



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS CÉLULAS NKT EN INFECCIONES POR

Leishmania mexicana

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JAIME ZAMORA CHIMAL

DIRECTORA DE TESIS

DRA. INGEORG BECKER FAUSER

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. ARMANDO PERÉZ TORRES

FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada para mis estudios de doctorado.

Agradezco al proyecto CONACYT 221405 por el financiamiento de este proyecto.

Agradezco al Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, DGAPA-UNAM (PAPIIT IN217515) por el financiamiento de este proyecto.

Agradezco a la Dra. Ingeborg Becker Fauser, por toda la dedicación en mi formación profesional y por haber guiado gran parte de mis pasos en la ciencia.

Agradezco a mi comité por el apotutorial por sus correcciones en la realización de este manuscrito.

Agradezco al Dr. José Sotero Delgado Domínguez por su dedicación en mi formación en el laboratorio de inmunoparasitología.

Agradezco a Arturo Wilkins Rodríguez por sus pláticas científicas que ayudaron en la realización de mi tesis.

Agradezco el apoyo brindado por cada uno de los técnicos del Laboratorio de inmunoparasitología, por su paciencia y esmero en enseñarme cada una de las herramientas disponibles en el laboratorio.

Agradezco a mi familia y amigos por el apoyo brindado.

Agradezco a Omar Agni García Hernández por su apoyo en la edición de figuras.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a todos aquellos que estuvieron a mi lado en mis pasos por el doctorado, gracias por tenerme paciencia y por escucharme, espero haber adquirido un poco de ustedes en este camino.

Contenido

| | |
|--|----|
| Resumen | 1 |
| I.- Introducción | 2 |
| 1.1 Leishmaniasis..... | 2 |
| 1.2 Ciclo de vida..... | 3 |
| 1.3 Respuesta inmune en leishmaniasis..... | 4 |
| 1.3.1. Respuesta inmune innata..... | 4 |
| 1.3.2. Respuesta inmune adaptativa..... | 5 |
| 1.4 Clasificación y Funciones de las células NKT..... | 7 |
| 1.5 α -GalCer como inductor de IFN- γ | 8 |
| 1.6 LPG de <i>Leishmania mexicana</i> | 8 |
| 1.6.1 Composición de LPG..... | 9 |
| 1.6.2 Papel del LPG en interacciones con células de la respuesta inmune..... | 11 |
| 1.7 Activación de las células NKT..... | 11 |
| II. Justificación | 13 |
| III. Hipótesis | 13 |
| IV. Objetivos | 13 |
| 4.1 Objetivo general..... | 13 |
| 4.2 Objetivos específicos | 13 |
| V. Materiales y métodos | 14 |
| VI. Resultados | 21 |
| VII. Discusión | 34 |
| VIII. Conclusiones | 39 |
| IX. Referencias | 40 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| X. Anexo | 50 |
| XI. ARTÍCULOS PUBLICADOS | 51 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Distribución de la leishmaniasis en el mundo..... | 2 |
| Figura 2. Ciclo de vida del parásito <i>Leishmania</i> | 3 |
| Figura 3. Respuesta celular tipo Th1 y Th2 en leishmaniasis..... | 6 |
| Figura 4. Glicoconjugados en la superficie de <i>Leishmania</i> | 10 |
| Figura 5. Modelos de activación de las células NKT..... | 12 |
| Figura 6. Esquema de inmunización..... | 20 |
| Figura 7. Progresión de la lesión en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con <i>L. mexicana</i> | 22 |
| Figura 8. Frecuencia de las células NTK en el linfonodo cervical más cercano al sitio de infección..... | 23 |
| Figura 9. Porcentaje de células NKT productoras de IFN- γ e IL-4 en el linfonodo más cercanos al sitio de infección con <i>L. mexicana</i> | 24 |
| Figura 10. Marcadores de superficie de células dendríticas estimuladas con LPG, α -GalCer y PG por 24 horas..... | 25 |
| Figura 11. Producción de citocinas por células dendríticas estimuladas con LPG, α -GalCer por 24 horas..... | 26 |
| Figura 12. Producción de citocinas por la coincubación de células NKT con células dendríticas que previamente fueron estimuladas con LPG o α -GalCer..... | 28 |
| Figura 13. Producción de IFN- γ por células NKT después de la estimulación de IL-12p70..... | 29 |
| Figura 14. Colocalización de LPG con TLR2..... | 30 |
| Figura 15. Activación de la vía de TLR..... | 32 |

| | |
|--|----|
| Figura 16. Carga parasitaria y análisis de la inflamación en lesiones de ratones BALB/c inoculados con <i>L. mexicana</i> | 33 |
| Figura 17. Producción de IFN- γ por esplenocitos de ratones inmunizados con ASL o ASL + α -GalCer infectados con <i>L. mexicana</i> | 34 |
| Figura 18. Regionalización de células NKT por citometría de flujo..... | 50 |
| Figura 19. Histogramas de expresión de CD86, MHCII, CD40, CD1d and TLR2 en células CD11c+..... | 51 |

Resumen

Las células NKT se han asociado con protección en la infección por *L. donovani*, sin embargo su papel en la infección por *L. mexicana* no ha sido descrito, además no se ha definido la vía de activación que sufren estas células en la leishmaniasis, ni su papel en la modulación de la respuesta inmune adaptativa. En este trabajo se analizó la activación de las células NKT en respuesta al estímulo de LPG (lipofosfoglicano). Adicionalmente, se comparó el número de las células NKT y el perfil de citocinas en el linfonodo regional del sitio de inóculo de *L. mexicana* en ratones BALB/c y C57BL/6. Por último se realizó una inmunización con antígenos del parásito y con α -GalCer (alfa-galactosilceramida) como adyuvante en ratones BALB/c que fueron infectados con *L. mexicana*. Se demostró que LPG de *L. mexicana* activa a las células NKT a través de la vía indirecta, iniciando con la estimulación de las células dendríticas por LPG que se evaluó por la expresión de moléculas como TLR2, MHCII, y CD86, además de la producción de IL-12p70. Esto a su vez provocó la producción de IFN- γ por las células NKT. Los ratones C57BL/6 mostraron mayor activación de las células dendríticas comparado con BALB/c, lo cual se correlacionó con mayor producción de IFN- γ por las células NKT. Los ratones C57BL/6 infectados mostraron mayor porcentaje de células NKT productoras de IFN- γ e IL-4 en el linfonodo regional. La inmunización con antígenos de *L. mexicana* y α -GalCer en ratones BALB/c demostró que la activación de las células NKT aumenta la producción de IFN- γ por los esplenocitos, lo cual se correlaciona con la reducción de la carga parasitaria en la infección. En este trabajo se concluyó que la respuesta de las células NKT hacia el LPG de *L. mexicana* inicia con la activación por la vía indirecta, después de unirse LPG a TLR2 de las células dendríticas. Esta vía de activación induce la producción de IFN- γ por las células NKT, además la magnitud de la activación fue diferente entre las cepas de ratón. Por último la inmunización con α -GalCer demostró que las células NKT ayudaron a reducir la carga parasitaria por el aumento de IFN- γ en la infección.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad provocada por parásitos protozoarios del género *Leishmania*, el cual se transmite por la picadura de moscos hembras del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia* afectando a mamíferos entre ellos a los seres humanos. Las especies del parásito generan diferentes formas clínicas de la enfermedad, algunas causan nódulos y úlceras en la piel (leishmaniasis cutánea), otras afectan las membranas mucosas (leishmaniasis mucocutánea) y otras causan daños a órganos internos (leishmaniasis visceral). Mundialmente se distribuye en zonas tropicales (Figura 1), reportándose entre 700 000 y un millón de casos al año con una mortalidad de 20 000 a 30 000 defunciones (WHO, 2017).

En México la forma clínica más frecuente de la enfermedad es la leishmaniasis cutánea, la cual es causada por *L. mexicana*. Afecta principalmente a los estados de Tabasco, Campeche, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Quintana Roo y Yucatán (Sosa Ávila *et al.*, 2014).

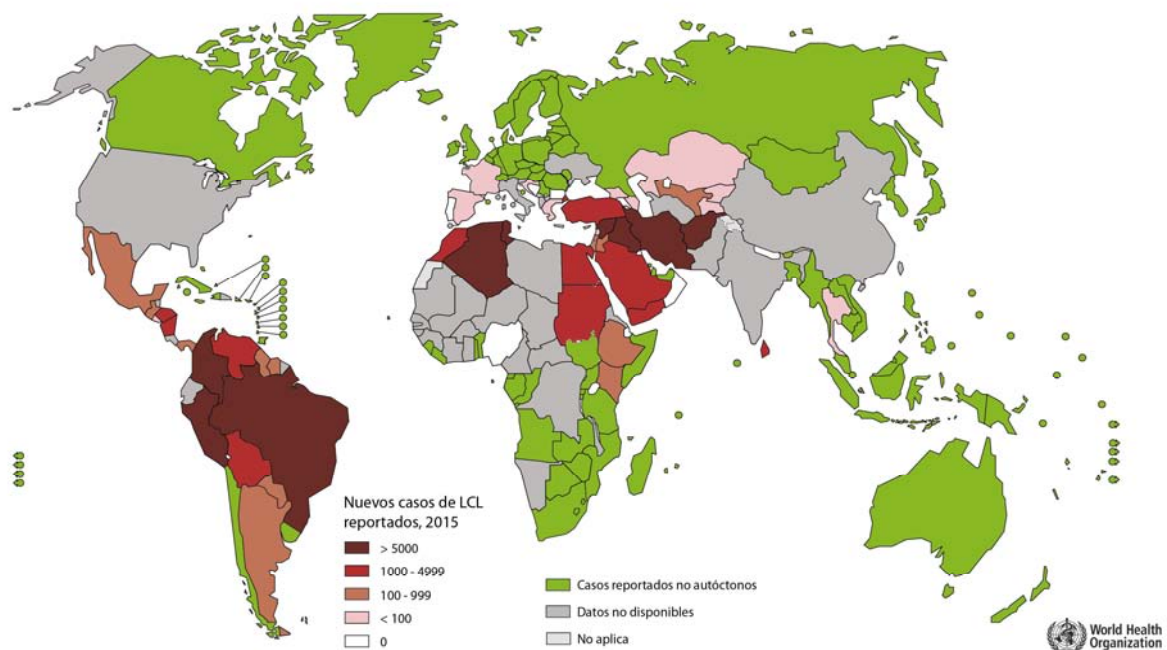


Figura 1. Distribución de la leishmaniasis cutánea en el mundo. El mapa describe las zonas del mundo donde hay leishmaniasis y la frecuencia de casos reportados anualmente (tomado y modificado de WHO, 2017).

1.2. Ciclo de vida de *Leishmania*

El ciclo de vida del parásito inicia cuando un mosquito hembra con infección se alimenta de un mamífero. Al ingerir la sangre de un vaso sanguíneo, el mosquito hembra libera promastigotes (estadio flagelado) en la dermis, donde son internalizados por fagocitos (macrófagos, células dendríticas y neutrófilos). Dentro de las células, *Leishmania* habita en vacuolas parasitóforas donde se desarrolla su estadio no flagelado (amastigotes), en el cual los parásitos comienzan a replicarse hasta que el macrófago muere, liberando a los amastigotes, los cuales nuevamente son fagocitados por células que son atraídas al sitio de la infección. El ciclo de vida se completa cuando un mosquito hembra sin infección se alimenta de un hospedero infectado, ingiriendo amastigotes, los cuales dentro del sistema digestivo del mosquito hembra se diferencian nuevamente a promastigotes (Figura 2) (Kaye, P., & Scott, P., 2011).

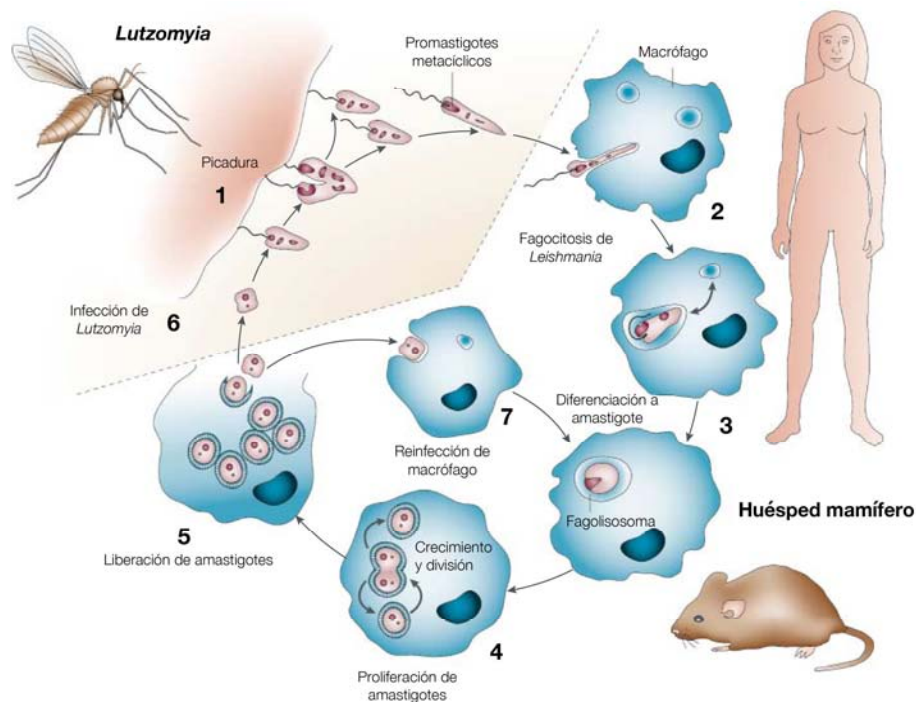


Figura 2. Ciclo de vida del parásito *Leishmania*. El mosquito hembra se alimenta de la piel de un mamífero (1). Fagocitosis del promastigote (2). Diferenciación a amastigote (3). Replicación del parásito en la vacuola parasitófora (4). Liberación de amastigotes (5). Infección del vector (6). Reinfección de células sanas (7) (Tomado y modificado de Sacks & Noben-Trauth 2002).

1.3. Respuesta inmune en leishmaniasis

1.3.1 Respuesta inmune innata

Al entrar en contacto con la dermis, el parásito es reconocido por el sistema del complemento y receptores innatos. El sistema del complemento, mediante el complejo de ataque a membrana, lisa a la mayoría de los parásitos que entran en la piel. Algunos estudios han demostrado que el suero fresco de humano o de ratón elimina al 90% de los promastigotes de fase estacionaria de *L. amazonensis* (Pandey *et al.*, 2015; Noronha *et al.*, 1998).

Los antígenos de *Leishmania* liberados por la lisis de los parásitos, son drenados al ganglio linfático regional por vía linfática. Otros parásitos son opsonizados por la fracción C3b y C3bi promoviendo su fagocitosis a través de los receptores CR1 y CR3 (Iezzi *et al.*, 2006; Ueno and Wilson, 2012). Esta vía de fagocitosis no promueve el estallido oxidativo ni la producción de IL-12, por lo cual el parásito sobrevive en el macrófago y no induce la activación de la respuesta adaptativa. Adicionalmente, el parásito inhibe la capacidad migratoria de las células presentadoras de antígenos a los ganglios regionales. Esto sugiere que la activación de los linfocitos T en el linfonodo es a través de los antígenos drenados por la linfa derivados de la lisis por complemento (Gupta *et al.*, 2013; Hermida *et al.*, 2014).

Dentro de los antígenos que *Leishmania* posee se encuentra el lipofosfoglicano (LPG), un glicolípido que constituye gran parte del glicocálix del parásito en su estadio de promastigote. Esta molécula tiene gran relevancia en el desarrollo de la respuesta inmune contra el parásito, ya que ha sido involucrada en la inhibición de PKC y MAPK (moléculas que desencadenan el estallido oxidativo) en el macrófago (Saha *et al.*, 2010). Sin embargo, también se ha demostrado que funciona como

PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) al activar a TLR2 en células dendríticas (Favila *et al.*, 2015), induciendo la producción de IL-12 y la maduración de estas células por el incremento de CD86 y MHC II en su superficie (Aebischer *et al.*, 2005; Argueta-Donohué *et al.*, 2008). Además también se ha observado que activa a células NK promoviendo la producción de IFN- γ (Becker *et al.*, 2003).

1.3.2. Respuesta inmune adaptativa

El papel en cuanto a la resistencia o susceptibilidad de los linfocitos T y B en leishmaniasis es diferente, mientras la activación de los linfocitos T puede llevar a la resolución de la enfermedad, la producción de anticuerpos por los linfocitos B promueve la opsonización del parásito y la producción de IL-10, favoreciendo la fagocitosis del parásito y la regulación de los linfocitos T contra *Leishmania* (Wanasen *et al.*, 2008). En un estudio se demostró que ratones deficientes en linfocitos B son resistentes a la infección por *L. donovani*, sin embargo cursan con daños en el tejido más exacerbados que los ratones silvestres, lo que sugiere que los linfocitos B tienen un papel importante en la regulación del proceso inflamatorio, aunque favorecen la persistencia de la enfermedad (Smelt *et al.*, 2000).

El desarrollo de la respuesta Th1 y Th2 fue establecido en el modelo murino por la infección con *L. major* en ratones C57BL/6 y BALB/c, respectivamente. En dicho modelo, los ratones C57BL/6 presentan resistencia a la enfermedad, ya que curan la lesión después de 6 a 8 semanas de infección, en esta cepa la resolución de la enfermedad es mediada por linfocitos T CD4 subpoblación Th1 (Figura 3), los cuales producen IFN- γ y TNF- α/β que induce a la iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) en los macrófagos infectados, favoreciendo la eliminación del parásito (Tacchini-Cottier *et al.*, 2012). Por otro lado, los ratones BALB/c no resuelven la infección, ya que sus linfocitos T CD4 se diferencian al tipo Th2 produciendo IL-4 e IL-13, los cuales reducen la producción de citocinas inflamatorias como el IFN- γ e inducen la activación alternativa de los macrófagos, la cual es incapaz de eliminar al parásito (Tacchini-Cottier *et al.*, 2012; Osorio *et al.*, 2012).

Cabe resaltar que los ratones C57BL/6 son incapaces de resolver la infección por *L. mexicana*, sin embargo sus lesiones son menos graves que en los ratones

BALB/c. Esta diferencia se debe a que solamente el 15% de los linfocitos T CD4 productores de IFN- γ , son activados en los ratones infectados con *L. mexicana*, mientras que en la infección con *L. major* se activan casi el 50% (Hsu A & Scott P, 2007). Se ha involucrado a la IL-10 y al receptor Fc γ R como responsables de esta falta de activación. En un estudio se demostró que ratones C57BL/6 deficientes para IL-10 y Fc γ R infectados con *L. mexicana* son resistentes a la infección y presentan mayor número de linfocitos T CD4 productores de IFN- γ (Buxbaum & Scott 2005).

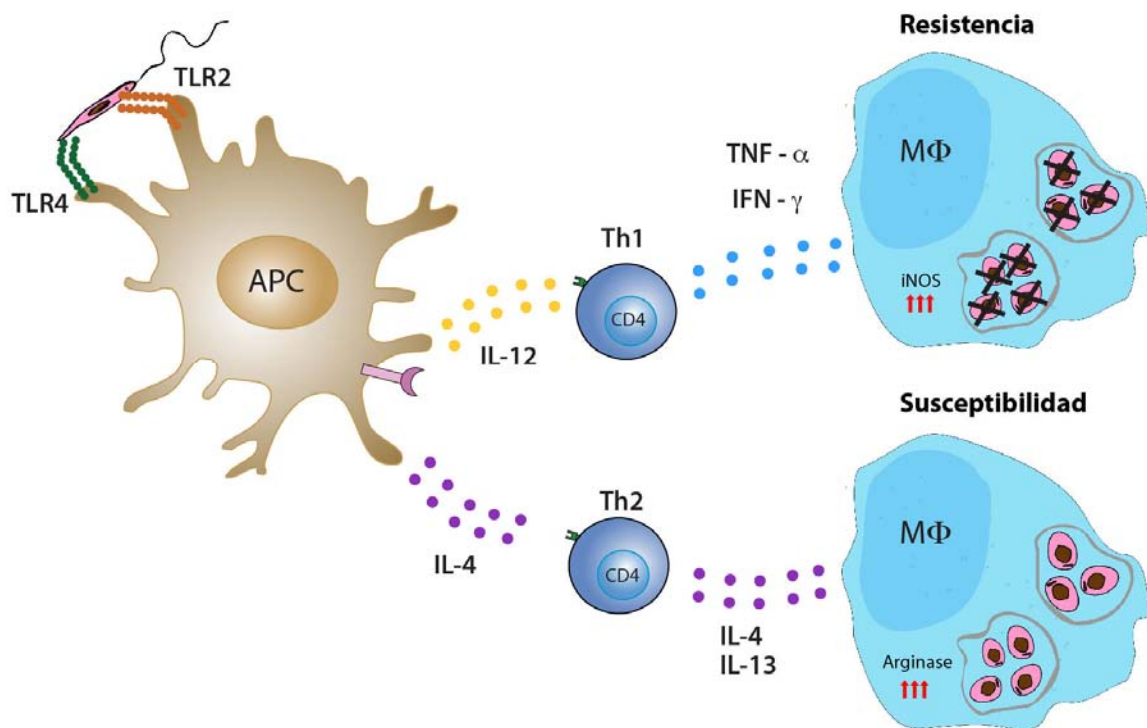


Figura 3. Respuesta celular tipo Th1 y Th2 en leishmaniasis. Respuesta celular tipo Th1: las células presentadoras de antígenos que estuvieron en contacto con el parásito se activan y producen citocinas como IL-12 y promueven que los linfocitos TCD4 den lugar a células tipo Th1, los cuales producen citocinas inflamatorias como IFN- γ que activan la iNOS en los macrófagos infectados y eliminan el parásito. Respuesta celular tipo Th2: las células presentadoras de antígenos al estar en contacto con *Leishmania* producen citocinas como IL-4 o IL-13, induciendo la diferenciación de los linfocitos T CD4 a células Th2, los cuales producen citocinas anti-inflamatorias que activan de manera alternativa a los macrófagos favoreciendo la infección.

1.4. Clasificación y funciones de las células NKT

Las células NKT son una subpoblación de linfocitos T que reconocen antígenos glicolípidos (Borg *et al.*, 2007). Originalmente fueron descritas como células que expresan CD3 y marcadores de células NK como el marcador NK1.1 (CD161), Ly49 y miembros de la familia NKG2 (Godfrey *et al.*, 2000). Actualmente, se dividen en dos poblaciones de acuerdo al grado de polimorfismo de su TCR y de su capacidad de poder unirse al glicolípido alfa-galactosilceramida (α -GalCer) aislado de la esponja marina *Agelas mauritanus* (aunque pueden unirse a otros glicolípidos). Las células NKT de tipo 1 o de cadena invariable (NKTi) pueden reconocer al glicolípido α -GalCer a través de CD1d, poseen un rearreglo poco polimórfico de la cadena alfa ($V\alpha 14-J\alpha 18$ y $V\alpha 24-J\alpha 18$, en ratones y humanos respectivamente) y una cadena beta que presenta ciertas variaciones ($V\beta 8.2$, $V\beta 7$ y $V\beta 2$, $V\beta 11$, en ratones y humanos, respectivamente). Las células NKT de tipo 2, no reconocen a α -GalCer, sin embargo, si reconocen sulfátidos a través de diferentes miembros de la familia CD1 (Bendelac *et al.*, 2007; Dasgupta, S., & Kumar, V. 2016).

La frecuencia de las células NKT es del 0.1 al 0.5 % de los leucocitos de sangre periférica. Son rápidas productoras de citocinas como IL-4 e IFN- γ ya que tienen RNA mensajero preformado para su rápida activación, además presentan actividad citotóxica contra células infectadas (Godfrey *et al.*, 2000; Coquet *et al.*, 2008; Metelitsa *et al.*, 2001). Estas funciones efectoras están determinadas por la expresión de los correceptores CD4 y CD8. Las células NKT $CD8^+$ o $CD4^-CD8^-$ tienen mayor capacidad citotóxica, mientras que las células NKT $CD4^+$ mayor capacidad de producción de citocinas (Ho *et al.*, 2004). Su papel en las enfermedades infecciosas es muy importante y se ha observado que pueden ser activadas a través de CD1d por glicolípidos de bacterias y parásitos protozoarios, además se han involucrado en el inicio de la respuesta inmune adaptativa ya que al ser rápidas productoras de citocinas participan en la diferenciación de los linfocitos T $CD4^+$, por lo que se han catalogado como un puente entre la inmunidad innata y adaptativa (Godfrey *et al.*, 2000).

1.5. α -GalCer como inductor de IFN- γ

El α -GalCer es el agonista de las células NKT más utilizado experimentalmente; activa a las células NKT a través de CD1d expresado en células presentadoras de antígenos (Tsuji, 2006). Algunos estudios en ratón han demostrado que α -GalCer inoculado por vía intravenosa, induce la activación del sistema inmune de manera sistémica, observándose IL-4 e IFN- γ en el suero, el pico máximo de producción de IL-4 se observa 3 horas después del inóculo, mientras que el pico de IFN- γ a las 12 horas. Posteriormente, la IL-4 baja a las 12 horas del estímulo mientras que el IFN- γ se mantiene hasta las 48 horas (Habu *et al.*, 2004). Debido a que la producción de IFN- γ es más sostenida y promueven las respuestas citotóxicas por los linfocitos T CD8, se ha propuesto la utilización de este glicolípido como adyuvante en enfermedades infecciosas y tumorales (Taraban *et al.*, 2008; Terabe & Berzofsky 2008).

En un estudio se demostró que la inoculación de células dendríticas pulsadas con α -GalCer en pacientes con cáncer hepático redujo significativamente el tumor. Esto se correlacionó con aumento de la actividad citotóxica de las células NK y con la presencia de IFN- γ e IL-12 en suero (Schneiders *et al.*, 2011; Nieda *et al.*, 2004). El uso de α -GalCer también podría funcionar como tratamiento en leishmaniasis, ya que se ha observado que la producción de IFN- γ y TNF- α es benéfica para reducir la carga parasitaria por la activación de la iNOS en los macrófagos infectados (Sisto *et al.*, 2001).

1.6. Lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania*

El LPG es un glicoconjugado que se encuentra en la membrana celular de los promastigotes, junto con los glicoinositol fosfolípidos (GIPL) y GP63 (glicoproteína de 63 kDa), forman una barrera altamente hidrofóbica que llega a medir hasta 15 nm. Es uno de los componentes más abundantes del glicocálix con 5×10^6 copias/célula (Turco SJ & Descoteaux A 1992). La composición de LPG es diferente en cada especie del parásito, sin embargo comparte una estructura altamente

conservada, la molécula de anclaje fosfatidilinositol (Figura 4) (McConville *et al.* 1993). Por su abundancia, su complejidad y su distribución, se cree que LPG tiene un papel importante en la virulencia de *Leishmania* hacia su hospedero mamífero (Forestier *et al.*, 2015).

1.6.1 Composición de LPG

El LPG de *Leishmania* es una macromolécula altamente compleja, se compone de cuatro dominios: el de anclaje (GPI), un centro de glicanos, una cadena lineal de fosfoglicanos y un capuchón terminal de oligosacáridos (Figura 4). El dominio de anclaje GPI consiste de un alquil fosfatidilinositol que tiene una cadena alifática C₂₄₋₂₆ saturada. El centro de glicanos es un heptasacárido que tiene dos galactopiranosidos, un galactofuranósido (Gal_f), dos manósidos y un residuo de glucosamina unido al inositol. El centro de glicanos está unido a una cadena de fosfoglicanos que consiste de unidades de 15-40 fosfodisacaridos (Gal β 1,4 Man α 1 –PO₄). Finalmente, LPG termina en di, tri o tetrasacáridos constituidos de galactosa y manosa, ensamblados como Man α 1,2Man α 1 o Gal β 1,4(Man α 1,2) Man α 1 según la especie de *Leishmania* (Ferguson, 1999).

