



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**RECONOCIMIENTO DEL LPG DE *LEISHMANIA MEXICANA* MEDIANTE EL TLR2
DE LINFOCITOS T $\gamma\delta$**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. SOTO OLGUÍN NADIA JOSELYNE

TUTORA PRINCIPAL: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CD. MX., MARZO 2020



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**RECONOCIMIENTO DEL LPG DE *LEISHMANIA MEXICANA* MEDIANTE EL TLR2
DE LINFOCITOS T $\gamma\delta$**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. SOTO OLGUÍN NADIA JOSELYNE

TUTORA PRINCIPAL: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., MARZO, 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/183/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de noviembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **SOTO OLGUÍN NADIA JOSELYNE** con número de cuenta **309329013** con la tesis titulada "**RECONOCIMIENTO DEL LPG DE *Leishmania mexicana* MEDIANTE EL TLR2 DE LINFOCITOS T $\gamma\delta$** ", realizada bajo la dirección de la **DRA. INGBORG DOROTHEA BECKER FAUSER**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Vocal: DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
Secretario: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Suplente: DR. ARMANDO PÉREZ TORRES
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 12 de febrero de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la convocatoria 291236.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN 211418.

A mi tutora, la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser, y a los miembros de mi comité tutor: a la Dra. Ana María Fernández Presas y el Dr. Enrique Ortega Soto.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la mejor formación académica desde que ingresé a nivel preparatoria hasta la fecha.

Al Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental, del Hospital General, en especial a su equipo de trabajo:

A la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser por brindarme el espacio, infraestructura y asesoría para realizar este estudio.

Al Dr. Jaime Zamora Chimal, por su apoyo técnico durante la planeación y el desarrollo del proyecto: Enriquecimiento de linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo, posteriores marcas extra e intracelulares para medir citocinas y lectura de muestras en el citómetro de flujo, la marca de fosforilación I κ B α y la colocalización TLR2—LPG, observadas mediante microscopía confocal; por su apoyo durante la estandarización de la metodología para obtener células de dermis de oreja de ratón, marcas extra e intracelulares y lectura de muestras en el citómetro de flujo. Y por su apoyo académico antes y durante el proceso de redacción, lo cual enriqueció la discusión del presente trabajo de tesis.

A la M. en C. Rocely Buenaventura Cervantes Sarabia por su apoyo técnico en el cultivo de los promastigotes de *L. mexicana* utilizados en los experimentos, además de sus consejos durante el manejo de ratones y para el adecuado uso de los equipos del laboratorio.

A la M. en C. Adriana Ruiz Remigio por su apoyo técnico en las pruebas de ELISA requeridas para conocer los títulos del anticuerpo α -LPG utilizado y para el adecuado uso de los equipos del laboratorio.

A la M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán, por su apoyo técnico durante la preparación de los medios de cultivo y buffers utilizados en los experimentos, y por su invaluable apoyo académico durante los seminarios y después de los mismos.

Al Dr. José Sotero Delgado por su apoyo técnico durante el manejo de ratones de laboratorio para la obtención del anticuerpo α -LPG.

A la Dra. Norma Salaiza Suazo por su apoyo técnico durante el enriquecimiento de linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo, por tomar imágenes de parásitos marcados con anticuerpos, ayudarme durante la titulación de los anticuerpos por citoquímica y por el corte de los bloques de OCR en el criostato.

Al Dr. Vadim Pérez Koldenkova, del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada-CMN Siglo XXI, por su apoyo técnico durante el manejo del microscopio confocal Nikon para obtener las imágenes de citocinas en dermis de oreja de ratón.

Al CIS Centro de Instrumentos - Citometría de Flujo, de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS del CMN Siglo XXI, por facilitarme el acceso al citómetro de flujo FACS canto II.

A la C. D. María José Gómora Herrera, del laboratorio de Desarrollo Gonadal, Facultad de Medicina, UNAM, por su apoyo técnico durante la obtención de las imágenes de colocalización TLR2-LPG y la cinética de fosforilación I κ B α .

