causes blood vessels to dilate and increase their permeability. The additional release of preformed TNF- $\alpha$ , together with histamine, contributes as a potent inducer of inflammation, leading to increased endothelial cell adhesion molecule expression, increased vascular permeability and neutrophil chemotaxis.



These inflammatory events lead to a rapid exit of leucocytes from blood vessels into the surrounding tissues, where the parasites can encounter potential host cells. Once inside host cells, *Leishmania* finds a safe niche (24). Thus, the oedema in association with increased vascular permeability, possibly favours the rapid diffusion of intracellular *Leishmania*, since parasitized cells can easily enter the lymphatic vessels and transport the parasite to distant sites. In addition, the oedema and augmented vascular permeability possibly facilitate also the entry of *Leishmania* promastigotes, suspended in interstitial fluid, into lymphatic vessels. In conclusion, the early granule release by mast cells of BALB/c mice possibly provides facilitating conditions for a rapid parasite spread, which correlates with disease progression. Our data show that both events possibly occur, since we found *Leishmania* inside a veiled cell in a lymphatic vessel as well as extracellular parasites in close vicinity ( $< 1 \mu\text{m}$ ) of the endothelium of these vessels. Thus, the heightened degranulation of mast cells induced by *Leishmania* LPG possibly contributes to the more rapid dissemination of the parasite in BALB/c mice. Additional evidence supporting this hypothesis has been shown in mice infected with *L. major* (25,26).

Thus, the effect of *Leishmania* LPG on BMMCs of both mouse strains has opposing regulatory effects: the early and enhanced histamine release of BALB/c mice favours a Th2-response and an uncontrolled inflammation, both of which seem to favour parasite spread, whereas the enhanced production of proinflammatory TNF- $\alpha$  in association with anti-inflammatory IL-10, together with chemokine MIP-1 $\alpha$  of C57BL/6 mice, seem to promote a sustained influx of cells that favour parasite control.

The importance of IL-10 in the control of inflammation has been shown in mice deficient in IL-10 and in patients with mucocutaneous leishmaniasis (27–32). Taken together, these data seem to indicate that IL-10 is a crucial regulator of the inflammatory response in tissues infected with *Leishmania*, which favours disease control. In addition, the enhanced production of MIP-1 $\alpha$  seems beneficial for the control of the infection, since this not only enables macrophage activation but also ensures the arrival of increased number of cells with leishmanicidal capacity. Our data are in accordance with the literature, where it has been reported that C57BL/6 mice infected with *L. major* present high levels of MIP-1 $\alpha$  early in the lesions as well as in draining lymph nodes, which correlates with disease control (33).

Even though after 1 week of infection the number of degranulated mast cells of C57BL/6 mice surpasses those of BALB/c mice, this does not alter the ability of C57BL/6 mice to control the *Leishmania* infection. This seems to indicate, that the increased histamine release and early intense inflammation induced by BALB/c mast cells is more

detrimental during the very early stages of the infection, where it possibly aids parasite spread.

The analysis of the lesions in both mouse strains shows that mast cells in BALB/c degranulate rapidly and promote a rapid but transient inflammatory response in association with increased parasite numbers. On the other hand, C57BL/6 mice show a retarded degranulation of mast cells associated with a sustained influx of immune cells, such as neutrophils, and reduced numbers of parasites. This observation is in accordance with the literature where it has been shown that neutrophils have a critical role in the protective response (34).

The cause of the different response observed in BMMCs from both mouse strains stimulated with *L. mexicana* LPG remains unknown, but the possible consequences that it can have on disease outcome are remarkable. It will be interesting to establish the pathway by which *Leishmania* LPG stimulates TLR2 in both mouse strains and its possible association with mast cell granule release.