La región de anclaje, el centro de glicanos y los motivos lineales de fosfoglicanos son idénticos en todas las especies de *Leishmania*. Sin embargo, el capuchón terminal y el dominio de fosfoglicanos presentan modificaciones a lo largo del desarrollo del parásito. El capuchón terminal modifica su composición de oligosacáridos, mientras que las regiones de fosfoglicanos varían en longitud, de modo que los parásitos metacíclicos tienen una cadena lineal de fosfoglicanos más grande que los procíclicos (Sacks *et al.*, 1995). Se ha demostrado que los promastigotes metacíclicos son más infectivos que los promastigotes procíclicos siendo las modificaciones de LPG importantes en su mayor virulencia (Felizardo *et al.*, 2007).

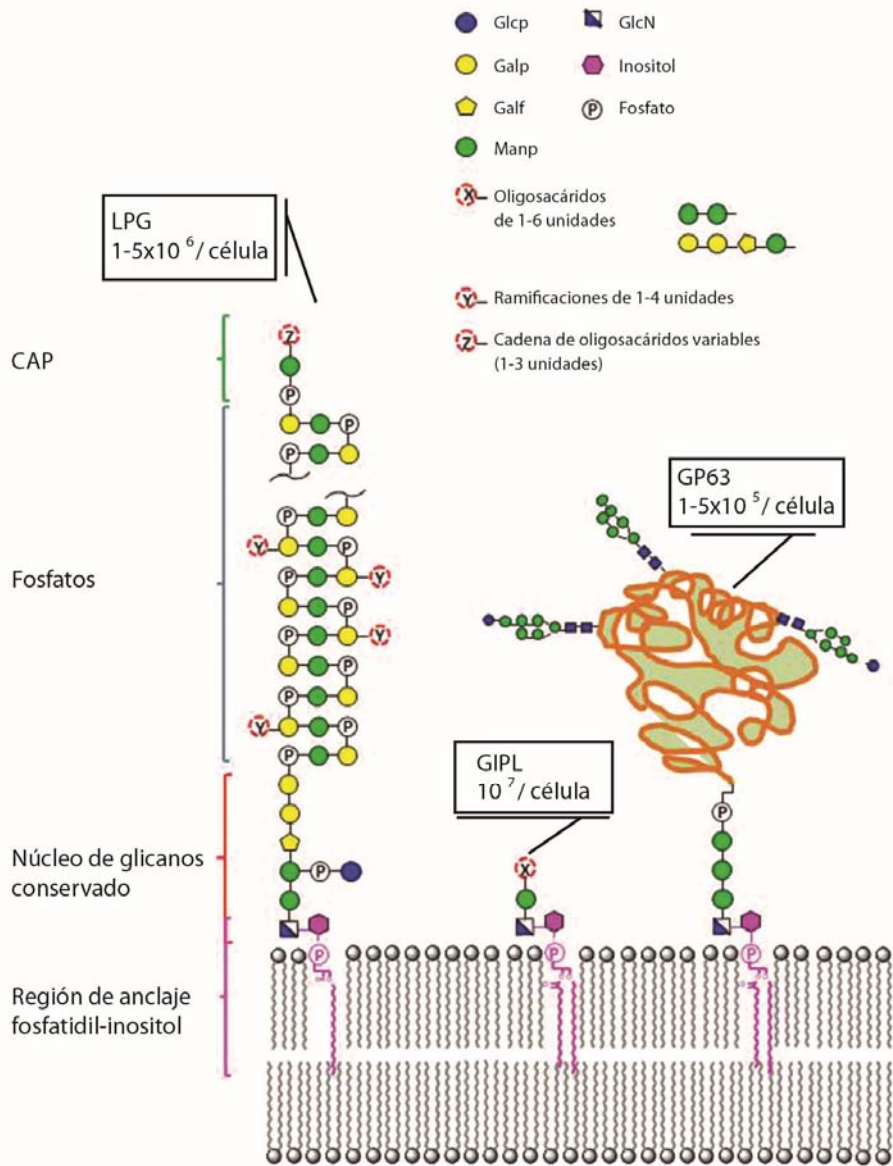


Figura 4. Glicoconjugados en la superficie de *Leishmania*. Se muestra un esquema donde se representan la ubicación en la membrana celular del parásito de distintos glicoconjugados con su abundancia de copias por célula. LPG: Lipofosfoglicanos, GIPL: glicoinositol fosfolípidos, CAP: Capuchón terminal y proteínas ancladas por fosfatidilinositol como GP63 (Tomado y modificado de Cabezas *et al.*, 2015).

1.6.2 Papel del LPG en las interacciones con células de la respuesta inmune

Se ha observado que LPG interacciona con los macrófagos, células NK y células dendríticas de diferente manera. En macrófagos, se sabe que LPG activa a TLR2 y TLR4 induciendo la fosforilación de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) y de la cinasa activada por mitógeno p38 MAP, lo cual desencadena la producción de citocinas proinflamatorias (Rojas-Bernabé *et al.*, 2014). Sin embargo, dentro de estas células en la vacuola parasitófora, se ha demostrado que los amastigotes producen LPG en su bolsa flagelar que inhibe el ensamblaje de la NADPH oxidasa y previene el reclutamiento de ATPasas ayudando a su supervivencia (Forestier *et al.*, 2015).

En las células NK se une a TLR2 e induce la translocación de NF κ B al núcleo y la transcripción de genes que codifican para citocinas inflamatorias. Algunos estudios han demostrado que la región de anclaje así como el tamaño del dominio de fosfoglicanos, están involucrados con la magnitud de la activación de la vía TLR2. Además, los polimorfismos de proteínas involucradas en la síntesis de LPG tienen un gran impacto en la estimulación de esta vía (Becker *et al.*, 2003; Rojas-Bernabé *et al.*, 2014).

1.7 Activación de las células NKT

Clásicamente las células NKT se activan por vía directa mediante el reconocimiento de glicolípidos presentados por CD1d a través de su TCR, lo cual induce la producción de IL-4 e IFN- γ . Adicionalmente, en la literatura se han reportado activaciones de las células NKT sin participación de CD1d. Esto ocurre de manera indirecta por citocinas proinflamatorias como IL-12 e IL-18 que se unen a sus receptores en las células NKT, induciendo la producción de IFN- γ . En esta vía de activación, es necesaria la presencia de PAMPs que activen a las células presentadoras de antígenos para que sean la fuente de IL-12 e IL-18 (Figura 5) (Bendelac *et al.*, 2007; Kain *et al.*, 2014; Leite-De-Moraes *et al.*, 2010).

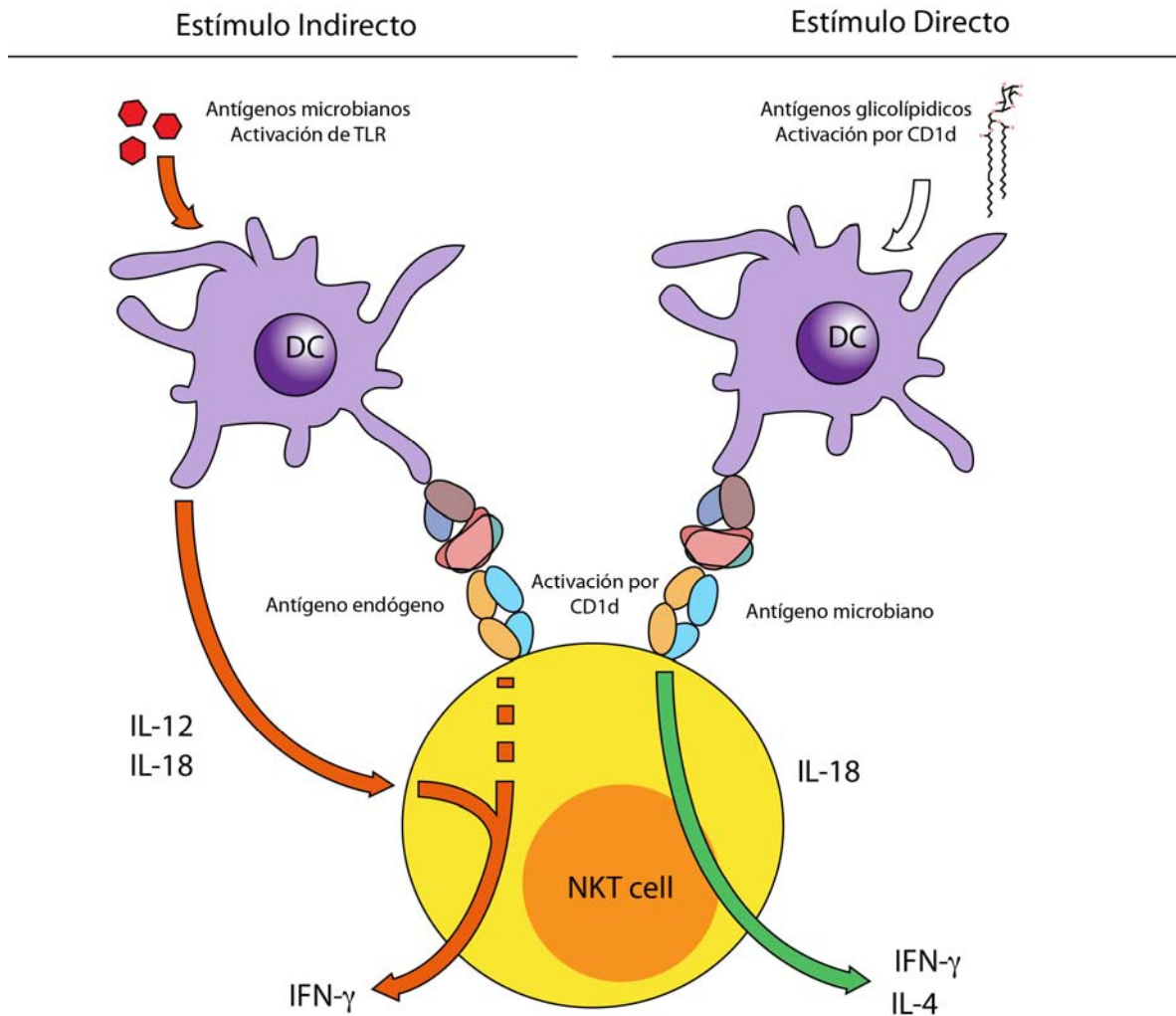


Figura 5. Modelos de activación de las células NKT. Se muestra la vía directa e indirecta de activación de células NKT; la vía indirecta que depende de la estimulación a través de TLRs hacia las células dendríticas, las cuales liberan citocinas que inducen la producción de IFN- γ , mientras que el estímulo directo es mediado por CD1d que presenta antígenos glicolipídicos induciendo la liberación de IFN- γ e IL-4 (Tomado y modificado de Zajonc & Girardi 2015).

II. Justificación

Las células NKT han sido definidas como un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Se ha observado que son células que reconocen antígenos glicolipídicos y producen citocinas que ayudan a la diferenciación de las células T en células productoras de citocinas inflamatorias o anti-inflamatorias. El papel de estas células en la infección por *L. mexicana* no ha sido estudiado, determinar su papel en la infección podría ayudar a entender los procesos de diferenciación de los linfocitos T. Su manipulación mediante el estímulo de α -GalCer como adyuvante, podría mejorar el diseño de vacunas e inmunoterapias en la leishmaniasis cutánea causada por *L. mexicana*.

III. Hipótesis:

La activación de las células NKT se asocia al control de la infección por *L. mexicana*, por lo cual las células NKT de los ratones C57BL/6 producen más IFN- γ que las células NKT de los ratones BALB/c.

IV. Objetivos:

4.1. Objetivo general

Analizar la frecuencia de las células NKT así como su producción de IL-4 e IFN- γ en la infección por *L. mexicana* y determinar si son activadas por células dendríticas estimuladas con LPG de *L. mexicana*.

4.2. Objetivos específicos:

1.- Analizar la progresión de la infección de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*.

- 2.- Analizar en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana* la frecuencia de las células NKT en el ganglio linfático más cercano al sitio de infección.
- 3.-Analizar en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana* la producción de IFN- γ e IL-4 por las células NKT del ganglio cervical más cercano al sitio de infección.
- 5.- Diferenciar células dendríticas de la médula ósea de ratón.
- 6.-Analizar el efecto de maduración de células dendríticas por el estímulo de LPG mediante la cuantificación de CD40, CD86, MHC II, CD1d y TLR-2.
- 7.- Analizar la producción de IL-12p70 y TNF- α por células dendríticas estimuladas con LPG de *L. mexicana*.
- 8.- Analizar la producción de IL-4 e IFN- γ por células NKT incubadas con células dendríticas previamente estimuladas con LPG de *L. mexicana*.
- 9.- Analizar la colocalización de LPG con CD1d o TLR2 en células dendríticas.
- 10.- Analizar la fosforilación de pI κ B α en células dendríticas estimuladas con LPG de *L. mexicana*.
- 11.- Analizar el papel de α -GalCer como adyuvante en una inmunización con antígenos del parásito en la infección de ratones BALB/c por *L. mexicana*.

V. Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratones machos BALB/c Y C57BL/6 de 8-10 semanas de edad, suministrados por el bioterio de la Facultad de Medicina Experimental, UNAM. Los ratones fueron manejados siguiendo la Guía Nacional de Ética para la Salud Animal NOM-062-ZOO-1999 y la Guía para el Cuidado Animal, recomendada por la Facultad de Medicina, UNAM. Los animales fueron libres de patógenos en cajas de micro-aisladores y recibieron agua y comida *ad libitum*.

Infecciones con L. mexicana

Las distintas infecciones se realizaron con promastigotes crecidos en medio 199 (Invitrogen Cat. 12350039) suplementado con 10% de SFB a 28°C. Los parásitos utilizados se obtuvieron de la fase estacionaria de crecimiento, en el día 5 de cultivo.

-Para determinar la frecuencia de las de células NKT y su producción de citocinas, se infectaron ratones BALB/c y C57BL/6 de manera subcutánea con 1×10^5 parásitos en 5 μ L de solución salina en la dermis del lóbulo de la oreja.

-Para los ensayos de la inmunización con α -GalCer + antígeno soluble de *L. mexicana* (ASL), se infectaron ratones BALB/c con 1×10^6 de parásitos en 5 μ L de solución salina en la dermis del cojinete plantar.

Monitoreo del tamaño de la lesión

-Para el estudio comparativo del tamaño de las lesiones en los ratones BALB/c y C57BL/6, se cuantificó el grosor de la lesión utilizando un vernier una vez por semana hasta la semana 8 de infección.

-Para el estudio del tamaño de las lesiones en la inmunización con α -GalCer + ASL, se cuantificó el grosor del cojinete plantar utilizando un vernier una vez por semana hasta la semana 6 de infección.

Cuantificación de la carga parasitaria por dilución limitante

La carga parasitaria fue determinada usando el ensayo de dilución limitante (Titus *et al.*, 1985). Brevemente, las orejas o cojinetes plantares (dependiendo del ensayo) fueron removidos de manera aséptica de los ratones infectados. Después, los tejidos fueron pesados en una balanza analítica y homogenizados por maceración. Posteriormente se diluyeron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB inactivado por calor (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 100 U/mL

de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina. Se realizaron diluciones seriadas de las muestras en placas de cultivo de 96 pozos, las lesiones de oreja fueron en medio bifásico agar sangre (Novy-Nicolle-McNeal), mientras que las lesiones del cojinete plantar fueron en medio RPMI. En ambos casos se incubaron a 26°C durante 1 semana. El cálculo de la carga parasitaria se realizó por la fórmula descrita por Titus (Titus *et al.*, 1985), en la cual se determina el último pozo donde se observaron parásitos para realizar los cálculos de la carga parasitaria y se toman en razón del peso de la lesión.

Aislamiento de células NKT del ganglio linfático

El ganglio más cercano al sitio del inóculo (ganglio linfático cervical) fue removido bajo condiciones de esterilidad y puesto en placas de Petri de plástico conteniendo PBS frío. El tejido fue macerado en mallas de nylon de 100 µm (BD Falcon) y la suspensión celular fue centrifugada a 800 × g por 10 min a 4 °C. La suspensión celular se resuspendió en RPMI con 10% de SFB. Por último, las células vivas se cuantificaron en una cámara de Neubauer y el colorante vital azul de tripano.

Purificación del lipofosfoglicano

El LPG fue purificado de promastigotes de *L. mexicana* crecidos en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB inactivado, a 26°C. Los parásitos fueron cosechados y lavados en el día 5, los cuales correspondieron a la fase estacionaria. El LPG fue purificado de 10¹⁰ promastigotes como describió McConville con algunas modificaciones (McConville *et al.*, 1987). En resumen, los parásitos fueron centrifugados a 3200 × g, el sobrenadante fue removido y el sedimento fue extraído con cloroformo/metanol/agua (1:2:0.5 v/v) por 2 h a temperatura ambiente. El material insoluble fue usado para la extracción de LPG con 9% de 1-butanol en agua (2 × 50 mL) y los sobrenadantes fueron secados al vacío. El LPG fue purificado de esta fase estacionaria por cromatografía de octil-sefariosas en HPLC usando un gradiente de 1 propanol (5-60%) en 0.1 M de acetato de amonio. La preparación fue negativa para la presencia de endotoxina usando la prueba de *Limulus sp.*

(Amebocyte assay, E-Toxate Kit; Sigma). Se utilizó polimixina B (5 g/mL) para confirmar la ausencia de contaminantes de LPS. Una alícuota fue analizada por electroforesis (SDS-PAGE) para comprobar si existían contaminantes proteicos empleando tinción de plata, con resultado de que no se encontraron proteínas.

Enriquecimiento de células NKT de bazo.

Se removieron los bazos bajo condiciones de esterilidad y se colocaron en placas de petri de plástico conteniendo PBS frío. El tejido fue macerado en mallas de nylon de 100 μ m (BD Falcon). La suspensión celular fue centrifugada a 800 g x 10 min. Las células fueron separadas por gradiente de Ficoll–Hypaque (Sigma) y las células mononucleares fueron enriquecidas para células T mediante el Pan T-cell isolation kit (Macs, Myltenyi). Se corroboró que las células NKT enriquecidas no produjeran citocinas por el estímulo de α -GalCer, en ausencia de células presentadoras de antígenos.

Obtención de células dendríticas

Las células dendríticas se diferenciaron de médula ósea, para esto se retiró la médula ósea del fémur y la tibia de ratones BALB/c y C57BL/6 mediante lavados con PBS. Las células aisladas fueron colocadas en placas bacteriológicas (Falcon) de 100 mm a una concentración de 2×10^6 células de la médula por 10 mL de medio RPMI-1640 con 10% de SFB inactivado por calor (probado para endotoxina), 2 mM 1-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin, 50 μ g de 2-mercaptoetanol (Gibco Invitrogen Corporation, Calsbad CA, USA), 25 mM de amortiguador HEPES y 24 mM de NaHCO₃ (Sigma). El medio completo fue suplementado con 10% de GM-CSF contenido en el sobrenadante de la línea células X-63 transfectada con el gen murino GM-CSF, que es equivalente a 200 U/mL de GM-CSF (Zal *et al.*, 1994). La línea X-63 fue donada por la Dra. Brigitta Stockinger (Medical Research Council, MillHill, London, UK). En el día 3 de cultivo, se añadieron 10 mL de medio de cultivo fresco conteniendo GM-CSF y en el día 6 se reemplazaron 10 mL de medio de cultivo fresco conteniendo GM-CSF. En el día 8, las células no adherentes fueron lavadas, centrifugadas y suspendidas en medio

RPMI con 10% de SFB. La pureza del cultivo fue cuantificada en cada lote del sobrenadante de la línea de células X-63 por citometría de flujo, observándose que las células fueron 85% CD11c+.

Cocultivo de células dendríticas con células NKT y cuantificación de citocinas.

Se pulsaron 1.5×10^5 células dendríticas en placas de 96 pozos con 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPG o 10 $\mu\text{g/mL}$ de peptidoglicano por 24 horas. Posteriormente se agregaron 1.5×10^6 células NKT de bazo, enriquecidas, por 48 horas. Se cuantificó mediante ELISA TNF- α e IL-12p70 en el sobrenadante de las células dendríticas y posteriormente IFN- γ e IL-4 en el sobrenadante de la coincubación de células dendríticas con células NKT enriquecidas de bazo.

Citometría de flujo

Las células dendríticas fueron bloqueadas con anti-CD16/32 (eBioscience # Cat. 14-0161-85) para evitar pegado inespecífico. Se marcaron con anticuerpos anti-CD11c en PE, anti-CD1d en FITC, anti-TLR-2 en Alexa fluor 647, anti-CD86 en PE-Cy7, anti-CD40 en APC (BD # Cat. 557401, BioLegend # Cat. 123508, BioLegend # Cat. 121810 # Cat., BioLegend # Cat.105013 y BioLegend # Cat.124611), para su posterior lectura en el citómetro de flujo FACS CANTO II BD y analizados con el software DIVA. Las células del ganglio cervical se incubaron a 37°C con monensina por 4 horas para evitar el transporte de proteínas, posteriormente se bloquearon con anti-CD16/32 y se marcaron las NKT con el dímero CD1d:Ig (CD1d unido a una IgG), acoplado con α -GalCer marcado con secundario en PE como se describe en el protocolo del proveedor (BD™ DimerX, 557599). Después, las células NKT fueron marcadas intracelularmente con anti-IFN- γ FITC ó anti-IL-4 FITC utilizando citofixcitoperm BD para la fijación y Permwash de BD para la permeabilización. Las muestras fueron analizadas en el FACS CANTO II BD y analizadas con el software DIVA.

Colocalización de LPG con TLR-2 en células dendríticas derivadas de médula ósea

Las células pulsadas con LPG por 3 horas se bloquearon con anti-CD16/32 de ratón (eBioscience # Cat. 14-0161-85) a concentración 1:10 por 30 minutos a 4°C. Se lavaron dos veces y se marcaron con anti-TLR2 APC y anti-LPG en dilución 1:50 por 30 minutos a 4°C. Se realizaron dos lavados con PBS y se añadió anti-IgG de ratón FITC. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% por 30 minutos a 4°C para su posterior análisis en un microscopio confocal LEIKA.

Western blot

Para analizar si la activación de células dendríticas por LPG estimula la vía de TLR2, se realizó una cinética del análisis de la fosforilación de I κ B α . El extracto total de proteína se obtuvo a partir de 5 x 10⁵ células dendríticas de ratones BALB/c y C57BL/6, que se habían incubado con 10 μ g/mL de LPG o 10 μ g/mL de PG (péptidoglicano, 77140 Fluka) como control positivo, durante 5, 15, 30, 60, 90 y 120 min. Las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron en 50 μ L de amortiguador RIPA durante 30 min. Los extractos celulares se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min a 4°C y se recogieron los sobrenadantes. Los extractos de proteínas totales se cuantificaron con DC Protein Assay Reagents Package (Bio-Rad, 500-0116). Para el Western-blot, se analizaron 10 μ g de proteína total mediante SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10%. Las proteínas se transfirieron a membranas Immobilon-P utilizando un aparato de electrotransferencia semiseca. Las membranas se bloquearon con solución salina-Tween 20 (TBST: Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, 0.15 M de NaCl y 0,05% de Tween 20) con 5% de amortiguador Tris al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó con anti-pI κ B α (Cell signaling, # de cat. 9246) diluido 1:1000 en BSA 1% durante la noche con agitación constante a 4°C. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de ratón-peroxidasa (Cell signaling, # de cat. 7076) diluido 1:2000 en 5% de leche desnatada en polvo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. El revelado se llevó a cabo utilizando SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), la luz emitida se detectó en una película de rayos X. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBST durante

la noche. Se bloquearon con leche en polvo sin grasa al 5% y se incubaron con anti-actina en cabra (SCBT # de cat. sc-1616) diluida 1:1000 en BSA 1% durante 3 horas a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron e incubaron durante 1 hora con anti IgG de cabra en bovino-peroxidasa (SCBT # de cat. sc-2350) diluido 1:10 000 en 5% de leche en polvo sin grasa.

Obtención de Ag soluble de L. mexicana (ASL)

El ASL se obtuvo a partir de paquetes celulares de promastigotes de fase estacionaria, que fueron sometidos a cuatro ciclos de congelación a -70°C por 10 minutos y sonicación por 10 minutos a 4°C . Por microscopia de luz se corroboró que todos los parásitos estuvieran lisados.

Inmunización de ratones BALB/c con α -GalCer como adyuvante

Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal con jeringas de insulina conteniendo $2\ \mu\text{g}$ de α -GalCer como adyuvante y $50\ \mu\text{g}$ de ASL o solamente con $50\ \mu\text{g}$ de ASL en un volumen de $50\ \mu\text{L}$. Posteriormente, a los 7 días los ratones se inocularon con *L. mexicana* (Figura 6).

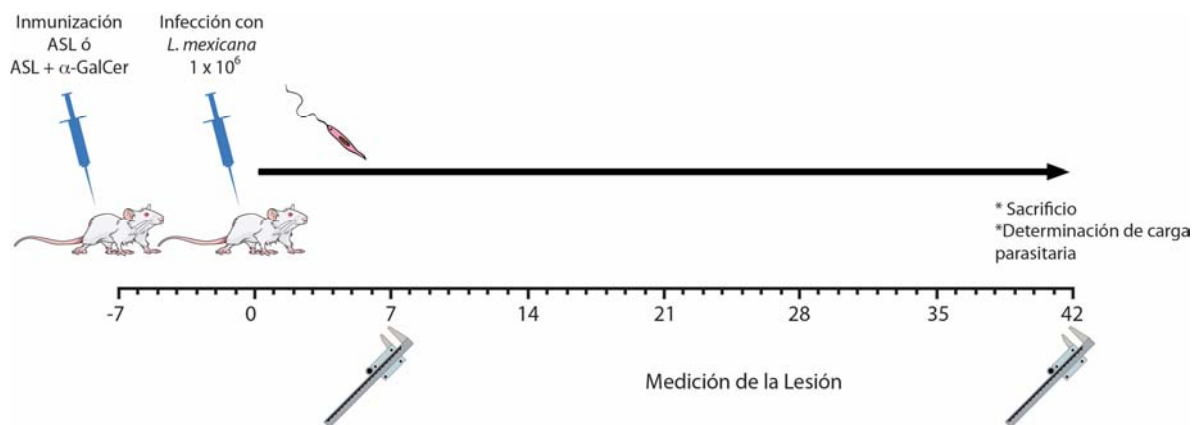


Figura 6. Esquema de inmunización. 7 días después de la inmunización, los ratones fueron inoculados con un millón de promastigotes de *L. mexicana* en el cojinete plantar, posteriormente el tamaño de la lesión se cuantificó con un vernier

una vez cada semana hasta el día 42 y la determinación de la carga parasitaria fue realizada por el método de dilución limitante descrito en el texto.

Cuantificación de citocinas

Para poder determinar si la inmunización con α -GalCer como adyuvante modificaba el patrón de citocinas producidas por células inmunes como los linfocitos T, 1×10^6 células mononucleares del bazo (esplenocitos) provenientes de cada uno de los ratones inmunizados e infectados con *L. mexicana* (las células mononucleares del bazo se aislaron como se describió previamente), se cultivaron por 7 días en medio RPMI con 10% de SFB inactivado por calor en placas de 96 pozos. Como control negativo se emplearon esplenocitos de ratones infectados sin inmunizar y esplenocitos de ratón sano. Posteriormente se colectó el sobrenadante y se cuantificó la presencia de IFN- γ e IL-4 por ELISA.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados utilizando la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo, utilizando el programa *Prism GraphPad* versión 6 para Windows.