Dedicatoria

A las raíces que sostuvieron el árbol familiar y me heredaron las enseñanzas de vida más importantes, como el trabajo honesto, honor, orgullo, respeto, valor y coraje para enfrentar los obstáculos de la vida. Aunque no haya podido conocerlos a todos en persona, su recuerdo persiste en las memorias familiares: Mis abuelos maternos, Ezequiel Olguín Salas (1933-1982) y Socorro Delgado Secundino (1938-2004) y mi abuelito Paterno, Isidro Soto Hernández (1933-2007).

A mi abuelita paterna, María Elena García Muñoz: Los últimos años no han sido fáciles para ti pero te agradezco por ser tan fuerte, por ser tan paciente y cariñosa conmigo y por creer en mí desde que nací hasta hoy en día. Gracias por estar siempre conmigo y perdón por no saber mantenerme en contacto. Tu presencia ha sido sumamente importante para mí y lo agradeceré por siempre.

A mis padres, María de Lourdes Olguín Delgado y Agustín Nicolás Soto García: Creo que me faltarían las palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, siempre resilientes y listos para dar lo mejor de ustedes por el bienestar de la familia, tan pacientes y atentos conmigo desde pequeña, ayudándome a ver mis virtudes y a controlar mis defectos, valorando mis logros y acompañándome durante todo el camino. Muchas gracias.

A mi hermana, Yolotzín Azaíd Soto Olguín: Las enseñanzas más difíciles las he aprendido junto a ti, ahora valoro más que nunca la honestidad, aprendí a respetar mi tiempo y el de los demás, a ser una persona que busca comprender algo desde varios ángulos y, sobre todo, aprendí a disfrutar de los pequeños momentos de la vida y a estimar los recuerdos del pasado sin dejar de mirar al futuro. Te quiero muchísimo.

A mi gatito, Demian Aítor Romero Soto: No soy paciente con los niños pero he hecho una excepción contigo, tengo que seguir esforzándome en esto pero lo vale ya que, incluso desde antes de nacer eres una de las personas que más he querido en la vida.

A mis tíos: Mi tía Mago, mi Tío Oso, mi tío Cuate, mi tío Jose Luis y mi Tía Silvia, mis tíos más jóvenes Roi y Mariana, mi tía abuelita Araceli y a mis primos Elías y Yazmín: Gracias por estar conmigo durante gran parte de mi vida y por formar parte de mis mejores recuerdos de la infancia. Mil gracias.

Todos me han acompañado en este tiempo de formación: Por su ayuda, interés y palabras de aliento, sólo me queda tratar de agradecerles lo que han hecho por mí.

A mis amigas de la prepa:

Mis niñas especiales y hembras malvadas: Copitzin, Hazel, Valery, Angélica (Angy) y Arely, definitivamente fueron ustedes lo mejor de la prepa, tengo buenos recuerdos de los chismes en los pasillos, en los salones, en las tumbas, ¡en todas partes! Cuando íbamos el mismo día a galerías a comer y cuando nos veíamos fuera de la prepa. Siempre ha sido así, llevamos años en contacto y quiero que sepan que son muy especiales para mí, aunque estamos separadas durante meses siempre logramos ponernos al corriente en un día. Gracias por aguantarme tanto tiempo y seguir acompañándome todo este tiempo, confío en ustedes y las aprecio como no se imaginan.

A mis amiguis de la fac, siempre conmigo en las buenas y en las malas:

Mi barrio Yoce, Gabys, Jimenita y Caro. ¡Las adoro! Agradezco haberlas conocido porque son las personas más geniales, las prácticas de campo fueron lo máximo gracias a ustedes, las comidas después de clases y durante los trabajos de laboratorio. Sé que cuento con un gran grupo de amigas, las quiero mucho y extraño pasar el tiempo con ustedes. A Emilia, te conozco desde segundo semestre y sé que llegarás aún más lejos de lo que ya has logrado, confío plenamente en ti, y aunque ya tiene un buen rato que no nos vemos, siempre te tendré en alta estima. Mis cinéfilos amantes del té y el humor negro, Fer y Sara, nos entendemos bastante bien y tenemos mucho en común, aunque no lo parezca o me digan que no, nuestras conversaciones son un tesoro nacional para mí.

Al laboratorio:

A los ratoncitos que dieron su vida para que yo pudiera realizar este proyecto.