## ACKNOWLEDGEMENTS

M. I. Villaseñor Cardoso was a recipient of the CONACyT fellowship for the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. We thank excellent secretarial help of Lucía Álvarez Trejo, as well as technical support of Marco Gudiño Zayas and Daniel Sánchez Almaraz. This work was supported by grants: CONACyT: 47256-M and PAPIIT: IN221806-3.

## REFERENCES

- 1 Sacks D & Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 845–858.
- 2 Galli S, Kalesnikoff J, Grimaldeston M, Piliponski AM, Williams CM & Tsai M. Mast cells as ‘tunable’ effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 749–786.
- 3 Galli S, Nakae S & Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005; **6**: 135–142.
- 4 Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 787–799.
- 5 Maurer M, Lopez-Kostka S, Siebenhaar F, *et al.* Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *FASEB J* 2006; **20**: 2460–2467.
- 6 Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Immunol* 2007; **17**: 115–122.
- 7 Wershil BK, Theodos CM, Galli SJ & Titus RG. Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* infection in the mouse. *J Immunol* 1994; **152**: 4563–4571.
- 8 Becker I, Salaiza N, Aguirre M, *et al.* *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor 2. *Molec Biochem Parasitol* 2003; **130**: 65–74.

- 9 Gilead L, Bibi O & Razin E. Fibroblast induce heparin synthesis in chondroitin sulfate E containing human bone marrow-derived mast cells. *Blood* 1990; **76**: 1188–1195.
- 10 McConville MJ, Bacic A, Mitchell GF & Handman E. Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 1829–1834.
- 11 Gonzalez-Espinoza C, Odom S, Olivera A, et al. Preferential signaling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells. *J Exp Med* 2003; **197**: 1453–1465.
- 12 Ikeda T & Funaba M. Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Immunol Lett* 2003; **88**: 21–26.
- 13 Schneider E, Rolli-Derkinderen R, Arock M & Dy M. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol* 2002; **23**: 255–263.
- 14 Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, Visintin A & Segal DM. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1865–1873.
- 15 Marshall J & Jawdat DM. Mast cells in innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2004; **114**: 21–27.
- 16 Feger F, Varadaradjalou S, Gao Z, Abraham SN & Arock M. The role of mast cells in the host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends Immunol* 2002; **23**: 151–158.
- 17 Bidri M, Vouldoukis I, Mossalayi MD, et al. Evidence for direct interaction between mast cells and *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* 1997; **19**: 475–483.
- 18 Katakura K, Saito S, Hamada A, Matsuda H & Watanabe N. Cutaneous leishmaniasis in mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice. *Infect Immun* 1993; **61**: 2242–2244.
- 19 Parker LC, Whyte MK, Vogel SN, Dower SK & Sabroe I. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 agonists regulate CCR expression in human monocytic cells. *J Immunol* 2002; **172**: 4977–4986.
- 20 de Oliveira M, Lima M, Calheiros A, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: human mast cell line activation induced by logarithmic and stationary promastigote derived-lysates. *Exp Parasitol* 2005; **109**: 72–79.
- 21 Fehrenbach K, Port F, Grochow G, et al. Stimulation of mast cells via FcεRI and TLR2: The type of ligand determines the outcome. *Mol Immunol* 2007; **44**: 2087–2094.
- 22 Qiao H, Andrade M, Lisboa F, Morgan K & Beaven M. FcεRI and toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. *Blood* 2006; **107**: 610–618.
- 23 Zaidi AK, Thangam ER & Ali H. Distinct roles of Ca<sup>2+</sup> mobilization and G protein usage on regulation of toll-like receptor function in human and murine mast cells. *Immunology* 2006; **119**: 412–420.
- 24 Olivier M, Gregory D & Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**: 293–305.
- 25 Anderson CF, Mendez S & Sacks DL. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol* 2005; **174**: 2934–2941.
- 26 Pös Z, Müller K, Novalphak I, et al. Different patterns of the 1-histidine decarboxylase (HDC) gene expression in mice resistant and susceptible to experimental cutaneous leishmaniasis. *Inflamm Res* 2004; **53**: 38–43.
- 27 Viana da Costa A, Huerre M, Delacre M, Auriault C, Correira JM & Verwaerde C. IL-10 leads to higher parasite persistence in a resistant mouse model of *Leishmania major* infection. *Parasitol Int* 2002; **51**: 367–379.
- 28 Gazzinelli R, Wysocka M & Hieny S. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup>T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-γ, and TNF-α. *J Immunol* 1996; **157**: 798–805.
- 29 Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immunol* 2002; **70**: 6734–6740.
- 30 Faria D, Gollob KJ, Barbosa J, et al. Decreased *in situ* expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 2005; **73**: 7853–7859.
- 31 Azulay RD & Azulay DR. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. *Int J Dermatol* 1995; **34**: 303–307.
- 32 Bottrel R, Dutra WO, Martins FA, et al. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immunol* 2001; **69**: 3232–3239.
- 33 Antoniazzi S, Price HP, Kropf P, et al. Chemokine gene expression in Toll-like receptor-competent and deficient mice infected with *Leishmania major*. *Infect Immun* 2004; **72**: 5168–5174.
- 34 McFarlane E, Perez C, Charmoy M, et al. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 2008; **76**: 532–541.