VI. Resultados

Progresión de la infección en el lóbulo de la oreja de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*

Se comparó la progresión de la lesión en el lóbulo de la oreja en dos cepas de ratones con distinta susceptibilidad a la infección por *L. mexicana*. Se observó que desde la sexta semana de infección, la cepa BALB/c mostró mayor inflamación que la cepa C57BL/6 ($p \leq 0.05$) (Figura 7A). Cabe resaltar que la cepa C57BL/6 no fue

capaz de controlar la inflamación, aunque siempre se mantuvo por debajo de la observada en la cepa BALB/c.

En cuanto a la progresión de la infección se observó que la cepa BALB/c tuvo 6.2 veces más carga parasitaria que la cepa C57BL/6, ya que mientras se encontraron 1.41×10^6 parásitos/mg de tejido en la cepa BALB/c, solo se encontraron 224×10^3 parásitos/mg de tejido en los ratones C57BL/6 (Figura 7B). Observándose de esta forma mayor control de la progresión de la enfermedad en la cepa C57BL/6.

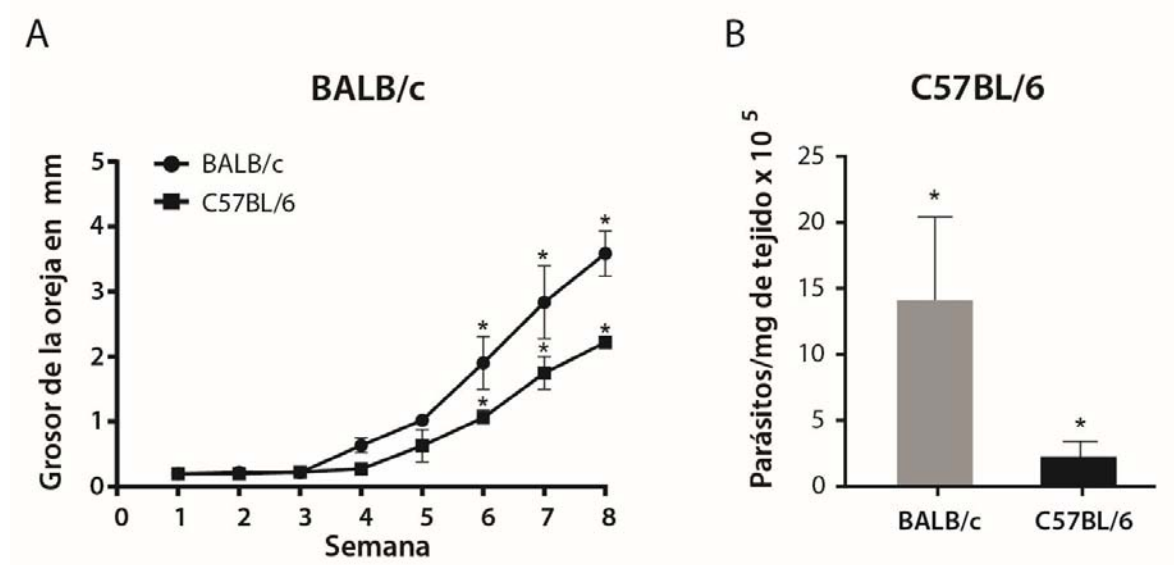


Figura 7. Progresión de la lesión en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*. La magnitud de la infección fue cuantificada mediante la medida de la hinchazón de la lesión en el lóbulo de la oreja infectada (A) y por la cuantificación de la carga parasitaria (B) en ambas cepas de ratón a lo largo de 8 semanas de infección. En las gráficas se muestra la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo.

Modulación del porcentaje de células NKT en el ganglio cervical más cercano al sitio de inóculo con *L. mexicana* de ratones BALB/c y C57BL/6

Se analizó si la frecuencia de las células NKT varía en respuesta a la infección con *L. mexicana*. Para esto, se infectaron ratones BALB/c y C57BL/6 en la dermis del

lóbulo de la oreja y posteriormente en los días 1, 3, 5, y 7 se cuantificó el porcentaje de células NKT en el ganglio cervical más cercano al sitio de inóculo.

Se observaron diferencias en cuanto a la frecuencia de células NKT en días específicos. En la cepa BALB/c, las células NKT incrementaron 4.5 veces en el día 3 de infección (3.2%) con respecto a los ratones control inoculados solo con solución salina (0.7%) ($p < 0.05$) (Figura 8A). En la cepa C57BL/6, las células NKT incrementaron 2.3 veces en el día 5 de infección (1.1%) y 1.6 veces en el día 7 (0.7%) con respecto a los ratones controles tratados solo con solución salina (0.46% y 0.43%, respectivamente) ($p < 0.05$) (Figura 8B). Estos resultados indican que la cantidad de células NKT es modulada por la infección con *L. mexicana*, siendo mayor en ratones BALB/c y sostenida por más tiempo en la cepa C57BL/6 ($p < 0.05$).

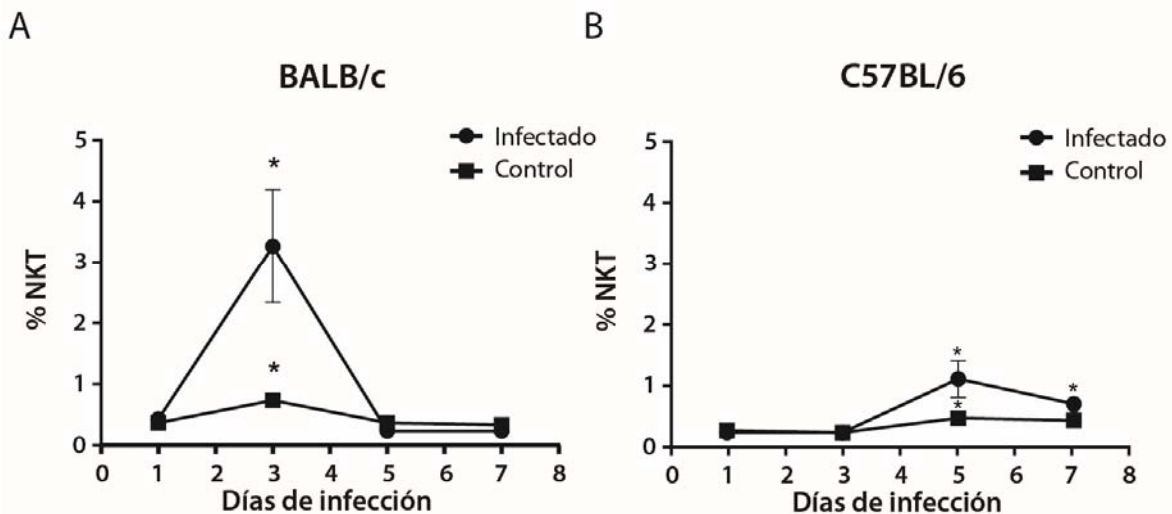


Figura 8. Frecuencia de células NTK en el ganglio cervical más cercano al sitio de infección. La frecuencia de las células NKT fue medida por citometria de flujo en células del ganglio cervical más cercano al sitio de infección de ratones BALB/c (A) y C57BL/6 (B) en los días 1, 3, 5 y 7. Los círculos cerrados muestran el porcentaje de células NKT durante la infección y los cuadros cerrados muestran los controles inoculados con solución salina. En las gráficas se muestra la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo.

Producción de IFN- γ e IL-4 por células NKT del ganglio cervical más cercano al sitio de infección con *L. mexicana* en ratones BALB/c Y C57BL/6

Para analizar si la infección por *L. mexicana* inducía la producción de citocinas en las células NKT, se midió IFN- γ e IL-4 por citometría de flujo en estas células. Dicha medición se realizó en el día de mayor incremento de su frecuencia, con base en la cinética realizada anteriormente. En ambas cepas de ratón, las células NKT produjeron tanto IFN- γ como IL-4. Las poblaciones productoras de IFN- γ y de IL-4 fueron mayores en la cepa C57BL/6 (14.6% y 2.5%, respectivamente) (Figura 9A), comparado con las poblaciones de la cepa BALB/c (2.5 % y 0.5%, respectivamente) (Figura 9B).

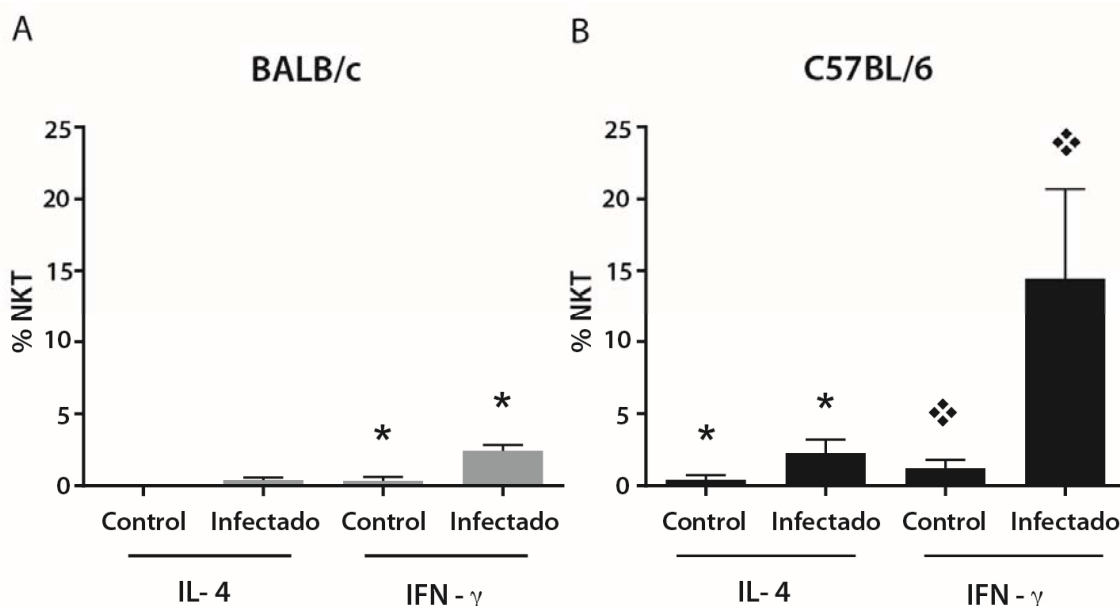


Figura 9. Porcentaje de células NKT productoras de IFN- γ e IL-4 en el ganglio más cercanos al sitio de infección con *L. mexicana*. El porcentaje de las células NKT productoras de IFN- γ e IL-4 fue medido en los ganglios cervicales de cada cepa en el día de mayor incremento de células NKT, para los BALB/c en el día 3 de infección (A) y para C57BL/6 en el día 5 de infección (B). Los controles fueron tratados con solución salina. Las barras muestran la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo.

Modulación de la expresión de marcadores de superficie en células dendríticas por la incubación con LPG de *L. mexicana* por 24 horas

Para analizar si la activación observada *in vivo* de las células NKT en el ganglio después de la infección, se debía a glicolípidos del parásito, se analizó si la LPG inducía el incremento en la expresión de moléculas de superficie en células dendríticas (CD40 y CD86 como coestimuladoras, MHC II y CD1d como presentadoras de antígenos y TLR2). Se observó que la estimulación con LPG de *L. mexicana* indujo el incremento de CD40 y CD86, sin embargo, CD40 aumentó de manera similar en ambas cepas (Figura 10A) y CD86 con mayor aumento en la cepa C57BL/6, comparado con la cepa BALB/c ($p < 0.05$) (Figura 10B).

Adicionalmente, la estimulación con LPG aumentó la expresión de moléculas presentadoras como MHC-II y CD1d en células dendríticas de ambas cepas, sin embargo, MHC-II se expresó más en C57BL/6 ($p < 0.05$) (Figura 10C, D). La estimulación con LPG incrementó la expresión de TLR2 (Figura 10E) solamente en las células dendríticas de los ratones C57BL/6. En el control positivo con péptidoglicano (agonista de TLR2), se indujo en las células dendríticas de ambas cepas un aumento en la expresión de TLR2, moléculas coestimuladoras y presentadoras de antígenos, similar al causado por LPG.

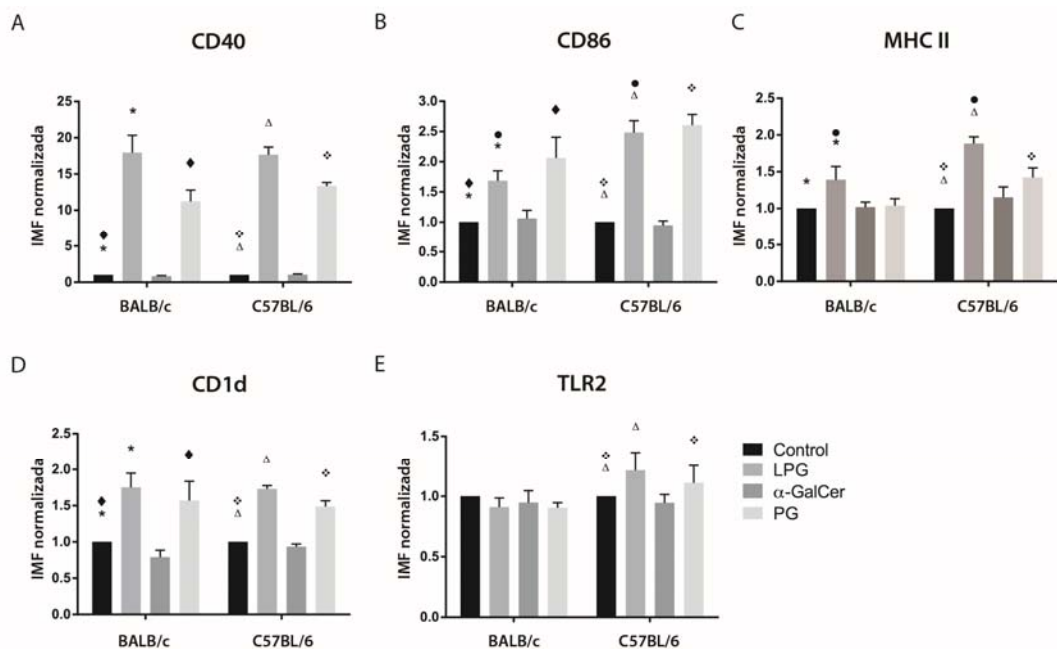


Figura 10. Marcadores de superficie de células dendríticas estimuladas con LPG, α -GalCer y PG por 24 horas. En las gráficas se muestra la intensidad media de fluorescencia normalizada a 1 de CD40 (A), CD86 (B), MHC II (C), CD1d (D) y TLR2. Como controles se utilizaron células dendríticas sin estimular. Las barras representan la mediana \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo.

Producción de citocinas por células dendríticas estimuladas con LPG de *L. mexicana* por 24 horas

El análisis de citocinas de los sobrenadantes de células dendríticas estimuladas con LPG, mostró que las células dendríticas de ambas cepas secretaron IL-12p70 y TNF- α en diferentes cantidades. Las células dendríticas de los ratones C57BL/6 produjeron 2.2 veces más IL-12p70 y 1.25 veces más TNF- α (Figura 11 A, B) con respecto a las células dendríticas de los ratones BALB/c ($p < 0.05$).

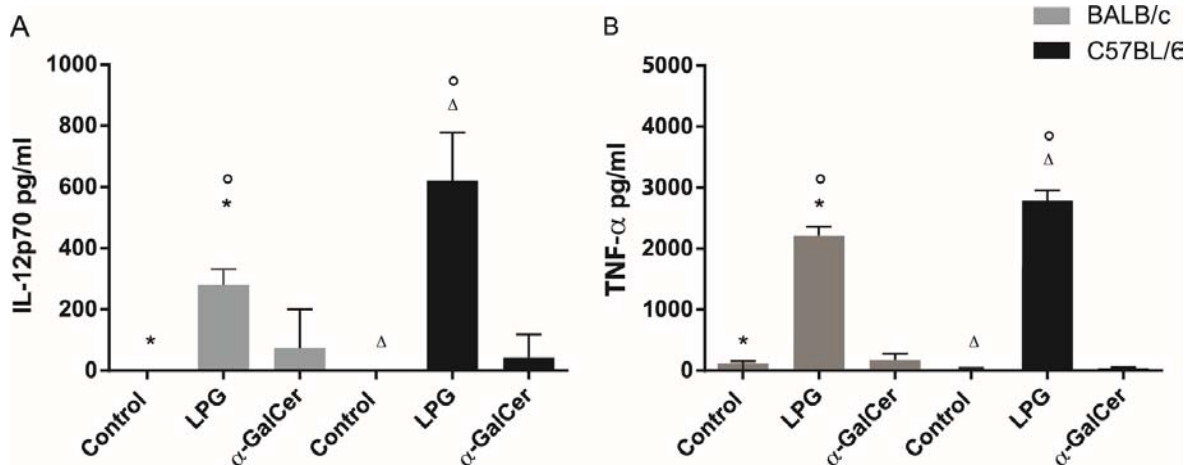


Figura 11. Producción de citocinas por células dendríticas estimuladas con LPG, α -GalCer por 24 horas. Se cuantificaron los niveles de IL-12p70 y TNF- α en el sobrenadante de 1.5×10^5 células estimuladas con LPG por 24 horas. Las barras representan la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo.

Producción de citocinas por células NKT incubadas con células dendríticas previamente estimuladas con LPG de *L. mexicana*

Al observar la inducción de maduración y activación de las células dendríticas por el LPG de *L. mexicana*, se analizó si estas podrían activar a las células NKT. Para esto, las células NKT se incubaron por 48 horas con dendríticas previamente estimuladas por 24 horas con LPG. Se observó que a las 48 horas de coincubación, las células NKT de ambas cepas produjeron grandes cantidades de IFN- γ , en el caso de C57BL/6 produjeron 3667 pg/mL, mientras que las NKT de los ratones BALB/c produjeron 1005 pg/mL, aproximadamente 3.6 veces menos que la cepa C57BL/6 (Figura 12A) ($p < 0.05$).

El control con α -GalCer mostró una producción diferencial de citocinas, ya que se indujo la secreción de IFN- γ por las células NKT de ambas cepas de ratón y también se indujo la producción de IL-4. Esta generación diferencial de citocinas no se observó con el estímulo de LPG, ya que solo se produjo IFN- γ . La producción diferencial de citocinas por α -GalCer es característica de la activación por CD1d-ligando sobre células NKT (Figura 12B).

Por citometría de flujo se corroboró que las células NKT de la cepa C57BL/6 fueron productoras de IFN- γ después de ser incubadas con células dendríticas previamente estimuladas con LPG o α -GalCer (Figura 12C, D).

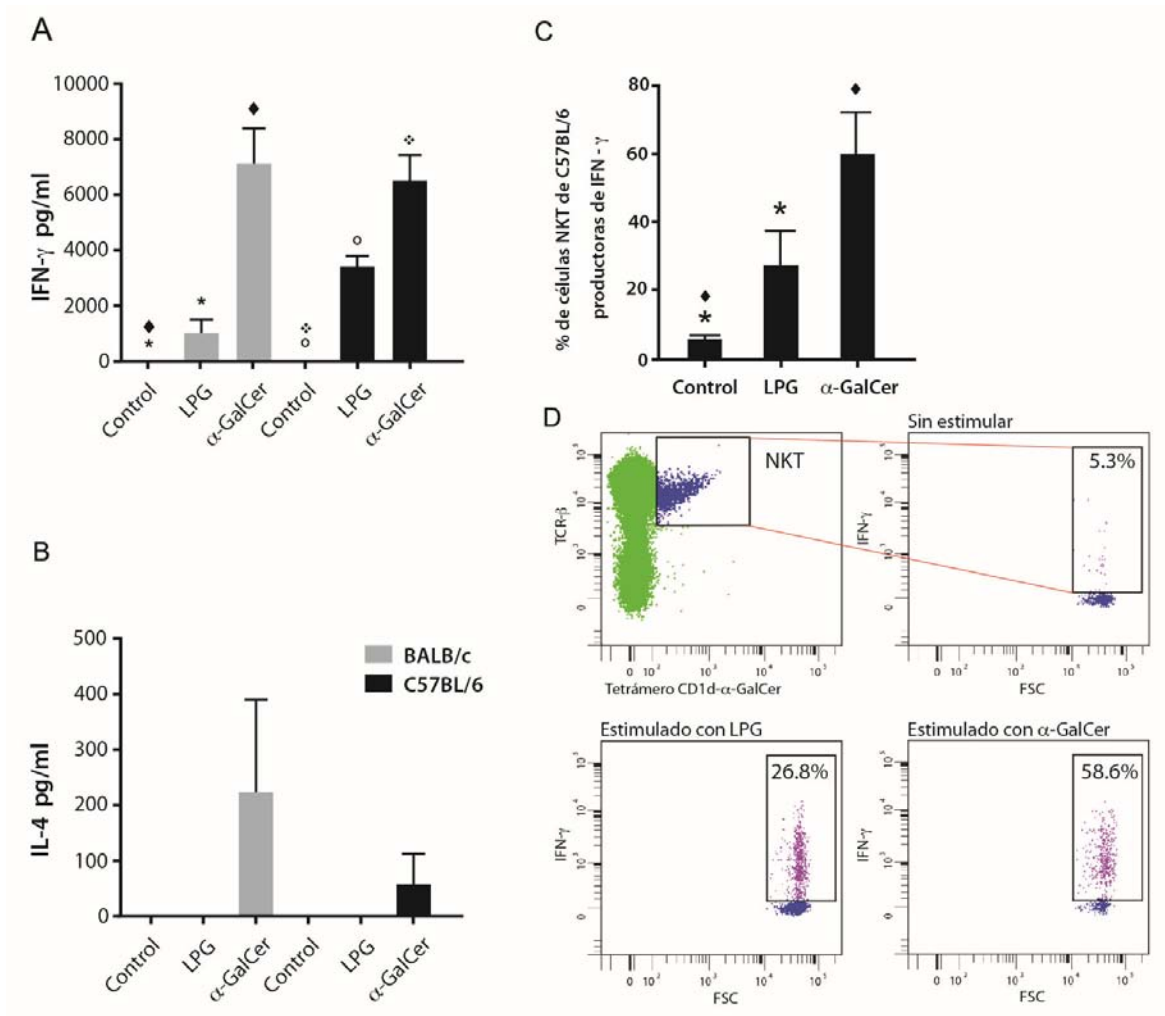


Figura 12. Producción de citocinas por la coincubación de células NKT con células dendríticas que previamente fueron estimuladas con LPG o α -GalCer. 1.5×10^6 linfocitos NKT enriquecidos de bazo fueron coincubados con 1.5×10^5 células dendríticas previamente estimuladas con LPG o α -GalCer. Cuarenta y ocho horas después se cuantificaron IFN- γ (A) e IL-4 (B) en los sobrenadantes. Adicionalmente por citometría de flujo (C) se cuantificó el porcentaje de células NKT productoras de IFN- γ 24 horas después de la coincubación. La citometría de flujo es mostrada en (D). Las barras representan la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

Producción de IFN- γ por células NKT después de haber sido estimuladas con IL-12p70

Para demostrar que la producción de IFN- γ fue inducida por la IL-12p70 y no por el estímulo directo con LPG o α -GalCer, se estimularon células NKT con LPG, α -GalCer o IL-12p70 por 48 horas. Se observó que solamente IL-12p70 estimuló la producción de IFN- γ por las células NKT (Figura 13A); esto fue corroborado por citometría de flujo (Figura 13B, C).

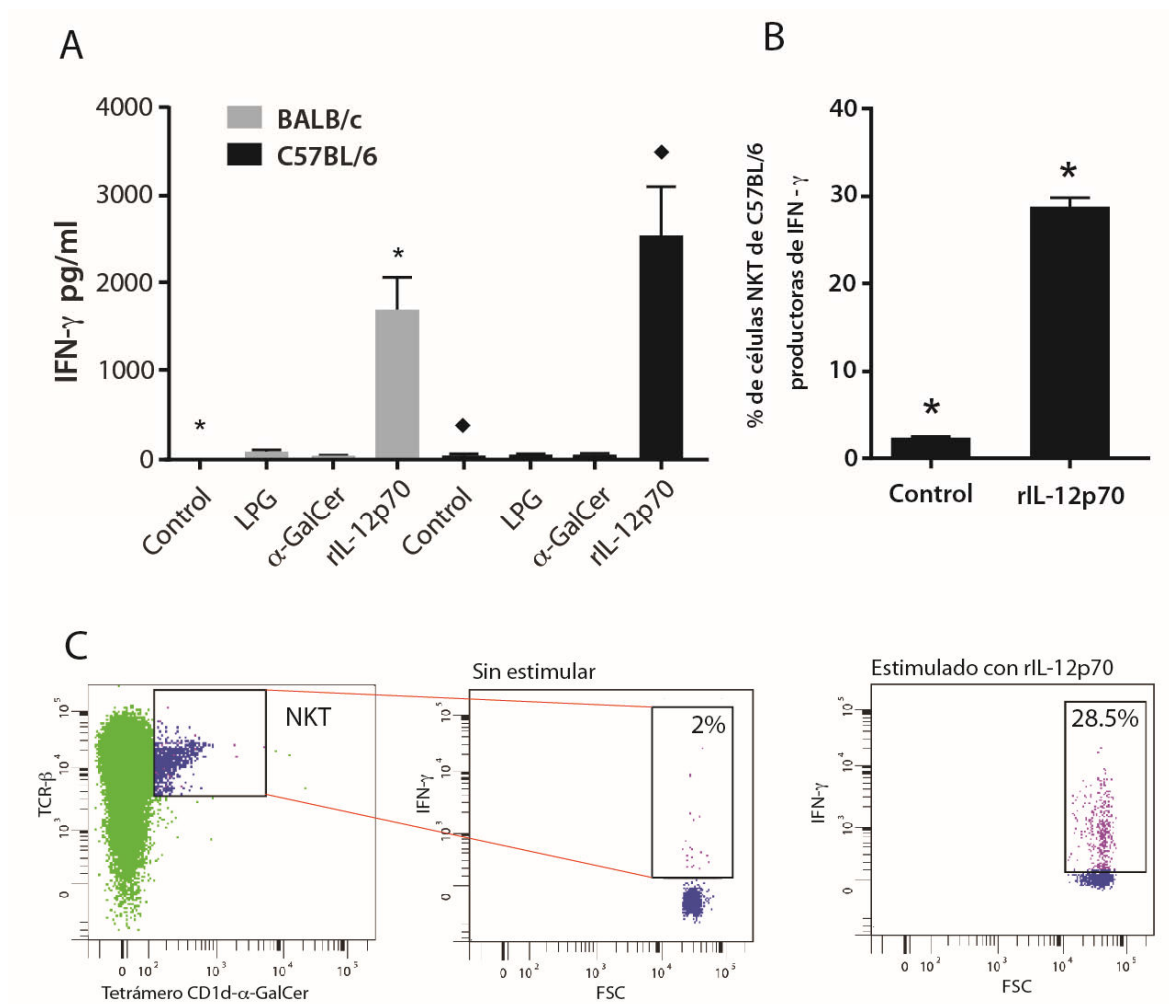


Figura 13. Producción de IFN- γ por células NKT después de la estimulación de IL-12p70. La producción de IFN- γ por células NKT de ratones C57BL/6 fue medida después de la estimulación con LPG, α -GalCer o IL-12p70 durante 48 horas (A) la producción de IFN- γ por células NKT estimuladas con IL-12p70 recombinante fue determinada por citometría de flujo. Las barras representan el porcentaje de células

productoras de citocinas (B) y las gráficas de puntos muestran la producción de IFN- γ por la población de las células NKT (C). Las barras representan la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

Colocalización de LPG con TLR2 en células dendríticas

Al observar el efecto del LPG (conjugado a FITC) en la activación de las células dendríticas, se analizó si esa activación podría ser mediada por TLR2 (conjugado con APC). Mediante microscopía confocal se observó la colocalización de LPG con TLR2 después de 3 horas de estímulo en la superficie de las células dendríticas (Figura 14).