A la banda gorda, Juan/Juanete/Carlos, Rosa, Rona, Andy, Mary, muchas gracias por acompañarme durante mis experimentos, por compartir buenos recuerdos en el salón de estudiantes y la jardinera, y sobre todo, por salir a gordear de vez en cuando para compartir entre todos y generar más recuerdos. Los aprecio mucho y los extraño aún más, el laboratorio no fue lo mismo sin ustedes.

A todos los técnicos que me acompañaron durante la maestría, en especial a Jaime, Cris y Rocely, quienes me hicieron sentir en confianza y me brindaron su amistad desde que entré al taller. Mariana, entramos juntas al lab pero tu esfuerzo te llevó a lograr muchas cosas, espero que te vaya muy bien en el doctorado, gracias por tus consejos. A Jaime, muchas, muchas gracias por ayudarme a rescatar el proyecto, te aseguro que ni siquiera estaría escribiendo esto de no ser por tu asesoría, sigue compartiendo lo que sabes y ayudando a los alumnos; no te detengas hasta ser profesor y dirigir tu propio laboratorio, gracias por tu apoyo, lecciones, consejos y amistad.

Gracias a todos

Índice

Abreviaturas: Inglés / Español

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1) Introducción	3
1.1 Generalidades de <i>Leishmania</i> y la leishmaniasis	3
1.2 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	4
1.3 Glicocáliz de <i>Leishmania</i> : Lipofosfoglicano (LPG).....	6
1.4 Respuesta inmune contra <i>Leishmania</i>	7
1.4.1 Sitio de infección.....	7
1.4.2 Primer contacto de <i>Leishmania</i> con el sistema inmune innato	9
1.4.3 Respuesta adaptativa contra <i>Leishmania</i> : Esquema Th1/Th2.....	10
1.5 Linfocitos T $\gamma\delta$	12
1.5.1 Ligandos y funciones.....	14
2) Antecedentes	16
2.1) <i>Leishmania</i> y linfocitos T $\gamma\delta$ de ratón	16
2.2) Receptores tipo toll de ratón y LPG de <i>Leishmania</i>	18
2.3) Justificación	22
3) Hipótesis.....	23
4) Objetivos	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos particulares.....	23
5) Metodología	24
5.1 Material biológico:	24
5.1.1 Ratones de laboratorio.....	24
5.1.2 Cultivo de promastigotes de <i>L. mexicana</i> en medio M199	24
5.2 Enriquecimiento de los linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo de ratón	25
5.2.1 Pureza de muestra de los linfocitos T $\gamma\delta$ enriquecidos de bazo	26
5.2.2 Colocalización del TLR2 de linfocitos T $\gamma\delta$ estimulados con LPG	26
5.2.3 Cinética de fosforilación de I κ B α en los linfocitos T $\gamma\delta$	27
5.2.4 Producción de TNF- α , IL-4, INF- γ e IL-17 en T $\gamma\delta$ de bazo	27
5.3 Reconocimiento de LPG de <i>L. mexicana</i> por linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis de oreja	28
5.3.1 Expresión de TLR2 en linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis	29

5.3.2 Inmunofluorescencia: Producción de TNF- α e IL-4 en dermis	30
5.4 Análisis de resultados.....	30
6) Resultados	31
6.1 Linfocitos T $\gamma\delta$ enriquecidos de bazo de ratón	31
6.1.1 Colocalización del TLR2 de linfocitos T $\gamma\delta$ estimulados con LPG	31
6.1.2 Activación de la vía del TLR2 de linfocitos T $\gamma\delta$ estimulados con LPG mediante la fosforilación de I κ B α	32
6.1.3 Producción de citocinas intracelulares por los linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo estimulados con LPG.....	33
6.2 Linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis de oreja de ratón.....	34
6.2.1 Reconocimiento del LPG de <i>L. mexicana</i> por el TLR2 de linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis	34
6.2.2 Modulación de la expresión del TLR2 de linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis de oreja de ratón	35
6.2.3 Porcentaje de células productoras de TNF- α e IL-4 de linfocitos T $\gamma\delta$ de oreja de ratón	36
6.3 Resumen de resultados.....	38
7) Discusión.....	39
8) Conclusión.....	42
8.1) Perspectivas.....	42
9) Literatura citada.....	43
10) Apéndice.....	52
10.1 Metodología complementaria a la sección 5 “Metodología”.....	52
10.1.1 Inmunofluorescencia α -LPG	52
10.1.2 Pureza de muestra de linfocitos T enriquecidos de bazo de ratón.....	54
10.1.3 Cinética de fosforilación de I κ B α en las células T $\gamma\delta$	55
10.1.4 Producción de TNF- α e IL-4 de linfocitos T $\gamma\delta$ de oreja de ratón.....	56
10.2 Controles de citometría para el objetivo con linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo.....	57