# Author Query Form

---

**Journal: Parasite Immunology**

**Article: pim\_1042.fm**

Dear Author,

During the copy-editing of your paper, the following queries arose. Please respond to these by marking up your proofs with the necessary changes/additions. Please write your answers on the query sheet if there is insufficient space on the page proofs. Please write clearly and follow the conventions shown on the attached corrections sheet. If returning the proof by fax do not write too close to the paper's edge. Please remember that illegible mark-ups may delay publication.

Many thanks for your assistance.

<b>No.</b>	<b>Query</b>	<b>Remarks</b>
<b>1</b>	Author: Please confirm the label parts again (from lower case to caps).	
<b>2</b>	Author: Please confirm the position of Figure 8 in the text.	

# MARKED PROOF

## Please correct and return this set

Please use the proof correction marks shown below for all alterations and corrections. If you wish to return your proof by fax you should ensure that all amendments are written clearly in dark ink and are made well within the page margins.

<i>Instruction to printer</i>	<i>Textual mark</i>	<i>Marginal mark</i>
Leave unchanged	... under matter to remain	Ⓟ
Insert in text the matter indicated in the margin	∧	New matter followed by ∧ or ∧ <sup>Ⓢ</sup>
Delete	/ through single character, rule or underline or ┌───┐ through all characters to be deleted	Ⓞ or Ⓞ <sup>Ⓢ</sup>
Substitute character or substitute part of one or more word(s)	/ through letter or ┌───┐ through characters	new character / or new characters /
Change to italics	— under matter to be changed	↙
Change to capitals	≡ under matter to be changed	≡
Change to small capitals	≡ under matter to be changed	≡
Change to bold type	~ under matter to be changed	~
Change to bold italic	≈ under matter to be changed	≈
Change to lower case	Encircle matter to be changed	≡
Change italic to upright type	(As above)	⊕
Change bold to non-bold type	(As above)	⊖
Insert 'superior' character	/ through character or ∧ where required	Υ or Υ under character e.g. Υ or Υ
Insert 'inferior' character	(As above)	∧ over character e.g. ∧
Insert full stop	(As above)	⊙
Insert comma	(As above)	,
Insert single quotation marks	(As above)	Ƴ or ƴ and/or ƶ or Ʒ
Insert double quotation marks	(As above)	ƶ or Ʒ and/or Ʒ or ƶ
Insert hyphen	(As above)	⊥
Start new paragraph	┌	┌
No new paragraph	┐	┐
Transpose	└┘	└┘
Close up	linking ○ characters	○
Insert or substitute space between characters or words	/ through character or ∧ where required	Υ
Reduce space between characters or words		↑