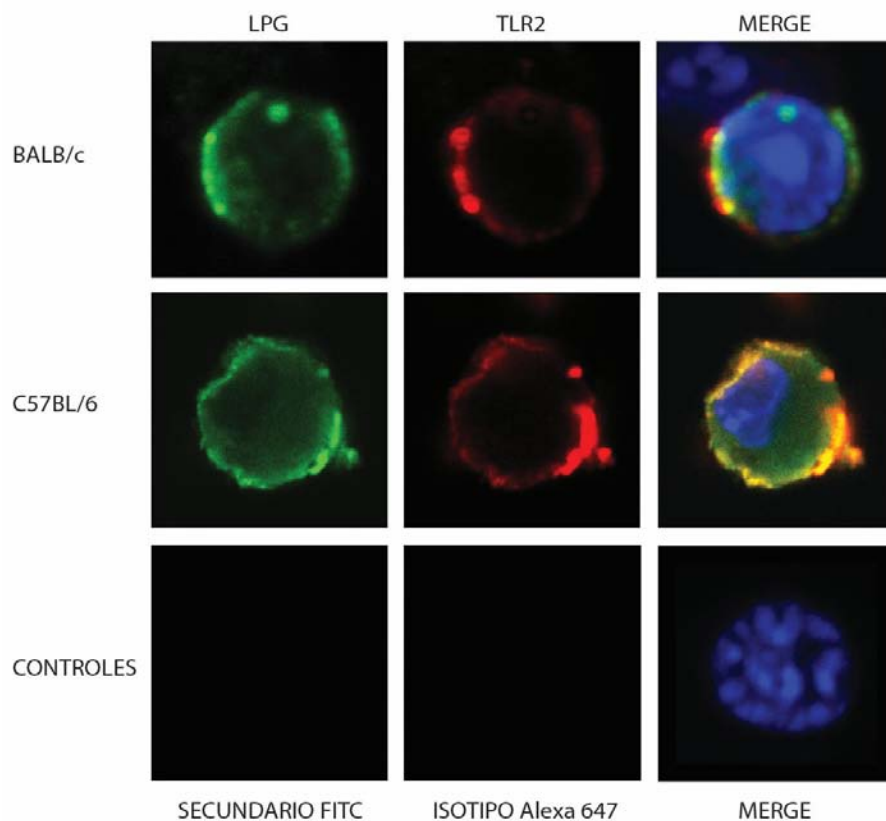


Figura 14. Colocalización de LPG con TLR2. Las células dendríticas fueron estimuladas con LPG por 3 horas y teñidas con anticuerpos anti-TLR2 y anti-LPG.

A la izquierda del panel se muestra la tinción de LPG en verde, en el centro del panel se muestra la tinción de TLR2 en rojo y a la derecha del panel se muestra la colocación de ambas tinciones en amarillo. El núcleo se tiñó con DAPI en azul. Se agregaron los controles de tinción, el anticuerpo secundario en ausencia del primario como control de la tinción de LPG y el isotipo como control de la tinción con anti-TLR2. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio confocal.

Fosforilación de I κ B α en células dendríticas

Para comprobar que LPG estimula la vía de TLR2 en células dendríticas se realizó una cinética de fosforilación de I κ B α en células dendríticas de ambas cepas de ratón estimuladas con LPG. Se observó que LPG indujo fosforilación de I κ B α , sin embargo, se observó variación en el tiempo de la fosforilación entre ambas cepas: en la cepa BALB/c la fosforilación inició a los cinco minutos después del estímulo y posteriormente decayó a valores basales, en contraste, la fosforilación de I κ B α en la cepa C57BL/6 inicio a los 15 minutos después del estímulo y se mantuvo durante 120 minutos que duró la cinética. El control positivo péptidoglicano (PG) tuvo el mismo comportamiento de fosforilación en ambas cepas, a los cinco minutos se fosforiló I κ B α , bajando a los 15 minutos para posteriormente sufrir un incremento y mantenerse hasta los 120 minutos (Figura 15).

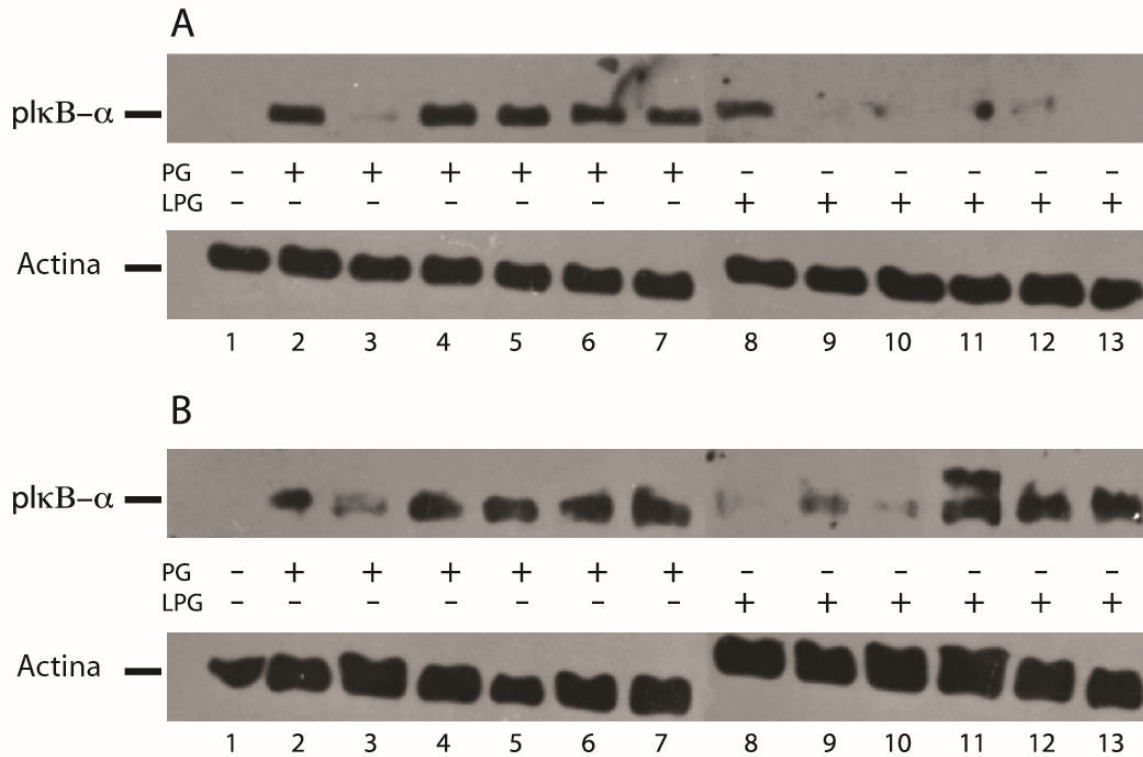


Figura 15. Activación de la vía de TLR. Se muestra la fosforilación de plkB α en células dendríticas sin estimular y estimuladas con PG o LPG de ratones BALB/c (A) y C57BL/6 (B) en los tiempos de 5, 15, 60, 90 7120 min. Línea 1: control sin estimular; línea 2 PG 5 min; PG 15 min; líneas 4: PG 30´min; línea 5: PG 60 min; línea 6: PG 90 min; línea 7: PG 120 min; línea 8: LPG 5 min; línea 9: LPG 15 min; línea 10: LPG 30 min; línea 11: LPG 60 min; línea 12: LPG 90 min; línea 13: LPG 120 min. Se muestra un inmunoblot representativo.

Disminución de la carga parasitaria en ratones BALB/c por la inmunización con ASL y α -GalCer infectados con *L. mexicana*

La inmunización con ASL o α -GalCer no modificó el tamaño de la lesión provocada por la infección con *L. mexicana* (Figura 16A), sin embargo, se observó que el uso de α -GalCer como adyuvante en la inmunización con ASL, redujo la carga parasitaria 7 veces ($p < 0.05$) con respecto al control sin inmunizar (Figura 16B). Los ratones inoculados con ASL o α -GalCer indujeron úlceras (Figura 16C).

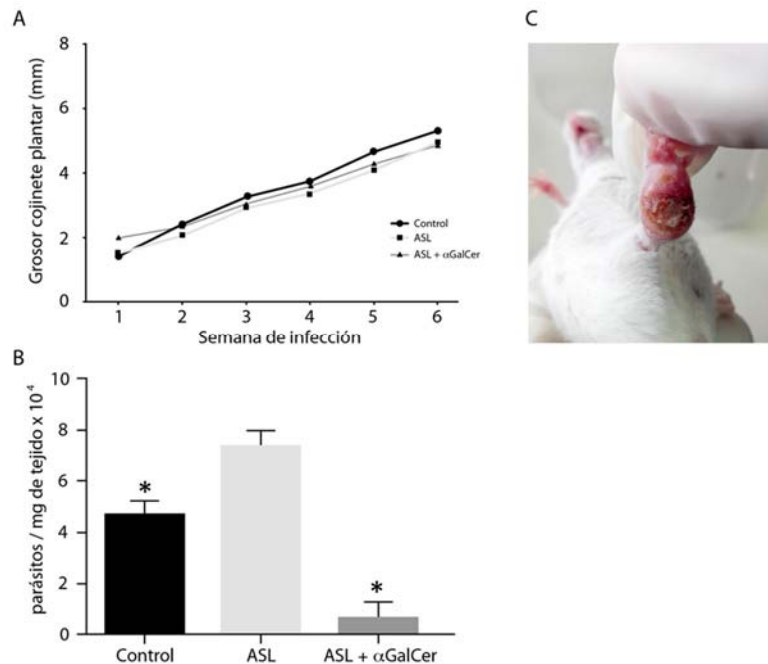


Figura 16. Tamaño y carga parasitaria de lesiones de ratones BALB/c inoculados con *L. mexicana*. Se inmunizaron ratones BALB/c con ASL o con ASL + α -GalCer como adyuvante. Después de una semana los ratones fueron infectados con 1×10^6 promastigotes en el cojinete plantar. Se monitoreó el tamaño de la lesión (B) hasta las 6 semanas de infección, en ese momento, los ratones fueron sacrificados para la cuantificación de la carga parasitaria (A). Se observó la formación de úlceras en los ratones inmunizados con ASL + α -GalCer (C). Los datos representan la media \pm la desviación estándar de ocho experimentos independientes. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo.

Producción de IFN- γ por esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con ASL y α -GalCer infectados con *L. mexicana*

Se observó que los esplenocitos de bazo de los ratones inmunizados con ASL + α -GalCer produjeron más IFN- γ comparado con el control sin estimular ($p \leq 0.05$). Mientras que la producción de IL-4, se redujo significativamente en el mismo grupo de ratones (Figura 17).

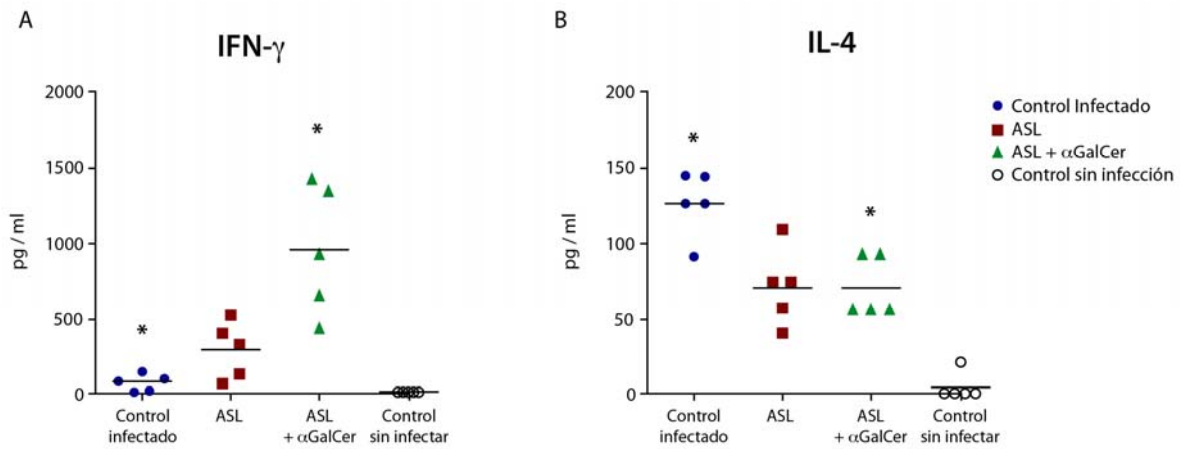


Figura 17. Producción de IFN- γ por esplenocitos de ratones inmunizados con ASL o ASL + α -GalCer infectados con *L. mexicana*. Se cultivaron por 7 días 1×10^6 células esplenocitos provenientes de cada uno de los ratones inmunizados. Posteriormente se cuantificó IFN- γ e IL-4 en los sobrenadantes de los ratones. Como controles se añadieron esplenocitos de ratones infectados sin inmunizar y esplenocitos de ratón sano. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de 5 experimentos independientes. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo.

VII. Discusión

En este trabajo nos interesó evaluar la participación de las células NKT en leishmaniasis. Nuestros resultados *in vivo* demostraron que en ambas cepas de ratón, las células NKT incrementaron su frecuencia en el ganglio linfático regional cercano al sitio de infección en los primeros días de la inoculación. Este hecho puede estar relacionado con la expansión del ganglio regional (hiperplasia) que ocurre después de la infección con *Leishmania*, este fenómeno se caracteriza por el aumento del tamaño del ganglio y el incremento del número de células. En la infección por *L. major* se ha descrito que esta hiperplasia en ganglio regional se da por el reclutamiento de células T *naïve*, linfocitos T efectores, monocitos y neutrófilos, después del día 3 de infección (Carvalho *et al.*, 2012). Además se ha demostrado que este reclutamiento está mediado por células dendríticas activadas

por TLR que inducen la expresión de CCR7 una quimiocina involucrada en la recirculación de los linfocitos T (*homing*) en los órganos linfoides secundarios. Este mecanismo está involucrado en el reclutamiento de las células T para montar la respuesta adaptativa (Carvalho *et al.*, 2012).

La producción de IFN- γ e IL-4 por las células NKT a causa de la infección fue mayor en la cepa C57BL/6 que en la cepa BALB/c. Como en ambas cepas predominó la producción de IFN- γ , es sugerente que las células NKT contribuyen en disminuir la progresión de la enfermedad, como se observó en los ratones C57BL/6 que tuvieron lesiones más pequeñas y menor carga parasitaria. Otros estudios han demostrado que la ausencia de células NKT en la infección por *L. donovani* provocan cuadros más graves de la enfermedad, con mayores cargas parasitarias y mayor grosor de la lesión. Probablemente el IFN- γ producido en respuesta a la infección sea el responsable de la protección, sin embargo también existen células citotóxicas que lisan a células dendríticas infectadas por el parásito, por lo que el papel citotóxico de éstas también podría estar involucrado y debería ser evaluado (Amprey *et al.*, 2004; Campos-Martín *et al.*, 2006).

Por su naturaleza glicolípídica posteriormente se estudió a LPG de *L. mexicana* como posible activador de las células NKT. Amprey y colaboradores describen que LPG de *L. donovani* es presentado por células dendríticas por medio de CD1d e induce la activación de las células NKT (Amprey *et al.*, 2004). Sin embargo, nuestros resultados *in vitro* sugieren que hay más de una vía de activación, ya que encontramos que LPG de *L. mexicana* induce producción de IL-12p70 y el aumento de moléculas coestimuladoras como CD86 y CD40 en células dendríticas, lo cual lleva a la producción de IFN- γ por las células NKT demostrándose de esta manera la vía de activación indirecta (Bendelac *et al.*, 2007; Zajonc & Girardi 2015).

Es importante hacer notar que la estimulación de NKT por las células dendríticas activadas por LPG durante 48 horas no indujo la producción de IL-4. Llama la atención que α -GalCer, un activador de las células NKT a través de CD1d, promovió la producción tanto de IFN- γ como de IL-4, mientras que LPG de *L. mexicana* solo

produjo IFN- γ . Este hecho refleja la estimulación de las células NKT ejercida por la IL-12p70 generada por células dendríticas activas a través de TLR2, ya que en la vía indirecta solamente se describe la producción de IFN- γ y no de IL-4, en contraste con la estimulación clásica (vía directa) donde se da lugar a la producción tanto de IFN- γ como de IL-4 (Zajonc & Girardi 2015). Aunque en nuestro trabajo se demostró activación de las células NKT por la vía indirecta, no descartamos la participación de la vía directa, ya que el estímulo de LPG incrementó la expresión de CD1d en ambas cepas. Sin embargo, este incremento no necesariamente refleja la activación por esta vía.

La activación de TLR2 por LPG de *L. mexicana* fue descrita previamente en células NK por nuestro grupo (Becker *et al.*, 2003). Adicionalmente, LPG de *L. mexicana* ha sido considerado un PAMP en células dendríticas ya que induce la maduración y activación de células dendríticas, con aumento en moléculas coestimuladoras y producción de citocinas IL-12 y TNF- α (Aebischer *et al.*, 2005; Argueta-Donohué *et al.*, 2008). Estos antecedentes reflejan que las células dendríticas estimuladas por LPG de *L. mexicana* potencialmente activan la vía indirecta de las células NKT. Esto se refuerza con nuestro hallazgo del incremento en CD86 y CD40, cuando las células dendríticas fueron estimuladas durante 24 horas con LPG, ya que células NKT requieren para su activación de ambos estímulos: IL-12p70 y moléculas coestimuladoras (Zajonc & Girardi 2015; Brigi *et al.*, 2003). Se ha demostrado que aunque LPS no se une a CD1d, es capaz de activar a las células NKT de manera indirecta por la inducción de IL-12 e IL-18 en células dendríticas (Nagarajan & Kronenberg, 2007).

En este trabajo se observó la colocalización de TLR2 con LPG de *L. mexicana* y la fosforilación de I κ B α , molécula que es parte de la señalización por la vía de TLR. Al fosforilarse esta molécula induce la translocación de NF- κ B al núcleo para iniciar la transcripción de mediadores inflamatorios como IL-12 y TNF- α . Otros reportes sugieren una participación importante del TLR2 en la inmunobiología de la leishmaniasis, ya que ratones deficientes de TLR2 infectados con *L. major* o *L.*

mexicana cursan con lesiones y cargas parasitarias mayores que los ratones silvestres (De Veer *et al.*, 2003; Halliday *et al.*, 2016).

Adicionalmente, la participación de la vía indirecta de activación de células NKT se refuerza por el hecho de que no hay reportes en la literatura de la unión de LPG con CD1d. Únicamente se ha demostrado que LPG de *L. donovani* compite con α -GalCer por la unión a tetrámeros de CD1d recombinante. Sin embargo, no se demostró la activación de células NKT con los tetrámeros cargados con LPG, ya que únicamente observaron activación con tetrámeros cargados con α -GalCer (Amprey *et al.*, 2004). Este hallazgo apoya la importancia del análisis de la vía indirecta de activación de células NKT.

La activación de células NKT por LPG de *L. mexicana* varía entre cepas de ratones, ya que observamos que la expresión de MHC II, CD86, TLR2 y la producción de citocinas siempre fue mayor en la cepa C57BL/6 que en la cepa BALB/c. Además, en la fosforilación de plkB α , el estímulo con LPG también difiere entre las cepas, ya que es más sostenido en la cepa BALB/c. Este fenómeno es inherente al estímulo con LPG ya que el estímulo con PG no mostró diferencia entre las cepas. Es posible que el hecho de que la cepa C57BL/6 sostenga la fosforilación por más tiempo, ayude a que la producción de citocinas sea mayor el aumento en la coestimulación. Estos datos concuerdan con los de la literatura donde se ha reportado respuesta diferencial entre células dendríticas de ratones C57BL/6 y BALB/c estimulados con otros ligandos de TLR2 como zymosan y lipoproteína, confirmando la mayor producción de IL-12 por ratones C57BL/6 (Liu *et al.*, 2002).

Llama la atención que las citocinas encontradas en estudios *in vivo* difieren de las encontradas en los estudios *in vitro*. Esto posiblemente se deba a que los estímulos *in vivo* se hicieron con el parásito completo que tiene múltiples antígenos y por lo tanto podría activar distintas vías para la activación de células NKT. Se ha demostrado que el glicosfingofosfolípido de *L. donovani* está unido a CD1d en balsas lipídicas e induce la producción de IL-2 en células NKT (Karmakar *et al.*, 2011). La presencia de moléculas presentadoras de antígenos en balsas lipídicas

es indicativa del proceso de presentación antigénica (Anderson & Roche 2015; Karmakar *et al.*, 2011). Esto demuestra que además de LPG otros glicolípidos de *Leishmania* pueden estar participando en la activación de las células NKT.

El papel de las células NKT en la protección contra *L. mexicana* se observó al comparar el porcentaje de células NKT productoras de IFN- γ entre las cepas. Los ratones C57BL/6 tuvieron mayor porcentaje de células NKT productoras de IFN- γ con respecto a la cepa BALB/c. Esto se correlaciona con el mayor control de la infección y el menor tamaño de la lesión observado en los ratones C57BL/6, ya que los ratones BALB/c cursaron con mayor carga parasitaria y lesiones más grandes. Otros estudios han demostrado que las células NKT de hígado y de bazo en ratones C57BL/6 infectados con *L. donovani* o *L. major*, también producen IFN- γ que contribuye a la protección del ratón (Amprey *et al.*, 2004; Mattner *et al.*, 2006).

En este trabajo también se analizó el papel de α -GalCer como adyuvante en una inmunización con ASL. Se sabe que α -GalCer induce grandes cantidades de IFN- γ , lo que podría dar lugar a un mayor número de clones Th1 contra *Leishmania*. Se observó que la inmunización con ASL + α -GalCer no redujo el tamaño de la lesión e indujo lesiones con úlceras, sin embargo, disminuyó la carga parasitaria. Algunos estudios han demostrado que el grado de inflamación no se correlaciona con la carga parasitaria, además el desarrollo de úlceras en las lesiones es de buen pronóstico en pacientes con leishmaniasis cutánea, ya que el infiltrado inflamatorio de dichas lesiones presentan apoptosis, producción de IFN- γ y TNF- α (Cáceres-Dittmar *et al.*, 1993; Hernández-Ruiz *et al.*, 2010; Scorza *et al.*, 2017; Silveira *et al.*, 2004). La reducción de la carga parasitaria se correlacionó con el incremento de la producción de IFN- γ por los esplenocitos de bazo. Lo cual sugiere que la producción de IFN- γ inducida por α -GalCer es capaz de dirigir la diferenciación de linfocitos Th1, por lo cual las células NKT a pesar de ser una subpoblación pequeña de linfocitos T, juega un papel central en esta diferenciación. Otros estudios han demostrado que las células NKT participan en la inducción de linfocitos CD4 y CD8 productores

de IFN- γ y citotóxicos respectivamente, en la inmunización con vacunas de DNA en infecciones con *L. major* (Dondji *et al.*, 2008).

VIII. Conclusiones

En este trabajo se concluye que el LPG de *L. mexicana* activa a las células NKT a través de la vía indirecta, la cual fue más pronunciada en los ratones C57BL/6 y fue mediada por la IL-12p70 producida por la activación de TLR2 en células dendríticas. Se propone que las células NKT ayudan a la protección contra *L. mexicana*, por su producción de IFN- γ , la cual es mayor en la cepa C57BL/6 que en BALB/c. Además, estas células contribuyen en la activación de clones Th1 en la infección por el parásito, ya que su activación mediante α -GalCer indujo mayor producción de IFN- γ en la infección. Estos resultados aumentan la importancia del estudio de las células NKT en la inmunobiología de la leishmaniasis y en su uso para dirigir la respuesta inmune celular tipo Th1 en vacunas.

IX. Referencias

Aebischer, T., Bennett, C. L., Pelizzola, M., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Urbano, M., Ricciardi-Castagnoli, P. (2005). A critical role for lipophosphoglycan in proinflammatory responses of dendritic cells to *Leishmania mexicana*. *European Journal of Immunology*, 35(2), 476–486. <http://doi.org/10.1002/eji.200425674>.

Amprey, J. L., Im, J. S., Turco, S. J., Murray, H. W., Illarionov, P. a, Besra, G. S., Späth, G. F. (2004). A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(7), 895–904. <http://doi.org/10.1084/jem.20040704>.

Anderson, H. A., & Roche, P. A. (2015). MHC class II association with lipid rafts on the antigen presenting cell surface. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853(4), 775–780. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.019>.

Argueta-Donohué, J., Carrillo, N., Valdés-Reyes, L., Zentella, A., Aguirre-García, M., Becker, I., & Gutiérrez-Kobeh, L. (2008). *Leishmania mexicana*: participation of NF- κ B in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Experimental Parasitology*, 120(1), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.002>.

Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L. G., Isibasi, A. (2003). *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130(2), 65–74. [http://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00160-9](http://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00160-9).

Bendelac, A., Savage, P. B., & Teyton, L. (2007). The biology of NKT Cells. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 297–336. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711>.

Borg, N. a, Wun, K. S., Kjer-Nielsen, L., Wilce, M. C. J., Pellicci, D. G., Koh, R., Rossjohn, J. (2007). CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell

receptor. SUPPLEMENT. *Nature*, 448(7149), 44–49.
<http://doi.org/10.1038/nature05907>.

Brigl, M., Bry, L., Kent, S. C., Gumperz, J. E., & Brenner, M. B. (2003). Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nature Immunology*, 4(12), 1230–1237. <http://doi.org/10.1038/ni1002>.

Buxbaum, L. U., & Scott, P. (2005). Interleukin 10 and Fcγ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infection and Immunity*, 73(4), 2101–2108. <http://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2101-2108.2005>.

Cabezas, Y., Legentil, L., Robert-Gangneux, F., Daligault, F., Belaz, S., Nugier-Chauvin, C., Ferrières, V. (2015). *Leishmania* cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(31), 8393–8404. <https://doi.org/10.1039/C5OB00563A>

Cáceres-Dittmar, G., Tapia, F. J., Sánchez, M. A., Yamamura, M., Uyemura, K., Modlin, R. L., Convit, J. (1993). Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clinical and Experimental Immunology*, 91(3), 500–5.

Campos-Martín, Y., Colmenares, M., Gozalbo-López, B., López-Núñez, M., Savage, P. B., & Martínez-Naves, E. (2006). Immature human dendritic cells infected with *Leishmania infantum* are resistant to NK-mediated cytotoxicity but are efficiently recognized by NKT cells. *The Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(10), 6172–6179. <http://doi.org/10.1093/ijl/176/10/6172>.

Carvalho, L. P., Petritus, P. M., Trochtenberg, A. L., Zaph, C., Hill, D. A., Artis, D., & Scott, P. (2012). Lymph node hypertrophy following *Leishmania major* infection is dependent upon TLR9. *The Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(3), 1394–1401. <http://doi.org/10.1093/ijl/188/3/1394>.

Coquet, J. M., Chakravarti, S., Kyriakopoulos, K., McNab, F. W., Pitt, L. a, McKenzie, B. S., Godfrey, D. I. (2008). Diverse cytokine production by NKT cell subsets and

identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(32), 11287–92. <http://doi.org/10.1073/pnas.0801631105>.

Dasgupta, S., & Kumar, V. (2016). Type II NKT cells: a distinct CD1d-restricted immune regulatory NKT cell subset. *Immunogenetics*, 68(8), 665–676. <http://doi.org/10.1007/s00251-016-0930-1>.