Abreviaturas: Inglés / Español

- ADN — *Deoxyribonucleic acid* / Ácido desoxirribonucleico
- APC — *Antigen presenting cell* / Célula presentadora de antígeno
- APC — *Allophycocyanin* / Aloficocianina
- CCL — *CC motif Chemokine Ligand* / Ligandos de quimiocinas subfamilia CC
- CD — *Cluster of differentiation* / Cúmulo de diferenciación
- CDR — *Complementarity determining region* / Región determinante de complementariedad
- CRP — *C-reactive protein* / Proteína C-reactiva
- CXCL — *CXC motif Chemokine Ligand* / Ligandos de quimiocinas subfamilia CXC
- DAMP — *Danger-associated molecular patterns* / Patrones moleculares asociados a daño
- DETC — *Dendritic epidermal $\gamma\delta$ cells* / Células $\gamma\delta$ dendríticas epidérmicas
- EDTA — *Ethylenediaminetetraacetic acid* / Ácido etilendiaminotetraacético
- EPCR — *Endothelial protein C receptor* / Receptor endotelial de proteína C
- GPI — *Glycosylphosphatidylinositol* / Glicosilfosfatidilinositol
- gp63 — *63 kDa glycoprotein* / Glicoproteína de 63 kDa (Kilo Dalton)
- GIPL's — *Glycoinositolphospholipid* / Glicoinositolfosfolípido
- IRAK — *IL-1 receptor associated kinase* / Cinasa asociada al receptor de IL-1
- I κ B α — *Inhibitor of κ B alpha* / Inhibidor de κ B alfa
- IKK — *Kinase for I κ B* / Cinasa para I κ B
- IMF — Intensidad media de fluorescencia
- KGF — *Keratinocyte growth factor* / Factor de crecimiento de queratinocitos
- LC — *Cutaneous leishmaniasis* / Leishmaniasis cutánea
- LCL — *Localized cutaneous leishmaniasis* / Leishmaniasis cutánea localizada
- LCD — *Diffuse cutaneous leishmaniasis* / Leishmaniasis cutánea difusa
- MCL — *Mucocutaneous leishmaniasis* / Leishmaniasis mucocutánea
- LPG — *Lipophosphoglycan* / Lipofosfoglicano
- LRR — *Leucine rich repeat* / Repeticiones ricas en leucina
- LV — *Visceral leishmaniasis* / Leishmaniasis visceral
- MAC — *Membrane attack complex* / Complejo de ataque a la membrana
- MAL — *MyD88 adapter like* / Adaptador tipo MyD88

MBP — *Mannan-binding protein* / Proteína de unión a manosas
MHC — *Major histocompatibility complex* / Complejo principal de histocompatibilidad
MTD — *Mitochondrial danger-associated molecular patterns* / Patrones moleculares asociados al daño mitocondrial
MyD88 — *Myeloid differentiation primary response 88* / Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88

NETs — *Neutrophil extracellular traps* / Trampas extracelulares de neutrófilos
NF- κ B — *Nuclear factor κ B* / Factor nuclear κ B
NK — *Natural killer* / Célula asesina natural
NKR — *Natural killer receptor* / Receptor de célula asesina natural
NKT — *Natural killer T cell* / Célula T asesina natural
NO — *Nitric oxide* / Óxido nítrico

OVA/CFA — *Ovalbumin/Complete Freund's adjuvant* / Ovoalbúmina/Adyuvante completo de Freund

PAMP's — *Pathogen-associated molecular patterns* / Patrones moleculares asociados a patógenos
PE — *Phycoerythrin* / Ficoeritrina
PBS — *Phosphate-buffered saline* / Amortiguador fosfato salino
PSG — *Promastigote secretory gel* / Gel secretor de promastigote