De Veer, M. J., Curtis, J. M., Baldwin, T. M., DiDonato, J. a., Sexton, A., McConville, M. J., Schofield, L. (2003). MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: Possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *European Journal of Immunology*, 33(10), 2822–2831. <http://doi.org/10.1002/eji.200324128>.

Dondji, B., Deak, E., Goldsmith-Pestana, K., Perez-Jimenez, E., Esteban, M., Miyake, S., McMahon-Pratt, D., 2008. NKTi cell activation during DNA priming in heterologous prime-boost vaccination enhances T cell responses and protection against *Leishmania*. *European Journal of Immunology*, 38(3), 706–719, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200737660>.

Favila MA, Geraci NS, Jayakumar A, Hickerson S, Mostrom J., Turco S., Beverley S. McDowell M. (2015) Differential impact of LPG-and PG-Deficient *Leishmania major* mutants on the immune response of human dendritic cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9(12): e0004238. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004238>

Felizardo, T. C., Toma, L. S., Borges, N. B., Lima, G. M. C. a, & Abrahamsohn, I. a. (2007). *Leishmania* (L) *amazonensis* infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. *Parasitology*, 134(Pt 12), 1699–1707. <http://doi.org/10.1017/S0031182007003186>

Ferguson, M. A. (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *Journal of Cell Science*, 112(17), 2799-2809.

Forestier, C., Gao, Q., & Boons, G. (2015). *Leishmania* lipophosphoglycan : how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(193), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00193>.

Godfrey, D. I., Hammond, K. J. L., Poulton, L. D., Smyth, M. J., & Baxter, A. G. (2000). NKT cells: Facts, functions and fallacies. *Immunology Today*, 21(11), 573–583. [http://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01735-7](http://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01735-7).

Gupta, G., Oghumu, S., & Satoskar, A. R. (2013). Mechanisms of Immune Evasion in *Leishmaniasis*. *Advances in Applied Microbiology*, 82. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3>.

Habu, Y., Uchida, T., Inui, T., Nakashima, H., Fukasawa, M., & Seki, S. (2004). Enhancement of the synthetic ligand-mediated function of liver NK1.1Ag⁺ T cells in mice by interleukin-12 pretreatment. *Immunology*, 113(1), 35–43. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01932.x>.

Halliday, A., Bates, P. A., Chance, M. L., & Taylor, M. J. (2016). Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a role in controlling cutaneous leishmaniasis in vivo, but does not require activation by parasite lipophosphoglycan. *Parasites & Vectors*, 9, 532. <http://doi.org/10.1186/s13071-016-1807-8>.

Hermida, M. D. R., Doria, P. G., Taguchi, A. M. P., Mengel, J. O., & Dos-Santos, W. L. C. (2014). *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC Infectious Diseases*, 14, 450. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-14-450>.

Hernández-Ruiz, J., Salaiza-Suazo, N., Carrada, G., Escoto, S., Ruiz-Remigio, A., Rosenstein, Y. Becker, I. (2010). CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11), e871. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000871>.

Ho, L.-P., Urban, B. C., Jones, L., Ogg, G. S., & McMichael, A. J. (2004). CD4-CD8 Subset of CD1d-Restricted NKT cells controls T cell expansion. *The Journal of Immunology*, 172(12), 7350–7358. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7350>.

Hsu A and Scott P. (2007). *Leishmania mexicana* infection induces impaired lymph node expansion and Th1 cell differentiation despite normal T cell proliferation. *The Journal of Immunology*, 179(12), 8200-8207.

Iezzi, G., Frohlich, a., Ernst, B., Ampenberger, F., Saeland, S., Glaichenhaus, N., & Kopf, M. (2006). Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology*, 177(2), 1250–1256. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.1250>.

Kain, L., Webb, B., Anderson, B. L., Deng, S., Holt, M., Constanzo, A., Teyton, L. (2014). The identification of the endogenous ligands of natural killer T cells reveals the presence of mammalian α -Linked glycosylceramides. *Immunity*, 41(4), 543–554. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.08.017>.

Karmakar, S., Paul, J., & De, T. (2011). *Leishmania donovani* glycosphingolipid facilitates antigen presentation by inducing relocation of CD1d into lipid rafts in infected macrophages. *European Journal of Immunology*, 41(5), 1376–1387. <http://doi.org/10.1002/eji.201040981>.

Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(8), 604–615. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2608>.

Leite-De-Moraes, M. C., Hameg, A., Arnould, A., Machavoine, F., Koezuka, Y., Schneider, E., Dy, M. (1999). A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *The Journal of Immunology*, 163(11), 5871-5876.

Liu, T., Matsuguchi, T., Tsuboi, N., Yajima, T., & Yoshikai, Y. (2002). Differences in expression of Toll-Like Receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c

and C57BL/6 mice. *Infection and Immunity*, 70(12), 6638–6645. <http://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6638>.

Mattner, J., Donhauser, N., Werner-Felmayer, G., & Bogdan, C. (2006). NKT cells mediate organ-specific resistance against *Leishmania major* infection. *Microbes and Infection*, 8(2), 354–362. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.07.002>.

McConville, M. J., & Ferguson, M. A. (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochemical Journal*, 294(2), 305-324.

Metelitsa, L. S., Naidenko, O. V, Kant, a, Wu, H. W., Loza, M. J., Perussia, B., Seeger, R. C. (2001). Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *The Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(6), 3114–3122. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.167.6.3114>.

Nagarajan, N. A., & Kronenberg, M. (2007). Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 178(5), 2706–2713. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2706>.

Nieda, M., Okai, M., Tazbirkova, A., Lin, H., Yamaura, A., Ide, K., Nicol, A. J. (2004). Therapeutic activation of V α 24. *Cell*, 103(2), 383–389. <http://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1155>.Supported.

Noronha, F. S., Nunes, a C., Souza, K. T., Melo, M. N., & Ramalho-Pinto, F. J. (1998). Differential sensitivity of New World *Leishmania* spp. promastigotes to complement-mediated lysis: correlation with the expression of three parasite polypeptides. *Acta Tropica*, 69(1), 17–29. <http://doi.org/S0001706X97001083>.

Osorio, E. Y., Zhao, W., Espitia, C., Saldarriaga, O., Hawel, L., Byus, C. V, Melby, P. C. (2012). Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. *PLoS Pathogens*, 8(1), e1002417. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002417>.

Pandey, S. P., Doyen, N., Mishra, G. C., Saha, B., & Chandel, H. S. (2015). TLR9-deficiency reduces TLR1, TLR2 and TLR3 expressions in *Leishmania major* infected macrophages. *Experimental Parasitology*, *154*, 82–86. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.005>.

Rojas-Bernabé, a, Garcia-Hernández, O., Maldonado-Bernal, C., Delegado-Dominguez, J., Ortega, E., Gutiérrez-Kobeh, L., Aguirre-Garcia, M. (2014). *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. *Parasitology*, *141*(6), 788–800. <http://doi.org/10.1017/S0031182013002187>.

Sacks, D. L., Pimenta, P. F., McConville, M. J., Schneider, P., & Turco, S. J. (1995). Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine*, *181*(2), 685-697.

Sacks, D., & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to leishmania major in mice. *Nature Reviews Immunology*, *2*(11), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nri933>.

Saha, B., Bhardwaj, S., Srivastava, N., & Sudan, R. (2010). *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2010*. <http://doi.org/10.1155/2010/109189>.

Schneiders, F. L., Scheper, R. J., von Blomberg, B. M. E., Woltman, A. M., Janssen, H. L. a., van den Eertwegh, A. J. M., ... van der Vliet, H. J. (2011). Clinical experience with α -galactosylceramide (KRN7000) in patients with advanced cancer and chronic hepatitis B/C infection. *Clinical Immunology*, *140*(2), 130–141. <http://doi.org/10.1016/j.clim.2010.11.010>.

Scorza, B. M., Carvalho, E. M., & Wilson, M. E. (2017). Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6). <http://doi.org/10.3390/ijms18061296>.

Silveira, F. T., Lainson, R., & Corbett, C. E. P. (2004). Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(3), 239–51. <http://doi.org/S0074-02762004000300001>.

Sisto, M., Brandonisio, O., Panaro, M. a, Acquafredda, a, Leogrande, D., Fasanella, a, Mitolo, V. (2001). Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania* infected dog macrophages. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 24(4), 247–54. [http://doi.org/10.1016/S0147-9571\(01\)00013-3](http://doi.org/10.1016/S0147-9571(01)00013-3).

Smelt, S. C., Cotterell, S. E. J., Engwerda, C. R., & Kaye, P. M. (2000). B cell deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *The Journal of Immunology*, 164(7), 3681–3688. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3681>.

Sosa Ávila, E. J., Caro Lozano, J., & Zúñiga Carrasco, I. R. (2014). Perfil epidemiológico de la leishmaniasis: Una enfermedad olvidada en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(1), 31–36.

Tacchini-Cottier, F., Weinkopff, T., & Launois, P. (2012). Does T helper differentiation correlate with resistance or susceptibility to infection with *L. major*? Some insights from the murine model. *Frontiers in Immunology*, 3, 1–9. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00032>.

Taraban, V. Y., Martin, S., Attfield, K. E., Glennie, M. J., Elliott, T., Elewaut, D., Al-Shamkhani, A. (2008). Invariant NKT cells promote CD8+ cytotoxic T cell responses by inducing CD70 expression on dendritic cells. *The Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(7), 4615–20. doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4615.

Terabe, M., & Berzofsky, J. a. (2008). The role of NKT cells in tumor immunity. *Advances in Cancer Research*, 101(08), 277–348. [http://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)004089](http://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)004089).

Titus, R. G., Marchand, M., Boon, T., & Louis, J. A. (1985). A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunology*, 7(5), 545–555. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1985.tb00098.x>.

Tsuji, M. (2006). Glycolipids and phospholipids as natural CD1d-binding NKT cell ligands. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 1889–1898. <http://doi.org/10.1007/s00018-006-6073-z>.

Turco, S. J., & Descoteaux, A. (1992). The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annual Review of Microbiology*, 46, 65–94. doi: 10.1146/annurev.mi.46.100192.000433.

Ueno, N., & Wilson, M. E. (2012). Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology*, 28(8), 335–344. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002>.

Wanasen, N., Xin, L., & Soong, L. (2008). Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *International Journal for Parasitology*, 38(3–4), 417–429. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.08.010>.

World Health Organization (WHO), 2017. Leishmaniasis. Recurso electrónico: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

Zajonc, D. M., & Girardi, E. (2015). Recognition of Microbial Glycolipids by Natural Killer T Cells. *Frontiers in Immunology*, 6, 1–11. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00400>.

Zamora-Chimal, J., Fernández-Figueroa, E. A., Ruiz-Remigio, A., Wilkins-Rodríguez, A. A., Delgado-Domínguez, J., Salaiza-Suazo, N., Becker, I. (2017). NKT cell activation by *Leishmania mexicana* LPG: Description of a novel pathway. *Immunobiology*, 222(2), 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.08.003>.

X. Anexo

Selección de la población de los linfocitos NKT

Para la identificación de células NKT primero se enriquecieron las células T mediante columnas inmunomagnéticas, posteriormente en el citómetro de flujo se seleccionó la población de linfocitos T que reconocían el CD1d cargado con α -GalCer (Figura 18 C).

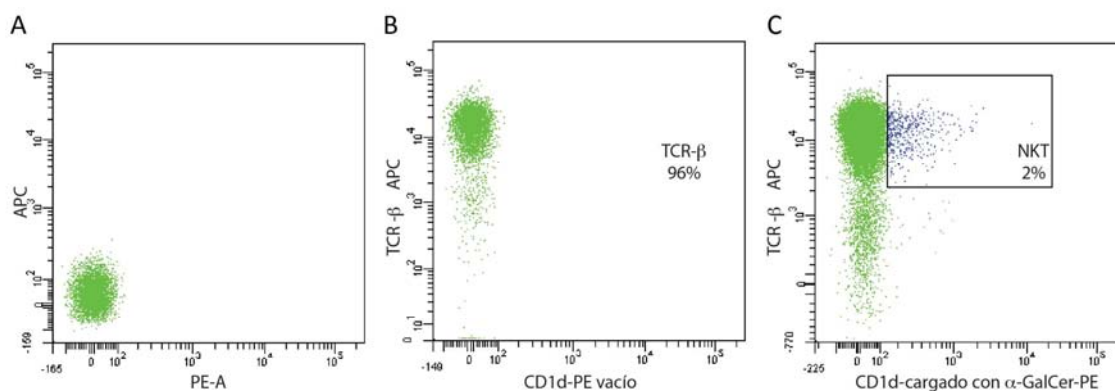


Figura 18. Regionalización de células NKT por citometría de flujo. A, Control sin teñir. B, Marcaje de células TCR- β + después del enriquecimiento de células T. C, marcaje de células NKT mediante CD1d cargado con α -GalCer.

Análisis de la expresión de moléculas de superficie en células dendríticas

Para identificar a las células dendríticas se seleccionaron las células CD11+ de la población de células diferenciadas de médula ósea mediante GM-CSF por 8 días, posteriormente en esta población se cuantificó la expresión de marcadores como: CD86, MHCII, CD40, CD1d and TLR2, en células estimuladas con LPG y sin estimular. Adicionalmente se añadieron los controles de isotipo para cada marcador (Figura 19).

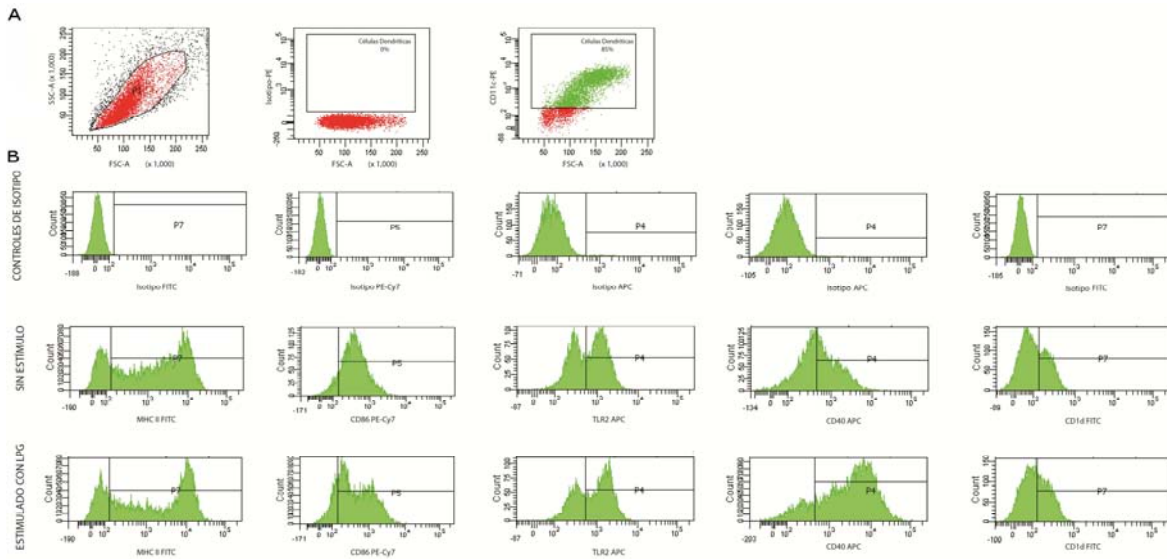
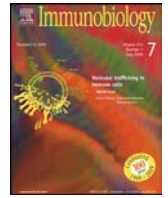


Figura 19. Histogramas de expresión de MHCII, CD86, CD40, CD1d and TLR2 en células CD11c+. A, se muestra la población de células dendríticas diferenciadas de médula ósea CD11c+ y el control de isotipo del marcaje. B, se muestran los controles de isotipo de todos los marcajes de las moléculas de superficie. C, se muestra la expresión de moléculas de superficie en células sin estimular. D, se muestra la expresión de moléculas de superficie en células estimuladas con LPG por 24 horas.



NKT cell activation by *Leishmania mexicana* LPG: Description of a novel pathway

Jaime Zamora-Chimal, Edith A. Fernández-Figueroa, Adriana Ruiz-Remigio, Arturo A. Wilkins-Rodríguez, José Delgado-Domínguez, Norma Salaiza-Suazo, Laila Gutiérrez-Kobeh, Ingeborg Becker*

Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Ciudad de México C.P. 06726, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2016
Received in revised form 16 June 2016
Accepted 5 August 2016
Available online 6 August 2016

Keywords:

NKT
Leishmania mexicana
LPG
TLR2
Cytokines
Dendritic cells

ABSTRACT

NKT cells have been associated with protection against *Leishmania donovani*, yet their role in infections with *Leishmania mexicana* has not been addressed, nor has the activation pathway been defined after stimulation with *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan (LPG). We analyzed the activation of NKT cells and their cytokine production in response to *Leishmania mexicana* LPG. Additionally we compared NKT-cell numbers and cytokine profile in lymph nodes of skin lesions induced by *Leishmania mexicana* in BALB/c and C57BL/6 mice. We show that LPG activates NKT cells primarily through the indirect pathway, initiating with TLR2 stimulation of dendritic cells (DC), thereby enhancing TLR2, MHC II, and CD86 expressions and IL-12p70 production. This leads to IFN- γ production by NKT cells. C57BL/6 mice showed enhanced DC activation, which correlated with augmented IFN- γ production by NKT cells. Additionally, infected C57BL/6 mice showed elevated percentages of NKT cells with higher IFN- γ and IL-4 production in lymph nodes.

We conclude that the response of NKT cells towards *Leishmania mexicana* LPG initiates with the indirect activation, after binding of LPG to TLR2 in DC. This indirect activation pathway enables NKT cells to produce IFN- γ during the innate phase of *Leishmania* infection, the magnitude of which differs between mouse strains.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

NKT cells have features of both the innate and adaptive immune responses: they share surface markers with NK cells such as NK1.1 and they also have an invariant T-cell receptor (TCR) characterized by V α 14–J α 18 (Bendelac et al., 2007). NKT cells make up 0.1–0.5% of the peripheral blood leucocytes, they produce cytokines such as IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 and IL-13 and additionally are cytotoxic cells capable of destroying cells after TCR recognition, as well as independently of TCR recognition. Furthermore, NKT cells also enhance cytotoxicity of NK cells through their IL-2 secretion (Godfrey et al., 2000; Coquet et al., 2008; Metelitsa et al.,

2001). NKT cells are classically activated by glycolipid antigens presented by CD1d molecules of DC (Slauenwhite and Johnston, 2015). One of the best-studied glycolipids capable of activating NKT cells through the direct activation pathway is α -Galactosylceramide (α -GalCer), which induces both IFN- γ and IL-4 production (Juno et al., 2012). However, NKT cells can also be activated through an indirect pathway, where DCs are firstly stimulated by PAMPs (pathogen associated molecular patterns) inducing their IL-12 production, which in turn activates NKT cells (Zajonc and Girardi, 2015).

NKT cells play an important role in autoimmunity and cancer and they also protect against intracellular pathogens, mainly through their IFN- γ production (Terabe et al., 2008; Tsuji, 2006; Ranson et al., 2005). Thus, IFN- γ produced by liver NKT cells was shown to control intravenous infections with *Leishmania donovani* (Amprey et al., 2004). One of the *Leishmania* molecules capable of activating NKT cells is LPG, the most abundant glycolipid covering the surface of the parasite in the promastigote stage of the life cycle (Späth et al., 2003). LPG consists of four domains: (i) a con-

Abbreviations: LPG, lipophosphoglycan; DC, dendritic cells; TCR, T-cell receptor; α -GalCer, α -galactosylceramide; PAMPs, pathogen associated molecular patterns; BMDC, bone marrow-derived dendritic cells.

* Corresponding author.

E-mail address: becker@unam.mx (I. Becker).

served GPI anchor [1-*O*-alkyl-2- lyso-phosphatidylinositol (PI)]; (ii) a core [Gal(α 1-6)Gal(α 1-3)Gal β (β 1-3)[Glc(α 1)PO4]Man(α 1-3)Man(α 1-4)-GlcN(α -1) heptasaccharide]; (iii) disaccharide repeats [Gal(β 1-4)Man (α 1)PO4 units] and (iv) a neutral oligosaccharide forming the terminal (“cap”) (Ibraim et al., 2013). Even though NKT cells have been associated with protection against intravenously administered *Leishmania*, their role in skin infections with *Leishmania mexicana* has not been addressed, nor has the activation pathway after LPG stimulation been defined.

The aim of this study was to analyze the activation pathway induced by *Leishmania mexicana* LPG in NKT cells and to comparatively study the cytokine production and infiltration kinetics of NKT cells in lymph nodes draining *Leishmania mexicana*-infected lesions of BALB/c and C57BL/6 mice.

We here demonstrate that *Leishmania mexicana* LPG activates NKT cells mainly through the indirect pathway involving TLR2 stimulation in DC by *Leishmania* LPG, the magnitude of which differs between mouse strains. We furthermore show differences in kinetics and cytokine production of NKT cells in lymph nodes from C57BL/6 and BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male BALB/c and C57BL/6 mice, aged 8–10 weeks, were bred and housed at the animal facilities of the Unidad de Investigación en Medicina Experimental of the Medical School, UNAM, and their handling was done following the National Ethical Guidelines for Animal Health NOM-062-ZOO-1999 and the guidelines recommended for animal care by the Ethical Committee of the Medical School of the UNAM. The animals were kept in pathogen-free micro-isolation cages and received water and food *ad libitum*.

2.2. *Leishmania mexicana* infections

L. mexicana promastigotes were grown in 199 culture medium (Invitrogen Cat. 12350039), supplemented with 10% FBS at 26 °C. After 5 days of culture, promastigotes were harvested in the stationary growth phase. Anesthetized BALB/c and C57BL/6 mice were infected subcutaneously in the earlobe dermis with 1×10^5 parasites suspended in 5 μ L isotonic saline solution. On days 1, 3, 5 and 7 post-infection, mice were sacrificed by cervical dislocation.

2.3. Monitoring of lesion size

A comparative study of earlobe lesions was made between BALB/c and C57BL/6 mice infected with 1×10^5 parasites throughout 8 weeks of evolution. Lesion size was evaluated using a Vernier.

2.4. Limiting dilution analysis of parasite burden

Parasite load was determined using the quantitative Limiting Dilution Assay (LDA) described by Titus et al. [15]. Infected ears were aseptically removed from infected BALB/c and C57BL/6 mice. Homogenized tissues were diluted in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat inactivated FBS (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 100 U penicillin/ml and 100 mg/ml streptomycin. The samples were serially diluted into 96-well plates containing biphasic blood agar (Novy-Nicolle-McNeal) medium and incubated at 26 °C during one week. The wells showing parasite growth were registered according to specific dilutions and parasite burdens of tissues were calculated.

2.5. NKT cell count in lymph nodes

NKT cells were comparatively analyzed in the cervical lymph nodes closest to the infection sites in both mouse strains. The cervical lymph nodes were aseptically removed and placed in a Petri dish containing cold PBS. The tissue was disrupted in a 100 μ m nylon cell strainer (BD Falcon) and the isolated cells were centrifuged at $800 \times g$ during 10 min at 4 °C. Cells (1×10^6) were suspended in RPMI supplemented with 10% FBS, incubated with 1 μ g/ml monensin (00-4505-51 e-Bioscience) during 2 h and stained for FACS analysis. NKT-cell counts were made on days 1, 3, 5 and 7 post-infection. On the day of their peak increase, IFN- γ and IL-4 were analyzed by flow cytometry in purified NKT cells of both mouse strains.

2.6. NKT-cell enrichment from spleen cells

Spleen cells were separated by Ficoll-Hypaque gradient (Sigma) and mononuclear cells were washed twice with PBS. T cells were purified using a Pan T-cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). This method yields a cell suspension enriched in NKT cells (Lotter et al., 2009).

2.7. Lipophosphoglycan purification

LPG was purified from *L. mexicana* promastigotes grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS at 26 °C. Parasites were harvested on day 5, which corresponded to the stationary culture phase. LPG was purified from 10^{10} promastigotes as described in the literature (McConville et al., 1987) with some modifications. Briefly, the parasites were centrifuged at $3200 \times g$, the supernatant was removed and the pellet was extracted with chloroform/methanol/water (1:2:0.5; v/v) for 2 h at RT. The insoluble material was used for LPG extraction with 9% 1-butanol in water (2×50 ml) and the pooled supernatants were vacuum dried. LPG was purified from this fraction by octyl-sepharose chromatography in HPLC using a 1-propanol gradient (5–60%) in 0.1 M ammonium acetate. The preparations were negative for the presence of endotoxin using the *Limulus* sp. amoebocyte lysate assay (E-Toxate Kit; Sigma). Polymyxin B (5 g/ml) was also used to confirm the absence of contaminating LPS. A sample was analyzed for protein contaminants by SDS-PAGE with silver staining. The preparation was devoid of protein contaminants.

2.8. Bone marrow-derived dendritic cells (BMDC)

Bone marrow was flushed from the femurs and tibiae of eight-week old C57BL/6 and BALB/c mice and plated in 100 mm bacteriological Petri dishes (Falcon) at a concentration of 2×10^6 leukocytes in 10 ml of medium. Cells were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% heat-inactivated FBS (endotoxin tested), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 50 μ g 2-mercaptoethanol (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 25 mM HEPES buffer, and 24 mM NaHCO₃ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Complete medium was supplemented with 10% GM-CSF-containing supernatant from X-63 cell line transfected with the murine GM-CSF gene, shown to be equivalent to 200 U/ml of GM-CSF (Zal et al., 1994). The X-63 cell line was kindly donated by Dr. Brigitta Stockinger (Medical Research Council, Mill Hill, London, UK). On day 3 of culture, 10 ml of GM-CSF-containing medium were added to each dish and on day 6, 10 ml of the culture medium was replaced with fresh GM-CSF-containing medium. On day 8, non-adherent cells were harvested, centrifuged and suspended in complete RPMI medium. Flow cytometry showed that cells were 85% CD11c+ pure.

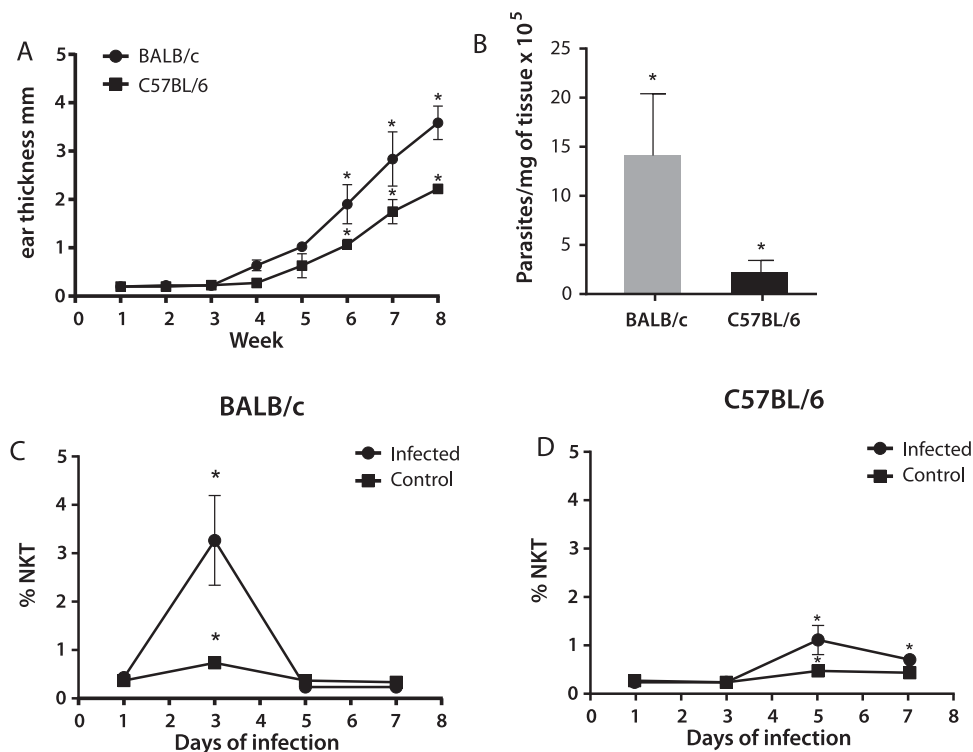


Fig. 1. Evolution of earlobe lesions and analysis of frequency of NKT cells in cervical lymph nodes. The magnitude of infection was assessed by measuring the swelling of the infected earlobes (A) and by quantifying the parasite burden in 4 mice of both mouse strains (B) throughout 8 weeks of infection. The frequency of the NKT cells was measured by flow cytometry in cells of cervical lymph nodes closest to the site of infection of BALB/c (C) and C57BL/6 (D) mice on the days 1, 3, 5 and 7. The close circles show the percentage of NKT cells during infection and closed squares show the controls inoculated with saline solution. Mean \pm SD is shown. * $p \leq 0.05$ was considered significant.

2.9. Co-culture of DC and NKT cells with in vitro cytokine quantitation

1.5×10^5 DCs were stimulated with $10 \mu\text{g/ml}$ *L. mexicana* LPG or $100 \text{ ng } \alpha\text{GalCer}$ (KRN7000 Funakoshi co., ltd, Tokyo, Japan) in 96-well plates (Corning) during 24 h, after which TNF- α and IL-12p70 were quantified in the supernatants by ELISA. Thereafter, enriched splenic NKT cells (1.5×10^6) were added to the wells during 48 h, and IFN- γ and IL-4 were quantified in the supernatants of the co-culture of DC and enriched NKT cells by ELISA.

2.10. Stimulation of enriched NKT cells

In an attempt to clarify whether the activation pathway of enriched NKT cells was induced by IL-12 secreted by DC, 1.5×10^6 enriched NKT cells from C57BL/6 mice were stimulated *in vitro* with either 5 ng IL-12p70 (19361 V BD Pharmingen), $10 \mu\text{g/ml}$ *L. mexicana* LPG or $100 \text{ ng } \alpha\text{GalCer}$ (KRN7000 Funakoshi co., ltd, Tokyo, Japan) during 48 h. IFN- γ was quantified in supernatants of enriched NKT cells by ELISA and flow cytometry.

2.11. Flow cytometry

Stimulated and non-stimulated DC were blocked with anti-Fc (14-0161-85 eBioscience), and stained with anti-CD11c in PE (557401 BD), anti-CD1d-FITC (123508 BioLegend), anti-TLR2 in Alexa Fluor 647 (121810 BioLegend), anti-CD86 in PE-Cy7 (105013 BioLegend), anti-CD40 in APC and analyzed in a FACS CANTO II BD, using DIVA software. Lymph node cells were blocked with anti-Fc

and NKT cells were stained with Dimeric Mouse CD1d:Ig (557599 BD) coupled to $\alpha\text{-GalCer}$ and marked with secondary antibody in PE (550083 BD), as described by the manufacturer.

Production of cytokines IFN- γ (505806 BioLegend) and IL-4 (557728 BD) was analyzed on the day of the highest increase of NKT-cell numbers in cervical lymph nodes of BALB/C and C57BL/6 mice. NKT-cell intracellular staining was carried out with anti-IFN- γ in FITC and anti-IL-4 in FITC in two different cell suspensions, after using citofixcitoperm and permwash (BD). The cells were analyzed by FACS CANTO II BD and DIVA software.

2.12. Co-localization of LPG and TLR2 in DC

To analyze whether the activation of DC by *Leishmania mexicana* LPG was through TLR2 stimulation, DC were pulsed with LPG for 3 h. The cells were washed with PBS and blocked with mouse anti-Fc diluted 1:10 during 30 min at 4°C . After two washings, they were stained with anti-TLR2 in Alexa Fluor 647 (121810 BioLegend) and anti-LPG mab (generated in our laboratory against *L. mexicana* LPG) diluted 1:50 during 30 min at 4°C . After two washings with PBS, the LPG antibody was stained with a secondary anti-mouse anti-IgG FITC (DAKO F-261) and fixed with 2% paraformaldehyde during 30 min at 4°C . The negative control for the LPG stain on stimulated DC cells consisted in using the secondary antibody anti-IgG FITC (DAKO F-261), in the absence of the primary anti-LPG. As negative control for TLR2, the isotype control was used. Images were analyzed by confocal microscopy (Leica TCS SP5).

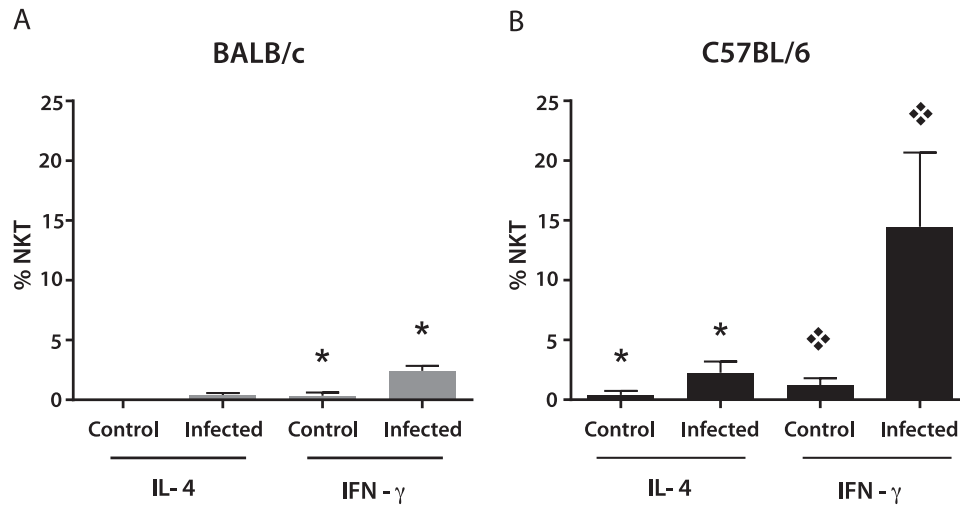


Fig. 2. Percentage of NKT cells producing IFN- γ and IL-4 in cervical lymph nodes of BALB/c and C57BL/6 mice infected with *L. mexicana*. The frequency of NKT cells in the cervical lymph nodes closest to the site of infection that produce IFN- γ and IL-4 was measured on the days of their peak increase: (A) BALB/c mice on day 3 of infection and (B) C57BL/6 mice on the day 5 of infection. Controls were inoculated with saline solution. We used four mice for each experiment. The bars represent data of three separate experiments. Mean \pm SD is shown. * $p \leq 0.05$ was considered significant.

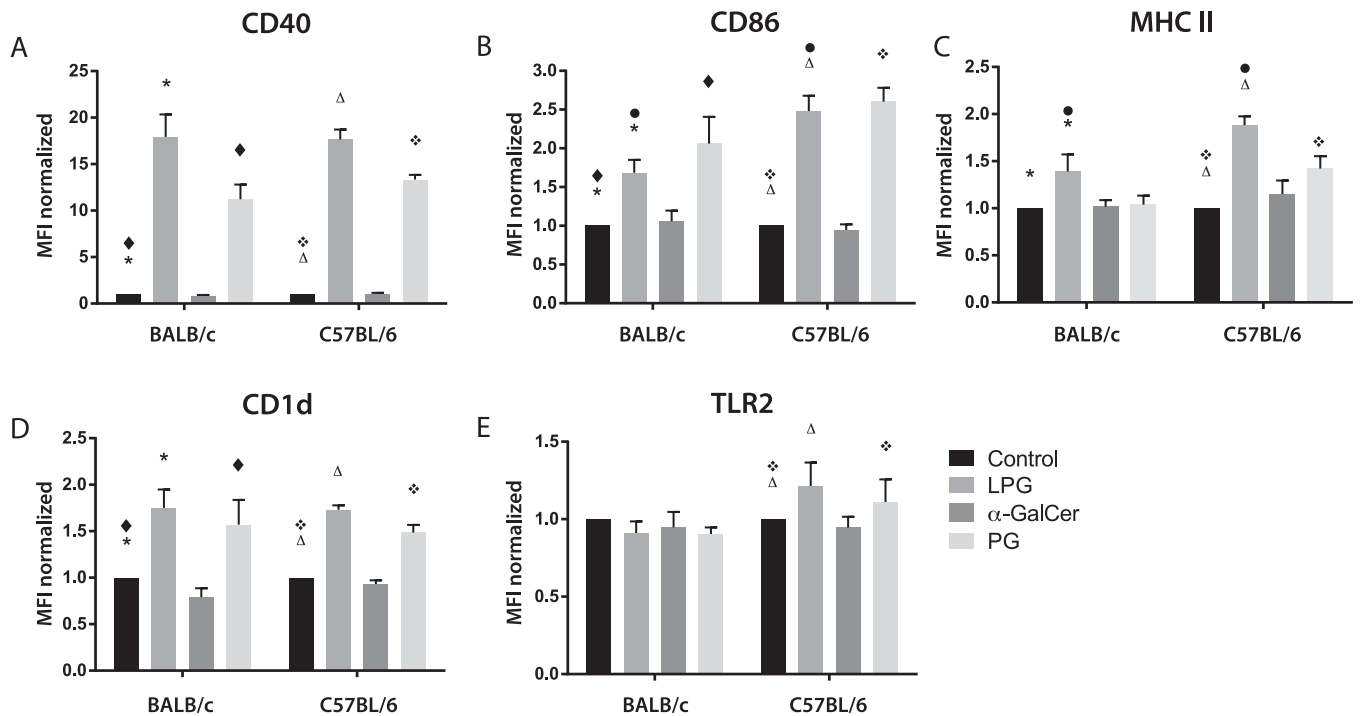


Fig. 3. DC surface markers after stimulation. 1.5×10^5 DC were pulsed with LPG, PG or α -GalCer for 24 h. Non-stimulated cells were used as controls. Mean fluorescence was measured for CD40 (A), CD86 (B), MHCII (C), CD1d (D) and TLR2 (E). Bars represent normalized data of four separate experiments. Mean \pm SD is shown. * $p \leq 0.05$ was considered significant.

2.13. Total protein extraction and immunoblotting

In order to analyze whether LPG stimulation of DC was mediated through TLR2, a kinetic analysis of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ phosphorylation was done in DC of both mouse strains stimulated with LPG. Total protein extract was obtained from 5×10^5 DC of BALB/c and C57BL/6 mice which had been incubated with $10 \mu\text{g/ml}$ *L. mexicana* LPG or $10 \mu\text{g/ml}$ PG (Peptidoglycan, 77140 Fluka) as positive control, during 5, 15, 30, 60, 90 and 120 min. Cells were washed twice with PBS and lysed in $50 \mu\text{l}$ of RIPA modified buffer for 30 min. Cellular extracts were centrifuged at $10\,000 \times g$ for 10 min at 4°C and the

supernatants were collected. Total protein extracts were quantified with DC Protein Assay Reagents Package.

For Western-blotting, $10 \mu\text{g}$ of total protein were analyzed by SDS-PAGE in 10% acrylamide gels. The proteins were transferred onto Immobilon-P membranes using a semidry electroblotting apparatus. The membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffer saline-Tween 20 (TBST: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, and 0.05% Tween 20) for 1 h at RT. Immunoblotting was done with anti- $\text{pI}\kappa\text{B}\alpha$ (Cell signaling, 9246) diluted 1:1000 in BSA 1% overnight with constant shaking at 4°C . HRP anti-mouse IgG (Cell signaling, 7076) diluted 1:2000 in 5% non-fat dry

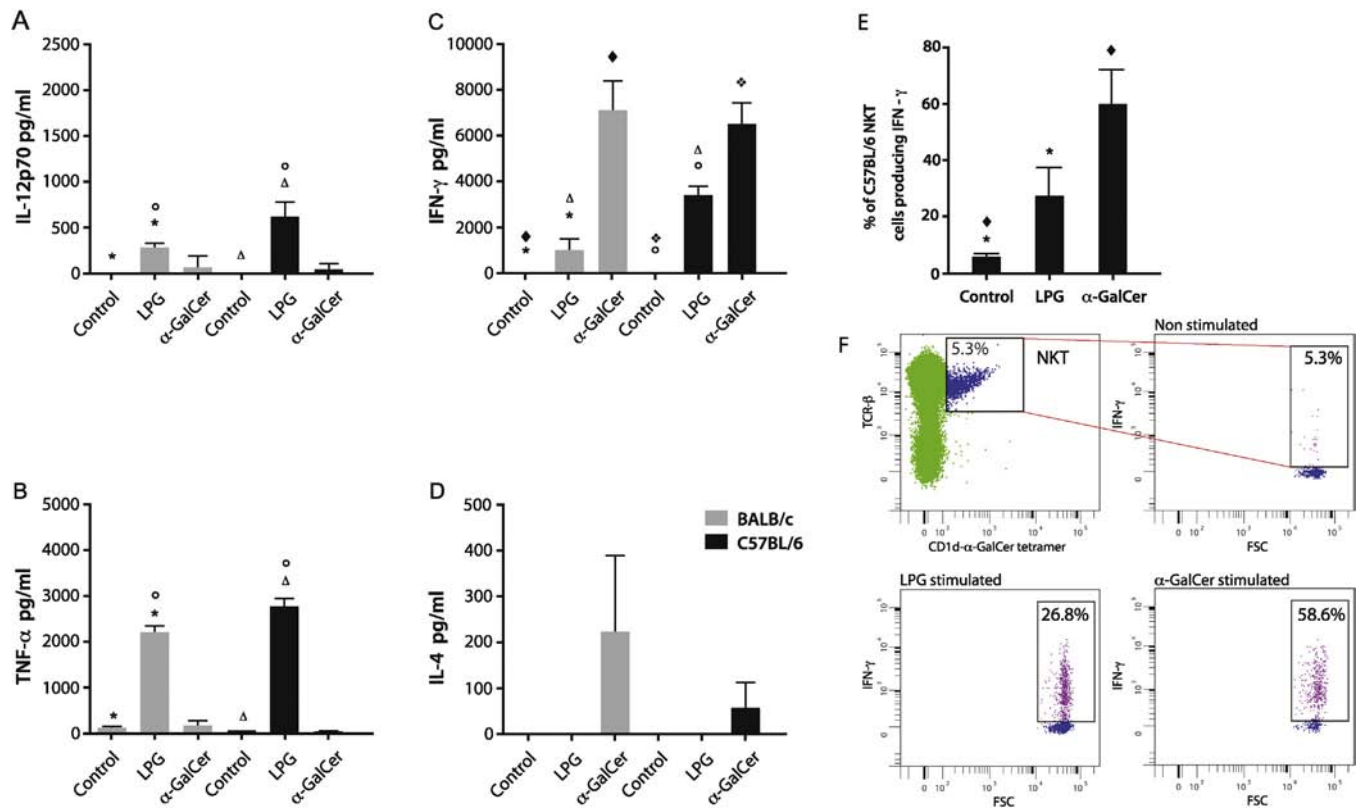


Fig. 4. Cytokine production by DC and NKT cells. 1.5×10^5 DC were pulsed with LPG or α -GalCer for 24 h, leading to production of IL-12p70 (A) and TNF- α (B) by DC. Pulsed DC were co-incubated for 48 h with 1.5×10^6 NKT cells, which induced IFN- γ (C) and IL-4 (D) production by NKT cells. IFN- γ production by NKT cells of C57BL/6 mice was also assessed by flow cytometry after 24 h of stimulation. Bars represent the percentage of cytokine producing cells (E) and dot plots show the NKT population and their IFN- γ production (F). Non-stimulated cells were used as controls. The bars represent data of four separate experiments. Mean \pm SD is shown. * $p \leq 0.05$ was considered significant.

milk was used as secondary antibody, and incubated at RT for 1 h with shaking. Blots were developed using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) and exposed to X-ray films. After being developed, membranes were washed with TBST overnight, blocked with 5% non-fat dry milk and incubated with anti-actin (sc-1616) diluted 1:1000 in BSA 1% for 3 h at RT. Membranes were washed and incubated for 1 h with HRP bovine anti-goat IgG (sc-2350) diluted 1:10 000 in 5% non-fat dry milk. Blots were developed as described.

2.14. Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SD (standard deviation of the mean). Comparisons between experimental groups were performed using Mann–Whitney *U*-test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant, using Prism 6 for Windows. Three or more independent experiments were analyzed.

3. Results

3.1. Evaluation of earlobe lesions in BALB/c and C57BL/6 mice infected with *L. mexicana*

The comparative study of earlobe infections carried out during 8 weeks showed differences between both mouse strains, which became significant after 6 weeks of infection. After 8 weeks, earlobe lesions of C57BL/6 mice showed a lower increase, as compared to BALB/c. Furthermore, parasite load was approximately 5X less in C57BL/6, as compared to BALB/c mice after 8 weeks of infection (Fig. 1A, B).

3.2. Percentage of NKT cells in cervical lymph nodes closest to the site of *L. mexicana* infections in BALB/c and C57BL/6 mice

Differences were observed in the percentage of NKT cells and in the kinetics of cervical lymph node infiltration between both mouse strains. In BALB/c mice, NKT cells increased abruptly, reaching a peak (4.5 X) on day 3 of infection (3.2%), with regard to control mice that had been inoculated with saline solution (0.7%) ($p < 0.05$) (Fig. 1C). By day 5 post-infection, the NKT cell numbers had diminished again to basal levels. In contrast, in C57BL/6 mice, NKT cells reached their maximum increase (2.3 X) on day 5 of infection (1.1%) (Fig. 1D). It is noteworthy that by day 7 this mouse strain still showed 1.6 times (0.7%) the values registered for non-infected control mice (0.46%) ($p < 0.05$). Taken together, these data show that in BALB/c mice, NKT cell numbers increase significantly, achieving a rapid and transient peak at day 3 post-infection, followed by a quick descent to basal levels. In contrast, C57BL/6 mice show a much lower and more retarded increase in NKT cells in draining lymph nodes, followed by a more gradual decrease, lasting 2 days.

3.3. IFN- γ production by NKT cells in cervical lymph nodes

The cytokine analysis (IFN- γ and IL-4) in NKT cells of cervical lymph nodes was made on the day of their peak increase, which was on day 3 in BALB/c mice and day 5 in C57BL/6 mice. Both mouse strains showed that *Leishmania mexicana* infections induces IFN- γ and IL-4 production by NKT cells. Yet in BALB/c mice only 2.5% of NKT cells produced IFN- γ ($p \leq 0.05$) and 0.5% produced IL-4 (Fig. 2A), which contrasts with C57BL/6 mice where enhanced numbers of NKT cells produced IFN- γ (14.6%) and IL-4 (2.5%) (Fig. 2B).

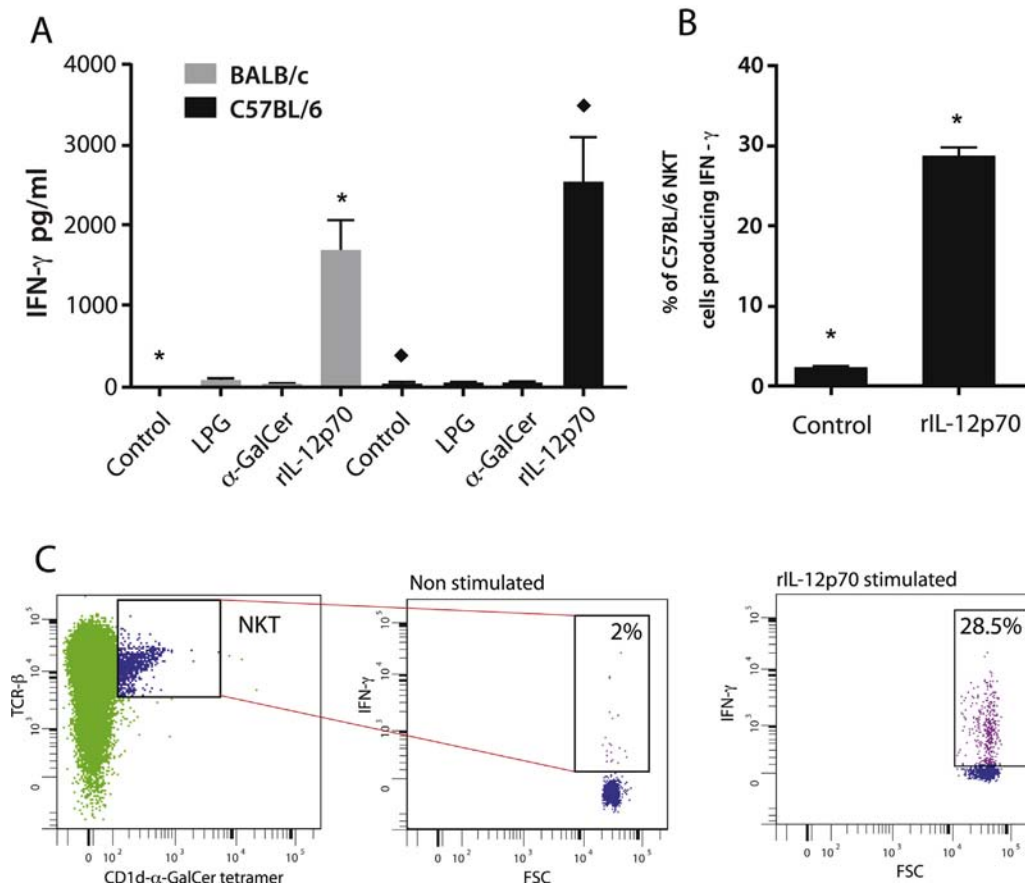


Fig. 5. IFN- γ production by NKT cells after IL-12p70 stimulation. IFN- γ production by NKT cells of C57BL/6 mice was assessed after direct stimulation with LPG, α -GalCer or IL-12p70 during 48 h (A). IFN- γ production by NKT cells stimulated with IL-12p70 was further corroborated by flow cytometry. Bars represent the percentage of cytokine producing cells (B) and dot plots show IFN- γ production by populations of NKT cells (C).

3.4. *In vitro* cytokine production by NKT cells activated by dendritic cells

We then analyzed whether *in vitro* stimulation of DC with *L. mexicana* LPG induces cytokine production by NKT cells. For this, DC cells of both mouse species were firstly matured by incubation with LPG, which led to their increase of co-stimulatory molecules CD86 and CD40. Although both mouse strains showed enhanced expression of the maturation marker CD40 (Fig. 3A), the expression of CD86 was significantly higher in DC of C57BL/6, as compared to BALB/c mice ($p < 0.05$) after LPG stimulation (Fig. 3B). Furthermore, LPG stimulation also enhanced the expression of antigen presenting molecules MHC II and CD1d in DC of both mouse strains, albeit MHC II was more significantly expressed in C57BL/6 mice ($p < 0.05$) (Fig. 3C, D). LPG stimulation augmented TLR2 expression (Fig. 3E) only in DC of C57BL/6 mice. Control studies using PG, a positive control for TLR2, showed equally enhanced expressions of TLR2, co-stimulatory molecules and antigen presenting molecules in DC of both mouse strains.

The cytokine analysis showed that DC of both mouse strains stimulated with LPG during 24 h secrete IL-12p70 and TNF- α , albeit in different quantities: DC of C57BL/6 mice produced 2.2 times more IL-12p70 and 1.25 times more TNF- α (Fig. 4A, B), as compared to BALB/c mice ($p < 0.05$). After adding NKT cells to stimulated DC during 48 h, an elevated production of IFN- γ (3667 pg/ml) was observed in NKT cells of C57BL/6 mice (Fig. 4C), whereas NKT of BALB/c only secreted 1005 pg/ml, which is approximately 3.6 times less, as compared to C57BL/6 mice ($p < 0.05$). A positive control with α -GalCer was included to analyze whether the differential

cytokine production was antigen specific. DCs incubated with α -GalCer induced an equally strong IFN- γ production by NKT cells of both mouse strains: 6249 pg/ml in C57BL/6 and 6260 pg/ml in BALB/c mice. Thus, the elevated IFN- γ production by NKT cells of C57BL/6 seems specifically related to LPG stimulation of DC. No IL-4 production was found in NKT cells of either mouse strain after their incubation with LPG-stimulated DC (Fig. 4D).

By flow cytometry we were able to corroborate that NKT cells of C57BL/6 were the producers of IFN- γ after they were incubated with DC that had previously been stimulated with LPG or α -GalCer (Fig. 4E, F).

3.5. IFN- γ production after stimulation of NKT cells with IL-12p70

In order to demonstrate that IFN- γ production was induced by IL-12p70 and not by direct stimulation with LPG or α -GalCer, we stimulated NKT cells with LPG, α -GalCer or rIL-12p70 for 48 h. Our results show that neither LPG nor α -GalCer induced IFN- γ production by NKT cells. In contrast, rIL-12p70 stimulation induced IFN- γ production by NKT cells (Fig. 5A), which was corroborated by flow cytometry done after 2 h of stimulation (Fig. 5B, C). These data show that IL-12p70 produced by DC after stimulation with LPG induces IFN- γ production by NKT cells (Fig. 4A, C).

3.6. Co-localization of LPG and TLR2 in DC

We then analyzed whether the LPG-induced secretion of IL-12p70 by DC was caused by activation of TLR2. Through confocal microscopy we analyzed co-localization of LPG and TLR2 in DC after

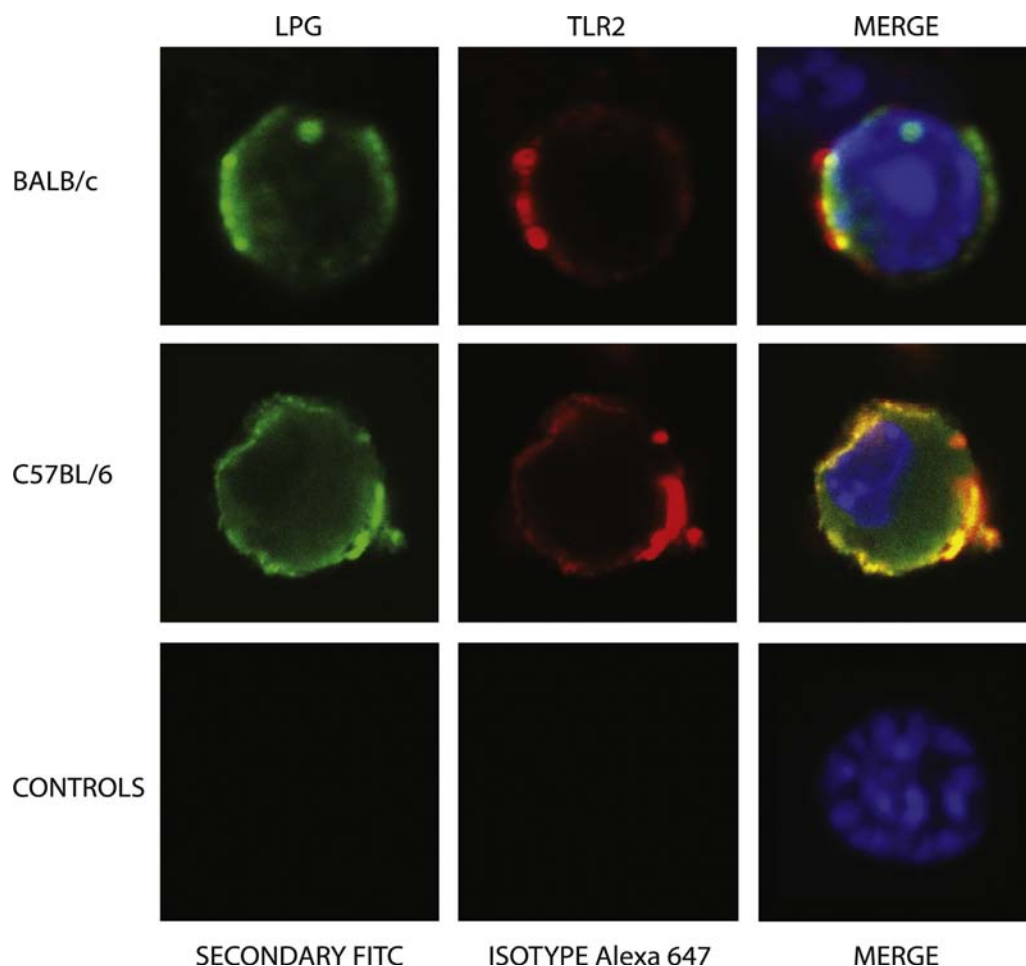


Fig. 6. Co-localization of LPG with TLR2. Dendritic cells were stimulated with LPG for 3 h and stained with anti-TLR2 and anti-LPG antibodies. The left panel (green) shows the LPG stain, the middle panel (red) shows the TLR2 stain and the right panel shows the merge of both stains in yellow. The nucleus is stained with DAPI (blue). For controls, staining was carried out using only secondary antibodies in the absence of primary antibodies. Isotype controls were done for anti TLR2 staining, all of which are shown the control panels. The photographs were taken with a confocal microscopy. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the cells had been stimulated during 3 h with LPG. We found a merged image of LPG (stained with FITC) and TLR2 (stained with Alexa Fluor 647), showing co-localization of both molecules (Fig. 6).

3.7. Phosphorylation of *IkB α* in DC

In order to prove that LPG stimulation of DC was mediated through TLR2, a kinetic analysis of *IkB α* phosphorylation was done in DCs of both mouse strains stimulated with LPG. *IkB α* phosphorylation was observed in both mouse strains although at different times: in BALB/c mice the phosphorylation was observed after 5 min of LPG stimulation, which later decreased to basal levels. In contrast, in C57BL/6 mice the phosphorylation of *IkB α* initiated after 15 min of LPG stimulation and persisted throughout the 120 min that the analysis lasted. The positive control for TLR2 stimulation with PG showed a similar kinetics in both mouse strains: phosphorylation of *IkB α* began after 5 min, diminished transiently after 15 min and thereafter increased again, remaining unchanged up to the 120 min that the study lasted (Fig. 7).

4. Discussion

We here comparatively analyzed the response of NKT cells from two mouse strains to *Leishmania mexicana* infections as well as to *in vitro* stimulation with purified LPG, including an analysis of the

activation pathway. Previous studies had reported that *Leishmania donovani* LPG was presented by CD1d in DCs, leading to the activation of NKT cells. This activation pathway is considered the direct activation pathway (Juno et al., 2012). We now show that NKT activation by *Leishmania mexicana* LPG occurs primarily through the indirect activation pathway that initiates with the stimulation of TLR2 in DCs, leading to production of IL-12p70 and enhanced expression of co-stimulatory molecules CD86 and CD40 in DCs. These combined events then activate NKT cells, inducing their IFN- γ production. The indirect activation pathway of NKT cells has been related to their IL-12 receptor (Rossjohn et al., 2012). Our data now show that the indirect activation pathway of NKT cells by LPG only leads to their IFN- γ production, which contrasts with the direct activation pathway induced by α -GalCer, which had been shown to lead to both IFN- γ and IL-4 productions by NKT cells (Hayakawa et al., 2003).

Another characteristic feature of α -GalCer is that it does not induce maturation of DC after direct stimulation. Maturation of DC occurs only after contact with NKT cells and involves binding of CD40L (Fujii et al., 2007). Our data are in accordance with the literature, since stimulation with α -GalCer did not induce overexpression of co-stimulatory molecules in DC.

With these results, we are tempted to speculate that the characteristics of cytokine production in NKT cells is related to their activation pathway: the indirect activation of NKT cells, induced

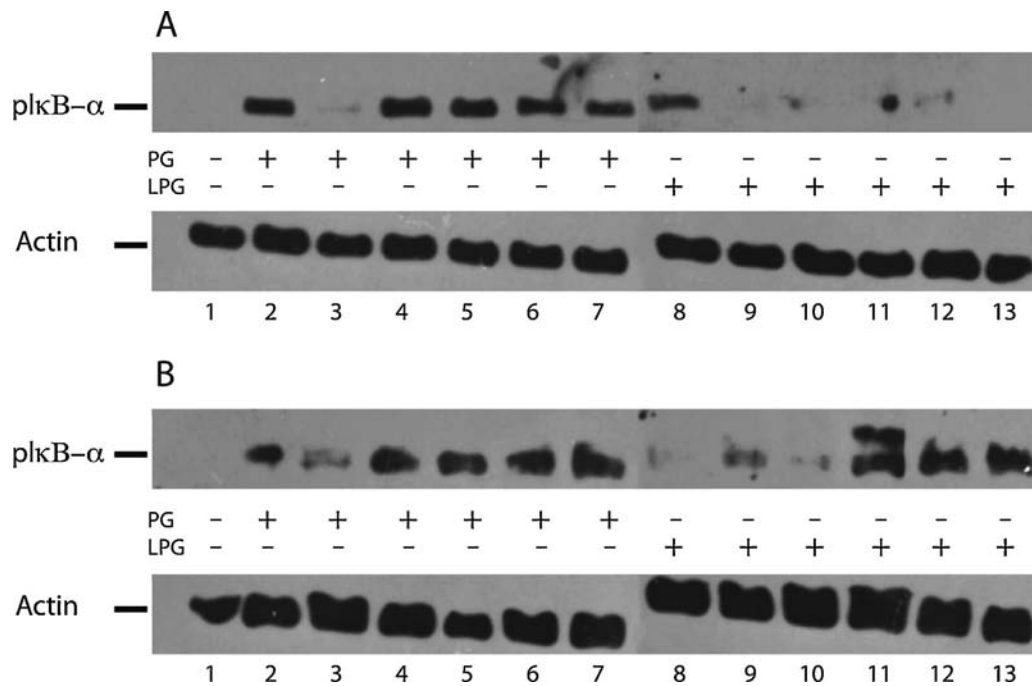


Fig. 7. Activation of TLR pathway. Phosphorilation of plkB α was analyzed in non-stimulated and PG- or LPG-stimulated DC of BALB/c (A) and C57BL/6 (B) mice at 5, 15, 30, 60, 90 and 120 min. Lanes 1: non-stimulated; lanes 2: PG 5'; lanes 3: PG 15'; lanes 4: PG 30'; lanes 5: PG 60'; lanes 6: PG 90'; lanes 7: PG 120'; lanes 8: LPG 5'; lanes 9: LPG 15'; lanes 10: LPG 30'; lanes 11: LPG 60'; lanes 12: LPG 90'; lanes 13: LPG 120'. A representative immunoblot is shown.

by IL-12 from DC after stimulation of their TLR2 receptors, leads to a polarized production of IFN- γ , whereas the direct activation pathway mediated by antigen presentation through CD1d in DC and recognition by invariant T-cell receptors in NKT cells, leads to production of both cytokines IFN- γ and IL-4 (Zajonc and Girardi, 2015).

Despite having shown that LPG activates NKT cells mainly through the indirect pathway, we cannot rule out some participation of the direct pathway, since LPG stimulation enhanced the expression of CD1d in DC of both mouse strains, although this does not necessarily imply that the direct pathway is activated.

The activation of TLR2 by *L. mexicana* LPG has previously been shown by our group (Becker et al., 2003). Additionally, various reports in literature have reported that LPG has the properties of a PAMP, capable of inducing maturation and activation of DC cells, leading to their enhanced expression of co-stimulatory molecules together with IL-12 and TNF- α production (Aebischer et al., 2005). Our study now shows that *L. mexicana* LPG not only stimulates DC, enhancing their CD86 and CD40 expressions, as well as their IL-12p70 production, it furthermore leads to the indirect activation of NKT cells.

Although we had previously shown that *L. major* LPG activates the TLR2 signaling pathway, our current study now enables us to add novel data showing that TLR2 co-localizes with *L. mexicana* LPG and leads to phosphorylation of plkB α , a molecule related to the TLR signaling pathway (Cañeda-Guzmán et al., 2014). Together, these data provide evidence that *L. mexicana* activates DC through TLR2, which ultimately leads to nuclear translocation of NF- κ B and transcription of inflammatory mediators such as IL-12 and TNF- α .

Our hypothesis that LPG activates NKT cells mainly through the indirect activation pathway is strengthened by the lack of experimental evidence of a direct activation pathway. To the best of our knowledge, LPG presentation by CD1d in DC has not been conclusively demonstrated. LPG has only been shown to compete with α -GalCer for the tetramer-binding site in recombinant CD1d molecules. Yet no NKT cell activation was evidenced after incubation with tetramers coupled to LPG, which contrasts with

the activation observed after using tetramers coupled to α -GalCer (Amprey et al., 2004).

It is noteworthy, that activation of DC cells by *L. mexicana* LPG differed between the two mouse strains. It was more elevated in C57BL/6 mice, which also correlated with the enhanced MHC II, CD86 and TLR2 expressions, as well as with the augmented cytokine production. Additionally, the LPG-induced phosphorylation of plkB α lasted longer in DC of C57BL/6 mice. This differential response seems antigen specific, since stimulation with PG showed no difference in the phosphorylation patterns between the two mouse strains. Our data are in accordance with the literature, where DC stimulated with TLR2 agonists, such as zymosan and lipoproteins showed a more elevated IL-12 production in C57BL/6, as compared to BALB/c mice (Liu et al., 2002).

With these data we were further interested in analyzing whether the differential response towards LPG observed between the two mouse strains *in vitro* was also evidenced in NKT cells during *L. mexicana* infections of C57BL/6 and BALB/c mice. Our results show striking differences in NKT cell numbers and their cytokine production between both mouse strains. The percentage of NKT cells present in the draining lymph nodes during the first week of the infection in BALB/c mice increased only transiently during day 3 post-infection and diminished again on day 5. In contrast, the increase in the percentage of NKT cells in the draining lymph nodes of C57BL/6 mice was delayed by two days, appearing on day 5 post-infection, remaining elevated throughout day 7, on which the experiment was finalized. It is noteworthy, that NKT cells of C57BL/6 mice also produced more IFN- γ and IL-4, as compared to BALB/c mice. We hypothesize that the prolonged presence of NKT cells in lymph nodes of C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana* possibly relates to their more elevated cytokine production. Our data are in accordance with the literature showing IFN- γ production by liver NKT cells in C57BL/6 mice infected with *L. donovani* (Amprey et al., 2004).

It is noteworthy that the cytokines found during *in vivo* studies differed from the ones found *in vitro*. This is possibly related to the fact that *in vivo* studies were carried out with the whole parasite,

possessing multiple antigens capable of activating various stimulation pathways in NKT cells and therefore able to produce multiple cytokines (IFN- γ and IL-4). In contrast, *in vitro* studies were done with a specific antigen (LPG) known to activate the TLR2 pathway, which induced a different cytokine profile (IFN- γ). This observation on specific parasite molecules leading to differential activation pathways for NKT cells is in accordance with a study done with a *L. donovani* glycosphingolipid, a molecule presented by CD1d in DC, which proved to lead to the direct activation pathway of NKT cells (Amprey et al., 2004).

Taken together, our data now show that *L. mexicana* LPG activates NKT cells primarily through the indirect pathway that initiates with TLR2 stimulation in DC, thereby enhancing their MHC II, CD86, TLR2 expressions and IL-12p70 production, which was more elevated in C57BL/6 mice. This mouse strain also showed prolonged phosphorylation of pI κ B α in DC. Together, these events correlate with the higher IFN- γ production by NKT cells of this mouse strain. The NKT-cell response also differed between both mouse strains after infection with *L. mexicana* promastigotes. Thus, C57BL/6 mice showed a more elevated percentage of NKT cells in lymph nodes close to the infection sites, which remained there for a longer period of time and showed a higher IFN- γ and IL-4 production, as compared to BALB/c mice.

5. Conclusion

We conclude that *L. mexicana* LPG activates NKT cells importantly through the indirect pathway, which was more pronounced in C57BL/6 mice and possibly correlates with the prolonged signaling during the TLR2 activation pathway. With these data we propose that IFN- γ production by NKT cells induced by *Leishmania mexicana* LPG possibly favors protection during the acute and innate phase of the infection. These results enhance the importance of studying the indirect activation pathway in NKT cells during *Leishmania* infections, since different parasite strains can exert diverse immunomodulation in DC, thereby altering the NKT cell response that can influence the disease outcome.

Conflict of interest

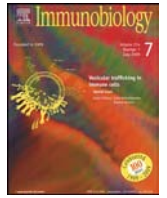
The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

Jaime Zamora Chimal is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship 263920 from CONACyT. This project was financed by PAPIIT IN217515 and CONACyT 221405. We thank Omar Agni García Hernández for technical help in editing the figures and M.C. Rocely Buenaventura Cervantes Sarabia for her help with parasite load assessment.

References

- Aebischer, T., Bennett, C.L., Pelizzola, M., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Urbano, M., Capozzoli, M., Luchini, A., Ilg, T., Granucci, F., Blackburn, C.C., Ricciardi-Castagnoli, P., 2005. A critical role for lipophosphoglycan in proinflammatory responses of dendritic cells to *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Immunol.* 35, 476–486, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200425674>.
- Amprey, J.L., Im, J.S., Turco, S.J., Murray, H.W., Illarionov, P.a., Besra, G.S., Porcelli, S.a., Späth, G.F., 2004. A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 200, 895–904, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20040704>.
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L.G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A.P., Cabrera, N., González, A., Maldonado, C., Isibasi, A., 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130, 65–74, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00160-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00160-9).
- Bendelac, A., Savage, P.B., Teyton, L., 2007. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 297–336, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711>.
- Cañeda-Guzmán, I.C., Salaiza-Suazo, N., Fernández-Figueroa, E.a., Carrada-Figueroa, G., Aguirre-García, M., Becker, I., 2014. NK cell activity differs between patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana*: a comparative study of TLRs and cytokines. *PLoS One* 9, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112410>.
- Coquet, J.M., Chakravarti, S., Kyriarisoudis, K., McNab, F.W., Pitt, L.a., McKenzie, B.S., Berzins, S.P., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., 2008. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11287–11292, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0801631105>.
- Fujii, S., Shimizu, K., Hemmi, H., Steinman, R.M., 2007. Innate valpha14(+) natural killer T cells mature dendritic cells, leading to strong adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 220, 183–198, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00561.x>.
- Godfrey, D.I., Hammond, K.J.L., Poulton, L.D., Smyth, M.J., Baxter, A.G., 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* 21, 573–583, [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01735-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01735-7).
- Hayakawa, Y., Rovero, S., Forni, G., Smyth, M.J., 2003. Alpha-galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9464–9469, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1630663100>.
- Ibraim, I.C., de Assis, R.R., Pessoa, N.L., Campos, M.A., Melo, M.N., Turco, S.J., Soares, R.P., 2013. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasites Vectors* 6, 54, <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-54>.
- Juno, J.a., Keynan, Y., Fowke, K.R., 2012. Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection. *PLoS Pathog.* 8, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002838>.
- Liu, T., Matsuguchi, T., Tsuboi, N., Yajima, T., Yoshikai, Y., 2002. Differences in Expression of Toll-Like Receptors and Their Reactivities in Dendritic Cells in BALB/c and C57BL/6 Mice 70, 6638–6645. 10.1128/IAI.70.12.6638.
- Lotter, H., González-Roldán, N., Lindner, B., Winau, F., Isibasi, A., Moreno-Lafont, M., Ulmer, A.J., Holst, O., Tannich, E., Jacobs, T., 2009. Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess. *PLoS Pathog.* 5, 1–11, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000434>.
- McConville, M.J., Bacic, a., Mitchell, G.F., Handman, E., 1987. Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8941–8945.
- Metelitsa, L.S., Naidenko, O.V., Kant, a., Wu, H.-W., Loza, M.J., Perussia, B., Kronenberg, M., Seeger, R.C., 2001. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J. Immunol.* 167, 3114–3122, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.167.6.3114>.
- Ranson, T., Bregenholt, S., Lehen, A., Gaillot, O., Leite-de-Moraes, M.C., Herbelin, A., Berche, P., Di Santo, J.P., 2005. Invariant V alpha 14+ NKT cells participate in the early response to enteric *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 175, 1137–1144, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.175.2.1137>.
- Rosjohn, J., Pellicci, D.G., Patel, O., Gapin, L., Godfrey, D.I., 2012. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 845–857, <http://dx.doi.org/10.1038/nri3328>.
- Slauenwhite, D., Johnston, B., 2015. Regulation of NKT cell localization in homeostasis and infection. *Front. Immunol.* 6, 255, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00255>.
- Späth, G.F., Garraway, L.a., Turco, S.J., Beverley, S.M., 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9536–9541, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1530604100>.
- Terabe, M., Berzofsky, J.a., 2008. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv. Cancer Res.* 101, 277–348, [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)00408-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-230X(08)00408-9).
- Tsuji, M., 2006. Glycolipids and phospholipids as natural CD1d-binding NKT cell ligands. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1889–1898, <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6073-z>.
- Zajonc, D.M., Girardi, E., 2015. Recognition of microbial glycolipids by natural killer T cells. *Front. Immunol.* 6, 1–11, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00400>.
- Zal, T., Volkmann, a, Stockinger, B., 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J. Exp. Med.* 180, 2089–2099, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.180.6.2089>.



NKT cells in leishmaniasis

Jaime Zamora-Chimal^a, Joséln Hernández-Ruiz^b, Ingeborg Becker^{a,*}

^a Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Ciudad de México, C.P. 06726, Mexico

^b Laboratorio de Hígado, Pancreas y Motilidad, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Universidad Nacional Autónoma de México, Dirección de Investigación, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Ciudad de México, C.P. 06726, Mexico



ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 November 2016

Accepted 30 November 2016

Available online 5 December 2016

Keywords:

NKT

Leishmania mexicana

Activation pathway

LPG

TLR2

Dendritic cells

CD1d

ABSTRACT

The role of NKT cells in the resistance or susceptibility towards *Leishmania* infections remains to be defined, since controversial data persist. The response of these cells seems to depend on many variables such as the infection site, the number of infecting parasites, the virulence of the strain and the *Leishmania* species. We here revise the activation pathways leading to NKT cell activation. NKT cells can be activated by the direct pathway, in which *Leishmania* glycolipids are presented by CD1d molecules on antigen presenting cells, such as dendritic cells (DC), leading to the secretion of diverse cytokines by NKT. NKT cells can also be activated by the indirect pathway, in which *Leishmania* glycolipids, such as LPG, stimulate TLR2 in DC, inducing their IL-12 production, which in turn activates NKT cells. The review further analyzes the role of NKT cells in disease development, both in humans as in mouse models. Finally we propose the activation of NKT cells for controlling *Leishmania* infections.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

The NKT cells are the link between the innate and adaptive immunity. As innate cells they respond quickly against infections, determining the type and intensity of the adaptive immune response (Slauenwhite and Johnston, 2015). Leishmaniasis, a parasitic disease caused by the protozoan parasite *Leishmania*, is one of the diseases where both innate and adaptive immune responses have been well studied with the aid of mouse models that helped clarify the principles of the adaptive response leading to resistance (Th1) or susceptibility (Th2) (Lohoff et al., 1998). This infection is transmitted by the bite of sand flies, which inoculate the parasites together with saliva components into the mammal host skin (Carregaro et al., 2015). The parasite is phagocytosed by dermal dendritic cells, macrophages and neutrophils, and within parasitophorous vacuoles they transform into amastigotes and divide, thus evading immune recognition (Hermida et al., 2014; Olivier et al., 2005). The interaction between *Leishmania*, macrophages and the adaptive immune response has been well studied, yet infor-

mation on NK and NKT cells remains scarce. In this review we analyse NKT cells and their role in mouse and human leishmaniasis, as well as their use for the development of vaccines and other immunotherapies against *Leishmania*.

2. Immune responses in leishmaniasis

The interaction between *Leishmania* and the mammal host immune response initiates with the parasite recognition by complement and innate receptors such as TLRs (Pandey et al., 2015; Noronha et al., 1998). *In vitro* studies have shown that complement lyses 90% of stationary-phase *L. amazonensis* promastigotes (Noronha et al., 1998). After lysis, parasite antigens are drained to the regional nodes via lymphatics (Lezzi et al., 2006). Parasites that are resistant to complement-mediated lysis are opsonized by the C3b fraction of complement, making them susceptible to phagocytosis through CR1 and CR3 receptors by antigen-presenting cells (Ueno and Wilson, 2012). This type of phagocytosis is considered "silent", since it does not promote an oxidative burst or IL-12 production in the phagocytic cells, thereby limiting macrophage activation as well as the migration of dendritic cells to lymphatic nodes (Gupta et al., 2013). Thus, the activation of T cells in lymph nodes possibly occurs with antigens that drain through lymph (Hermida et al., 2014).

One of the main *Leishmania* antigens is the glycolipid lipophosphoglycan (LPG), which constitutes much of the glycocalyx in the

Abbreviations: LPG, lipophosphoglycan; DC, dendritic cells; α -GalCer, α -galactosylceramide; GIPLs, glycoinositol phospholipids; GSPL, glycosphingophospholipid; GPI, glycosylphosphatidylinositol; PKC, protein kinase C; MAPK, mitogen-activated protein kinase.

* Corresponding author.

E-mail address: becker@unam.mx (I. Becker).

promastigote stage of the parasite. This molecule is relevant during the early stages of the immune response, since it has been shown to inhibit protein kinase C (PKC) and mitogen-activated protein kinase (MAPK), both of which are involved in triggering the oxidative burst in the macrophages (Bhardwaj et al., 2010). Furthermore, LPG binds to TLR2 in human NK cells inducing their IFN- γ production (Becker et al., 2003). In dendritic cells, LPG stimulation leads to IL-12 production and to partial maturation of these cells, increasing their CD86 and MHCII expressions (Aebischer et al., 2005; Argueta-Donohué et al., 2008). Dendritic cells, in turn, orchestrate the activation and differentiation of NKT cells as well as inducing the adaptive immune response.

The infection of C57BL/6 mice with *L. major* has shown that Th1 immune responses resolve the illness mainly by IFN- γ and TNF- α production, which activate iNOS in *Leishmania*-infected macrophages, thereby helping them to eliminate the parasite (Tacchini-Cottier et al., 2012). In contrast, *L. major* infections in BALB/c mice have shown that Th2 responses lead to progression of the disease, mainly due to IL-4 production, reducing inflammatory cytokines and inducing the differentiation of alternative type macrophages which are unable to eliminate the parasite (Tacchini-Cottier et al., 2012; Osorio et al., 2012).

It is known that patients with localized cutaneous leishmaniasis infected with *L. braziliensis* and *L. amazonensis* preferentially show a Th1 cytokine profile and have a good prognosis and illness control (Silveira et al., 2004). The inflammatory infiltrate in these lesions is characterized by the presence of CD4 and CD8 T lymphocytes, IFN- γ messenger RNA (mRNA), IL-10, TNF- α , IL-5, IL-2 and IL-4 together with apoptosis in the lesions (Cáceres-Dittmar et al., 1993; Hernández-Ruiz et al., 2010). In contrast, patients with chronic lesions, such as those of diffuse cutaneous leishmaniasis, show low levels of CD4 and CD8 T lymphocytes in their lesions. Even though these patients have IFN- γ mRNA during the early stages of the disease, they have 4 times more IL-4 than IFN- γ producing CD4 T cells in their peripheral blood. In addition to IL-4 and IL-10 producing cells, these patients harbour exhausted antigen-specific CD8 lymphocytes, showing poor IFN- γ production in response to the parasite and scarce cytotoxic activity towards *Leishmania*-infected macrophages (Cáceres-Dittmar et al., 1993; Hernández-Ruiz et al., 2010).

3. Classification and functions of NKT cells

The NKT cells represent 0.1–0.5% of peripheral blood leucocytes (Godfrey et al., 2000). They are good producers of cytokines IFN- γ , TNF, IL-4, IL-10 and IL-13 (Coquet et al., 2008). Additionally, they have cytotoxic activity after TCR ligation or after IL-2 production by cells such as NK cells (Table 1) (Metelitsa et al., 2001). NKT cells participate against several infectious diseases, autoimmunity, cancer and more specifically, against leishmaniasis (Terabe and Berzofsky, 2008; Tsuji, 2006).

NKT cells are a subset of T cells, which recognize glycolipid antigens presented through CD1 by antigen presenting cells (Borg et al., 2007). Originally they were described as cells sharing both CD3 T-cell and NK-cell markers, such as NK1.1 (CD161), Ly49 and members of the NKG2 family, yet later it was shown that not all NKT cells have the NK1.1 marker (Godfrey et al., 2000). Currently NKT cells are classified into two subsets according to the degree of polymorphism of their TCR alpha chain. NKT cells type 1 are known as invariant chain NKT cells (iNKT), which show low polymorphism in their rearranged alpha chain (V α 14–J α 18 in mice and V α 24–J α 18 in humans). However, they have a beta chain with some variations (V β 8.2, V β 7 in mice and V β 2, V β 11 and in humans). The iNKT cells represent 70% of the NKT cells and are also the better described ones. They recognize the glycolipid

alpha-galatosylceramide (α -GalCer), a glycolipid extracted from the marine sponge *Agelas mauritianus* coupled to tetramers, that has been used for their pheno-typification. Type 2 NKT cells are less frequent and do not recognize α -GalCer (Bendelac et al., 2007).

NKT cells have two main effector functions: cytokine production and cytotoxic activity and the cells are characterized by their expression of CD4 or CD8. In humans, subsets showing CD4+, CD8+ or double negative (DN) CD4- CD8- have been described. It is noteworthy, that the CD8+ subset has not been demonstrated in mice (Teige et al., 2010). The CD8+ cells and DN have a higher cytotoxic activity, whereas CD4+ cells show a more elevated Th1 and Th2 cytokine production (Ho et al., 2015). The activation of NKT cells through α -GalCer has been extensively studied *in vitro*. This lipid is presented through CD1d molecules by antigen presenter cells like dendritic cells (Tsuji, 2006). *In vivo* studies in mice have shown that the intravenous or intraperitoneal inoculation of 2 μ g α -GalCer activates the immune system leading to cytokine production in serum. During the first hour after inoculation, the mice begin to produce IL-4 and IFN- γ . Whereas IL-4 reaches its highest production after 3 h, IFN- γ reaches its peak production at 12 h after the inoculation. IL-4 decreases after 12 h of stimulation, whereas IFN- γ production continues throughout 48 h, during which the production remains elevated (Habu et al., 2004). This characteristic has led to the proposal of using α -GalCer as a therapeutic agent against intracellular infections and cancer. Patients with hepatic cancer that were inoculated with dendritic cells previously pulsed with α -GalCer, showed a reduction in tumor size related to IFN- γ and IL-12 production and increased cytotoxic NK-cell activity (Schneiders et al., 2011; Nieda et al., 2004). Thus, treatment with α -GalCer possibly also helps against *Leishmania* infections through IFN- γ and TNF- α production that has been shown to decrease the parasite load by activation of iNOS in the infected macrophages (Sisto et al., 2001).

4. Activation of NKT cell in leishmaniasis

NKT cells can be activated through two mechanisms: a) the direct pathway after binding of their invariant TCR to CD1d loaded with a glycolipid and, b) the indirect pathway through cytokines such as IL-12 or IL-18 produced by antigen presenting cells (APC) (Fig. 1) (Zajonc and Girardi 2015; Nagarajan and Kronenberg 2007). In leishmaniasis, NKT-cell activation has been proposed to occur through the direct pathway, where *Leishmania* glycoalkal antigens presented by CD1d bind to invariant NKT cells, due to their similarity with α -GalCer. Examples of these are LPG of *L. donovani*, glycoinositol phospholipids (GIPLs), glycosphingophospholipid (GSPL) and glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Amprey et al., 2004; Karmakar et al., 2011; Schofield et al., 1999). Activation of NKT cells by GSPL bound to CD1d was demonstrated by iso-electric focusing showing binding of GSPL to CD1d. Furthermore, confocal microscopy revealed that this binding occurred within lipid rafts on macrophages stimulated with GSPL, where higher concentrations of immunological synapses occur (Karmakar et al., 2011; Chichili and Rodgers, 2009). The co-incubation of NKT cells with macrophages pulsed with GSPL was shown to lead to calcium mobilization and IL-2 production in NKT cells (Karmakar et al., 2011).

Studies on activation of NKT cells by *Leishmania* LPG or GIPLs, using competition-binding assays, showed that these molecules compete for CD1d. When using the recombinant dimer CD1d bound to LPG or GIPLs in the absence of α -GalCer, no activation was observed. In contrast, when including α -GalCer bound to CD1d, activation of NKT cells was observed (Amprey et al., 2004).

Another activation model showed that NKT cells produce IFN- γ after co-incubation with dendritic cells previously pulsed with LPG.

Table 1
Phenotypic and functional characteristics of human and mouse invariant NKT cells.

| Invariant TCR rearrangement | Mouse V α 14–J α 18 | Human V α 24–J α 18 | References |
|-----------------------------|--|--|--|
| Cytokines | IFN- γ IL-4 IL-10 IL-13 IL-9 IL-6 IL-5 IL-13 IL-2 GM-CSF TNF- α IL-17A ??? ??? ??? | IFN- γ IL-4 IL-10 ??? IL-9 IL-6 IL-5 ??? IL-2 ??? TNF- α IL-17A IL-17F IL-21 IL-22 | Coquet et al. (2008) Bernin et al. (2016) |
| Cytotoxicity | TCR-dependent Fas CD95 and its ligand FasL CD178 TRAIL ??? | TCR-dependent ??? ??? NKG2D | Metelitsa et al. (2001) Wingender et al. (2010) Wingender et al. (2010) Kuylenstierna et al. (2011) |
| TLRs | TLR 4 Low IFN- γ production | mRNA TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 & 10 expression No activation observed | Kim et al. (2012) Moreno et al. (2009) |

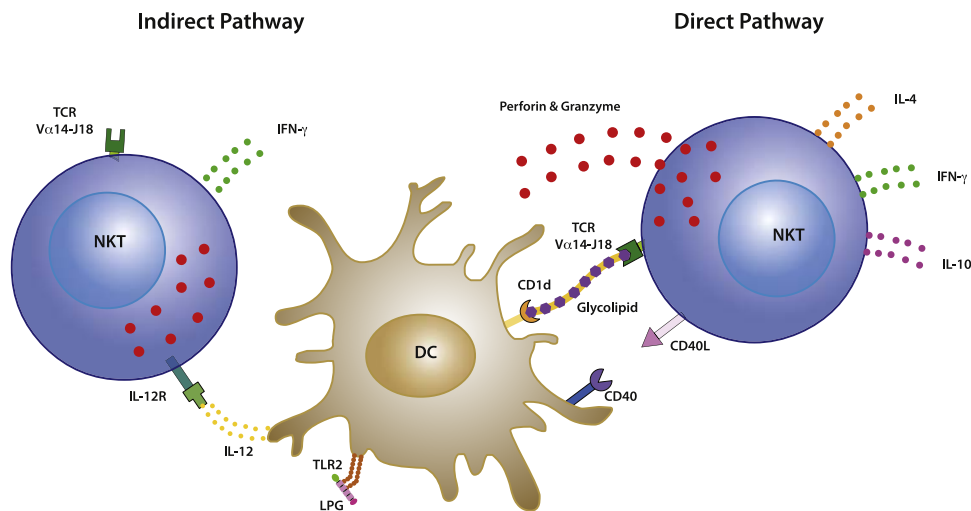


Fig. 1. NKT cell activation pathways in leishmaniasis. NKT cells can be activated by the direct pathway, where *Leishmania* glycolipids are presented by CD1d on antigen presenting cells such as dendritic cells (DC), leading to the secretion of diverse cytokines by NKT cells such as IFN- γ , IL-4 and IL-10, in addition to enhancing cytotoxicity through granzymes and perforins. NKT cells can also be activated by the indirect pathway, in which the same *Leishmania* glycolipids, such as LPG, stimulate TLR2 in DC, inducing their IL-12 production, which in turn activates NKT cells. The indirect activation pathway of NKT cells leads only to IFN- γ production.

Yet this activation model with LPG failed to clarify the pathway, since it only showed that activation of NKT cells decreased after inhibition of CD1d (with anti-CD1d blocking antibody, clone 1B1), yet it did not explore whether the indirect pathway was involved (Amprey et al., 2004). This is important since LPG has been associated with TLR2 activation, which induces inflammatory cytokines like IL-12 after stimulation of dendritic cells in mouse and humans (Becker et al., 2003; Argueta-Donohué et al., 2008; de Veer et al., 2003). It was therefore feasible that LPG could be activating NKT cells through the indirect pathway. This was clarified by recent results from our laboratory that have shown that NKT cell activation in leishmaniasis indeed occurs through the indirect pathway, where *L. mexicana* LPG activates dendritic cells leading to their IL-

12p70 liberation, which in turn, induces IFN- γ production by NKT cells (Zamora-Chimal et al., 2016).

5. The role of NKT cells in leishmaniasis

The role of NKT cells in leishmaniasis has been clarified with use of CD1d and invariant chain knockout mice. CD1d knockout mice do not have NKT cells. Furthermore, J α 18^{-/-} mice do not have type 1 NKT cells, however they do have type 2 NKT cells (Liao et al., 2013).

In the model of visceral leishmaniasis by *L. donovani*, parasites were found in the liver and spleen, where NKT cells make up 30% and 3% of T lymphocytes, respectively. In this model NKT cells play an important role since BALB/c CD1d^{-/-} mice infected with 10⁷ amastigotes showed a 3.5 times higher parasite load, as compared to wild type mice, after 4 weeks of infection. Furthermore, a

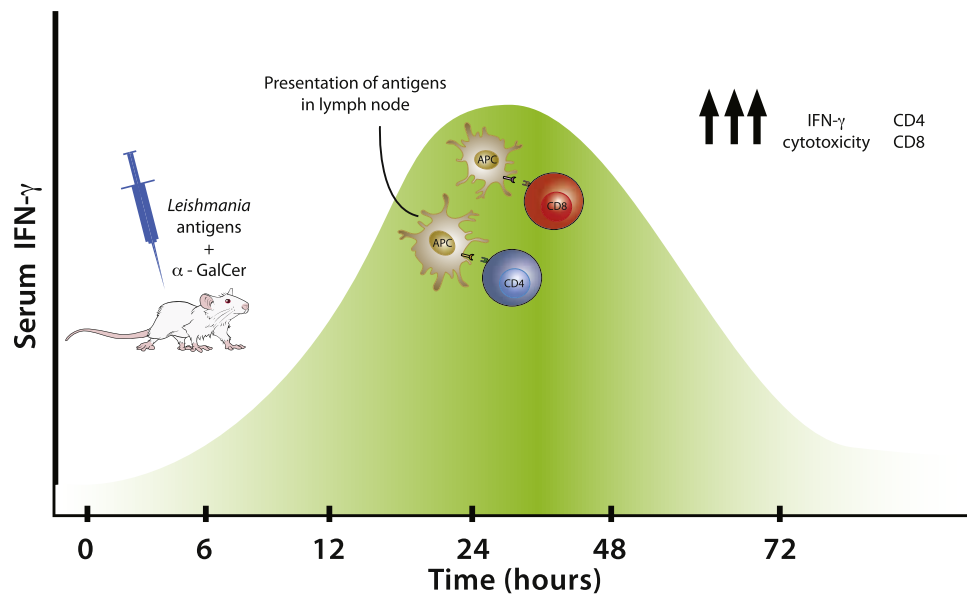


Fig. 2. Immunization with α -GalCer protects against *Leishmania* infections by inducing Th1. The inoculation of α -GalCer together with *Leishmania* antigens in mouse models lead to a strong IFN- γ response that reaches its peak at 24 h and lasts up to 72 h. This elevated serum IFN- γ possibly mediates the differentiation of CD4 T cells into Th1 clones, leading to continued IFN- γ production. Additionally it induces CD8 clones with enhanced cytotoxicity and IFN- γ production, thus protecting the immunized mice.

higher percentage of immature granulomas was found in the liver of infected mice (Amprey et al., 2004). Yet after 8 weeks of infection, both mice (CD1d^{-/-} and wild type) showed the same parasite load. This suggests that NKT cells initially help to control the infection in BALB/c mice, possibly by inducing a protective immune response to *L. donovani*. Yet in the later stages of the infection, NKT cells seem to be supported by other cells, possibly NK cells and γ d T cells (Amprey et al., 2004).

In the *L. major* infection model, the role of the NKT cells is controversial. In one study where V α 14 J α 281^{-/-} mice were infected subcutaneously with 2.5×10^6 promastigotes in the footpad, they showed a higher parasite load in the footpad and spleen, as compared to wild type mice on day 53 of infection. Additionally, the intravenous injection of *L. major* parasites (5×10^6 promastigotes) showed the same phenomenon, since the parasite load was approximately 10 times higher in the spleen and liver in V α 14 J α 281^{-/-} mice, as compared to wild type mice (Mattner et al., 2006). In contrast, another study of earlobe infections using a more physiological inoculation dose of 10^3 *L. major* metacyclic promastigotes, showed that NKT cells are involved in susceptibility, since the mice deficient in CD1d^{-/-} and J α 18^{-/-} NKT cells showed smaller lesions and reduced parasite loads, as compared to wild type mice (Griewank et al., 2014). The controversial data possibly relate to different parasite numbers and to the use of metacyclic promastigotes in the different infection models. Infections with heavy parasite loads and with metacyclic-stage parasites, alters the immune response towards the infection (Felizardo et al., 2007). This has been observed for CD8 lymphocytes, where low infection doses showed a more important role of these cells in the protection of mice against *Leishmania*, which was not observed when using elevated numbers of parasites (Novais and Scott, 2015).

There are few studies on NKT cells in human *Leishmania* infections. One of them analyses the cytotoxic role of the NKT cells in eliminating dendritic cells infected with *L. infantum*, where it was shown that NK cells cannot eliminate infected dendritic cells because they increases their HLA-E expression during the infection, thus protecting them from NK-cell lysis (Campos-Martín et al., 2006). Yet dendritic cells infected with *L. infantum* increase their CD1d expression and can therefore be recognized by NKT cells, which are able to kill these cells. In this study, the percentage of

NKT cells producing IFN- γ was approximately twice as those producing IL-4 (Campos-Martín et al., 2006). These data contribute to the understanding the role of NKT cells in leishmaniasis showing that they not only produce cytokines that activate the immune response, but they can also be cytotoxic for cells that cannot be lysed by NK cells (Campos-Martín et al., 2006). These data suggest that NKTs possibly play an important role in the immune response against *Leishmania* infections.

A study of NKT cells in human *L. donovani* infections showed that the percentage of these cells increases in the bone marrow, where more than 50% of them were CD161⁺ that bound to CD1d loaded with α -GalCer and LPG. Yet this study did not clarify whether this binding also activated the NKT cells (Rai et al., 2011). Since *L. donovani* infects the bone marrow, it would be interesting to analyse whether bone marrow NKT cells respond to *Leishmania* in this site or if their increase only reflects a physiologic response towards an infection in some other part of the body.

6. The use of iNKT cells in vaccines and therapies against leishmaniasis

Since stimulation of NKT cells with α -GalCer leads to their enhanced IFN- γ production and additionally promotes CD8⁺ cytotoxic T cell activity by inducing CD70 expression on dendritic cells (Taraban et al., 2008), this glycolipid has also been analyzed in vaccines against *L. major*. The use of α -GalCer helped reduce the parasite load in BALB/c mice infected with 1000 *L. major* promastigotes. It is noteworthy that α -GalCer had the contrary effect in the C57BL/6 mouse strain. The authors suggested that the opposed effect was caused by IL-4, since this cytokine increased in C57BL/6 infected mice as opposed to BALB/c infected mice, where IL-4 diminished (Griewank et al., 2014). This possibly suggests that NKT cells respond differently, according to the genetic background of the mouse strains.

Furthermore, α -GalCer also has also been used as an adjuvant in *Leishmania* vaccines. In the case of a DNA vaccine expressing the antigen LACK (p36), it was shown that immunization of BALB/c mice with α -GalCer as adjuvant and p36 as antigen, led to a reduction in the *L. major* parasite load approximately 10 times, as compared to mice only immunized with p36. The protection was

related to a higher IFN- γ production by T CD4 cells and a higher cytotoxicity of T CD8 cells (Dondji et al., 2008).

These models using α -GalCer for immunization or therapeutic treatments suggest that NKT cells, despite of being a small subset of T cells, have a very important role in modulating the immune response against *Leishmania* (Fig. 2). Thus, α -GalCer must be taken into account for future immunization trials against *Leishmania* infections.

7. Conclusion

The role of NKT cells in the resistance or susceptibility towards *Leishmania* infections remains to be defined, since controversial data persist. The response of these cells seems to depend on many variables such as the infection site, the number of infecting parasites, the virulence of the strain and the *Leishmania* species. It will be necessary to establish a vector-transmitted natural infection model to fully clarify the role of these cells during *Leishmania* infections. The model of natural infection additionally includes the sand fly saliva as another immunomodulatory variable, and additionally guarantees the correct parasite numbers during the infections.

New insight has been gained on the activation of NKT cells during *Leishmania* infections, including information on CD1d antigen ligands such as GSPL. However, the complexity of the *in vivo* activation needs to be addressed, since additional activation pathways, such TLRs stimulated by LPG or DNA of *Leishmania*, might be participating in the activating NKT cells, in which case the outcome possibly differs from the activation induced by a single pathway.

The use of α -GalCer as adjuvant in vaccines against *Leishmania* must be analyzed for all vaccine candidates, since it has provided promising results by maximizing the immune response against antigens that have proven to be protective, such as the antigen LACK.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

Jaime Zamora Chimal is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship 263920 from CONACyT. This work was financed by PAPIIT IN217515 and CONACyT 221405. We thank Omar Agni García Hernández for technical help in editing the figures and Dr. Enrique Ortega Soto for his valuable comments on the manuscript.

References

Aebischer, T., Bennett, C.L., Pelizzola, M., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Urbano, M., Ricciardi-Castagnoli, P., 2005. A critical role for lipophosphoglycan in proinflammatory responses of dendritic cells to *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Immunol.* 35 (2), 476–486, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200425674>.

Amprey, J.L., Im, J.S., Turco, S.J., Murray, H.W., Illarionov, P.A., Besra, G.S., Späth, G.F., 2004. A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 200 (7), 895–904, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20040704>.

Argueta-Donohué, J., Carrillo, N., Valdés-Reyes, L., Zentella, A., Aguirre-García, M., Becker, I., Gutiérrez-Kobeh, L., 2008. Experimental parasitology *Leishmania Mexicana*: participation of NF- κ B in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Exp. Parasitol.* 120, 1–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.002>.

Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L.G., Isibasi, A., 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130 (2), 65–74, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00160-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00160-9).

Bendelac, A., Savage, P.B., Teyton, L., 2007. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25 (1), 297–336, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711>.

Bernin, H., Fehling, H., Marggraff, C., Tannich, E., Lotter, H., 2016. The cytokine profile of human NKT cells and PBMCs is dependent on donor sex and stimulus. *Med. Microbiol. Immunol.* 205, 321–332, <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-016-0449-y>.

Bhardwaj, S., Srivastava, N., Sudan, R., Saha, B., 2010. *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 1–13, <http://dx.doi.org/10.1155/2010/109189>.

Borg, N.A., Wun, K.S., Kjer-Nielsen, L., Wilce, M.C.J., Pellicci, D.G., Koh, R., Rossjohn, J., 2007. CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature* 448 (7149), 44–49, <http://dx.doi.org/10.1038/nature05907>.

Cáceres-Dittmar, G., Tapia, F.J., Sánchez, M.A., Yamamura, M., Uyemura, K., Modlin, R.L., Convit, J., 1993. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 91 (3), 500–505, Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1554703&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Campos-Martín, Y., Colmenares, M., Gozalbo-López, B., López-Núñez, M., Savage, P.B., Martínez-Naves, E., 2006. Immature human dendritic cells infected with *Leishmania infantum* are resistant to NK-mediated cytotoxicity but are efficiently recognized by NKT cells. *J. Immunol.* (Balt. MD: 1950) 176 (10), 6172–6179, <http://doi.org/10.1093/infdis/176/10/6172>.

Carregaro, V., Ribeiro, J.M., Valenzuela, J.G., Souza-Júnior, D.L., Costa, D.L., Oliveira, C.J.F., Silva, J.S., 2015. Nucleosides present on phlebotomine saliva induce immunosuppression and promote the infection establishment. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 9 (4), e0003600, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003600>.

Chichili, G.R., Rodgers, W., 2009. Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell. Mol. Life Sci.: CMLS* 66 (14), 2319–2328, <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0022-6>.

Coquet, J.M., Chakravarti, S., Kyprisoudis, K., McNab, F.W., Pitt, L.A., McKenzie, B.S., Berzins, S.P., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., 2008. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4⁺ NK1.1⁺ NKT cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11287–11292, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0801631105>.

Dondji, B., Deak, E., Goldsmith-Pestana, K., Perez-Jimenez, E., Esteban, M., Miyake, S., McMahon-Pratt, D., 2008. NKT1 cell activation during DNA priming in heterologous prime-boost vaccination enhances T cell responses and protection against *Leishmania*. *Eur. J. Immunol.* 38 (3), 706–719, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200737660>.

Felizardo, T.C., Toma, L.S., Borges, N.B., Lima, G.M.C.A., Abrahamsohn, I.A., 2007. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. *Parasitology* 134, 1699–1707, <http://dx.doi.org/10.1017/S003182007003186>.

Godfrey, D.I., Hammond, K.J.L., Poulton, L.D., Smyth, M.J., Baxter, A.G., 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* 21 (11), 573–583, [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01735-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01735-7).

Griewank, K.G., Lorenz, B., Fischer, M.R., Boon, L., Lopez Kostka, S., von Stebut, E., 2014. Immune modulating effects of NKT cells in a physiologically low dose *Leishmania major* infection model after α GalCer analog PBS57 stimulation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (6), e2917, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002917>.

Gupta, G., Oghumu, S., Satoskar, A.R., 2013. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *Adv. Appl. Microbiol.* 82, 155–184, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3>.

Habu, Y., Uchida, T., Inui, T., Nakashima, H., 2004. Enhancement of the synthetic ligand-mediated function of liver NK1.1 Ag⁺ T cells in mice by interleukin-12 pretreatment. *Immunology*, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01932.x>.

Hermida, M.D.R., Doria, P.G., Taguchi, A.M.P., Mengel, J.O., dos-Santos, W.L.C., 2014. *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC Infect. Dis.* 14, 450, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-450>.

Hernández-Ruiz, J., Salaiza-Suazo, N., Carrada, G., Escoto, S., Ruiz-Remigio, A., Rosenstein, Y., Becker, I., 2010. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, *in vitro*, by TLR2 agonists. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (11), e871, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000871>.

Ho, L., Urban, B.C., Jones, L., Ogg, G.S., McMichael, A.J., 2015. CD4⁺ CD8 $\alpha\alpha$ subset of CD1d-Restricted NKT cells controls t cell expansion. *J. Immunol.*, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7350>.

Karmakar, S., Paul, J., De, T., 2011. *Leishmania donovani* glycosphingolipid facilitates antigen presentation by inducing relocation of CD1d into lipid rafts in infected macrophages. *Eur. J. Immunol.* 41 (5), 1376–1387, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201040981>.

Kim, J.H., Kim, H.S., Kim, H.Y., Oh, S.J., Chung, D.H., 2012. Direct engagement of TLR4 in invariant NKT cells regulates immune diseases by differential IL-4 and IFN- γ production in mice. *PLoS One* 7, 1–11, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0045348>.

Kuylensstierna, C., Björkström, N.K., Andersson, S.K., Sahlström, P., Bosnjak, L., Paquin-Proulx, D., Malmberg, K.J., Ljunggren, H.G., Moll, M., Sandberg, J.K., 2011. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur. J. Immunol.* 41, 1913–1923, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200940278>.

Lezzi, G., Frohlich, A., Ernst, B., Ampenberger, F., Saeldan, S., Glaichenhaus, N., Kopf, M., 2006. Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* 177 (2), 1250–1256, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.1250>.

- Liao, C.M., Zimmer, M.I., Wang, C.R., 2013. The functions of type I and type II natural killer t (NKT) cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 19 (6), 1330–1338, <http://dx.doi.org/10.1097/MIB.0b013e318280b1e3>.
- Lohoff, M., Gessner, A., Bogdan, C., Rölinghoff, M., 1998. Experimental murine leishmaniasis and the Th1/Th2 cell concept. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 23 (6), 347–350. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10622632>.
- Mattner, J., Donhauser, N., Werner-Felmayer, G., Bogdan, C., 2006. NKT cells mediate organ-specific resistance against *Leishmania major* infection. *Microbes Infect.* 8, 354–362, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2005.07.002>.
- Metelitsa, L.S., Naidenko, O.V., Kant, A., Wu, H.W., Loza, M.J., Perussia, B., Seeger, R.C., 2001. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J. Immunol.* 167 (6), 3114–3122, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.167.6.3114>.
- Moreno, M., Mol, B.M., von Mensdorff-Pouilly, S., Verheijen, R.H., de Jong, E.C., von Blumberg, B.M., van den Eertwegh, A.J., Scheper, R.J., Bontkes, H.J., 2009. Differential indirect activation of human invariant natural killer T cells by Toll-like receptor agonists. *Immunotherapy* 1, 557–570, <http://dx.doi.org/10.2217/imt.09.30>.
- Nagarajan, N.A., Kronenberg, M., 2007. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* (Balt. MD: 1950) 178 (5), 2706–2713, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2706>.
- Nieda, M., Okai, M., Tazbirkova, A., Lin, H., Yamaura, A., Ide, K., Nicol, A.J., 2004. Therapeutic activation of V α 24. *Cell* 103 (2), 383–389, <http://dx.doi.org/10.1126/blood-2003-04-1155>. Supported.
- Noronha, F.S., Nunes, A.C., Souza, K.T., Melo, M.N., Ramalho-Pinto, F.J., 1998. Differential sensitivity of New World *Leishmania* spp. promastigotes to complement-mediated lysis: correlation with the expression of three parasite polypeptides. *Acta Trop.* 69 (1), 17–29, [http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00108-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00108-3).
- Novais, F.O., Scott, P., 2015. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Semin. Immunopathol.* 37 (3), 251–259, <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-015-0475-7>.
- Olivier, M., Gregory, D.J., Forget, G., 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view subversion. *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2), 293–305, <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.18.2.293>.
- Orosio, E.Y., Zhao, W., Espitia, C., Saldarriaga, O., Hawel, L., Byus, C.V., Melby, P.C., 2012. Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. *PLoS Pathog.* 8 (1), e1002417, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002417>.
- Pandey, S.P., Doyen, N., Mishra, G.C., Saha, B., Chandel, H.S., 2015. TLR9-deficiency reduces TLR1, TLR2 and TLR3 expressions in *Leishmania major*-infected macrophages. *Exp. Parasitol.* 154, 82–86, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.005>.
- Rai, A.K., Thakur, C.P., Seth, T., Mitra, D.K., 2011. Enrichment of invariant natural killer T cells in the bone marrow of visceral leishmaniasis patients. *Parasite Immunol.* 33 (12), 688–691, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01328.x>.
- Schneiders, F.L., Scheper, R.J., von Blumberg, B.M.E., Woltman, A.M., Janssen, H.L.A., van den Eertwegh, A.J.M., van der Vliet, H.J., 2011. Clinical experience with α -galactosylceramide (KRN7000) in patients with advanced cancer and chronic hepatitis B/C infection. *Clin. Immunol.* 140 (2), 130–141, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2010.11.010>.
- Schofield, L., McConville, M.J., Hansen, D., Campbell, A.S., Fraser-Reid, B., Grusby, M.J., Tachado, S.D., 1999. CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science* (New York, N.Y.) 283 (5399), 225–229, <http://dx.doi.org/10.1126/science.283.5399.225>.
- Silveira, F.T., Lainson, R., Corbett, C.E.P., 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 99 (3), 239–251 <http://doi.org/S0074-02762004000300001>.
- Sisto, M., Brandonisio, O., Panaro, M.A., Acquafredda, A., 2001. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 24, 247–254, [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-9571\(01\)00013-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-9571(01)00013-3).
- Slauenwhite, D., Johnston, B., 2015. Regulation of NKT cell localization in homeostasis and infection. *Front. Immunol.* 6 (May), 255, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00255>.
- Tacchini-Cottier, F., Weinkopf, T., Launois, P., 2012. Does T helper differentiation correlate with resistance or susceptibility to infection with *L. major*? Some insights from the murine model. *Front. Immunol.* 3 (February), 1–9, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00032>.
- Taraban, V.Y., Martin, S., Attfield, K.E., Glennie, M.J., Elliott, T., Elewaut, D., Van Calenberg, S., Linclau, B., Al-Shamkhani, A., 2008. Invariant NKT cells promote CD8+ cytotoxic T cell responses by inducing CD70 expression on dendritic cells. *J. Immunol.* 180, 4615–4620, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4615>.
- Teige, A., Bockermann, R., Hasan, M., Olofsson, K.E., Liu, Y., Issazadeh-Navikas, S.I., 2010. CD1d-dependent NKT cells play a protective role in acute and chronic arthritis models by ameliorating antigen-specific Th1 responses. *J. Immunol.* (Balt. MD: 1950) 185 (1), 345–356, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901693>.
- Terabe, M., Berzofsky, J.A., 2008. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv. Cancer Res.* 101 (08), 277–348, [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)00408-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-230X(08)00408-9).
- Tsuji, M., 2006. Glycolipids and phospholipids as natural CD1d-binding NKT cell ligands. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1889–1898, <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6073-z>.
- Ueno, N., Wilson, M.E., 2012. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol.* 28 (8), 335–344, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002>.
- Wingender, G., Krebs, P., Beutler, B., Kronenberg, M., 2010. Antigen-specific cytotoxicity by invariant NKT cells in vivo is CD95/CD178-dependent and is correlated with antigenic potency. *J. Immunol.* 185, 2721–2729, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1001018>.
- Zajonc, D.M., Girardi, E., 2015. Recognition of microbial glycolipids by natural killer T cells. *Front. Immunol.* 6 (August), 1–11, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00400>.
- Zamora-Chimal, J., Fernández-Figueroa, E.A., Ruiz-Remigio, A., Wilkins-Rodríguez, A.A., Delgado-Domínguez, J., Salaiza-Suazo, N., Gutiérrez-Kobeh, L., Becker, I., 2016. NKT cell activation by *Leishmania mexicana* LPG: description of a novel pathway. *Immunobiology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2016.08.003>.
- de Veer, M.J., Curtis, J.M., Baldwin, T.M., DiDonato, J.A., Sexton, A., McConville, M.J., Schofield, L., 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* 33 (10), 2822–2831, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200324128>.