RNS — *Reactive nitrogen species* / Especies reactivas de nitrógeno
ROS — *Reactive oxygen species* / Especies reactivas de oxígeno
RPMI — *Roswell park memorial institute* / Instituto conmemorativo del parque de Roswell

SFB — *Bovine fetal serum* / Suero fetal bovino
SKINT1 — *Selection and upkeep of intraepithelial T cells protein 1* / Proteína 1 de selección y mantenimiento de células T intraepiteliales

TCR — *T Cell Receptor* / Receptor de célula T
TIR — *Toll/IL-1 receptor* / Receptor Toll/IL-1
TLR's — *Toll like receptors* / Receptores tipo toll
TRIF — *TIR domain containing adaptor inducing interferon β* / Adaptador que contiene dominio TIR que induce interferón β
TRAM — *TRIF related adaptor molecule* / Molécula adaptadora relacionada a *TRIF*
TRAF6 — *TNF-6 receptor associated factor* / Factor asociado al receptor del TNF-6

ULBP's — *UL16-binding proteins* / Proteínas de unión a UL16
VEGF — *Vascular endothelial growth factor* / Factor de crecimiento de endotelio vascular

RESUMEN

Los parásitos del género *Leishmania* se transmiten a través de un vector hematófago a la dermis de los mamíferos, incluyendo al ser humano, el cual puede desarrollar una enfermedad tropical conocida como leishmaniasis. En México, la principal especie causante de la leishmaniasis cutánea es *Leishmania mexicana*, la cual al ser inoculada en la piel es reconocida a través de las moléculas de su glicocálix como el lipofosfoglicano (LPG), que es detectado por el sistema inmune del hospedero mediante el sistema del complemento y por los receptores innatos de las células residentes de la piel. Entre ellas, los linfocitos T $\gamma\delta$ se presentan en la dermis y epidermis de seres humanos y ratones, siendo especialmente abundantes en dermis. Además, poseen características de linfocito “tipo innato” debido al reconocimiento del antígeno independiente de moléculas del MHC, por lo que son aptas para reconocer antígenos directamente por el TCR o mediante otros receptores como por ejemplos los TLRs. Por lo tanto, en el presente estudio se exploró la posibilidad de la unión del TLR2 de los linfocitos T $\gamma\delta$ con el LPG de *L. mexicana*.

Se utilizaron linfocitos T $\gamma\delta$ provenientes de bazo y dermis de las orejas de ratones de la cepa BALB/c. Para los estudios en bazo se utilizó microscopía confocal para observar la colocalización entre el TLR2 de los linfocitos T $\gamma\delta$ y el LPG de *L. mexicana*, la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en los linfocitos T $\gamma\delta$ y su subsecuente producción de citocinas. Se estudió la interacción entre el LPG y el TLR2 en la dermis de la oreja de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* a través de la expresión del TLR2 y la unión del anti-LPG en las células T $\gamma\delta$ mediante citometría de flujo, posteriormente se buscaron las citocinas más abundantes observadas previamente en bazo. En bazo y dermis se encontró que los linfocitos T $\gamma\delta$ podían reconocer el LPG de *L. mexicana* a través de su TLR2, lo cual indujo en tiempos tempranos una mayor cantidad de $\text{TNF-}\alpha$ a comparación de la IL-4. Como conclusión, se propone que el LPG de *L. mexicana* constituye un nuevo ligando para los linfocitos T $\gamma\delta$, cuya activación podría contribuir al microambiente de citocinas en el sitio de infección e influir en la respuesta inmune innata y adaptativa.

ABSTRACT

Parasites of the genus *Leishmania* are transmitted through a hematophagous vector to the dermis of mammals, including humans, which can develop a tropical disease known as leishmaniasis. In Mexico, the main causative species of cutaneous leishmaniasis is *Leishmania mexicana*, which when inoculated into the skin, is immediately recognized through its glycoalyx molecules such as lipophosphoglycan (LPG), which is detected by the host's immune system through the complement system and by the innate receptors of resident skin cells. Among them, $\gamma\delta$ T lymphocytes could be the least studied and possibly most relevant cell population, as they occur in the dermis and epidermis of humans and mice, being especially abundant in dermis. In addition, they have "innate type" lymphocyte characteristics due to their recognition of antigen independent of MHC molecules, so they are able to recognize antigens directly by their TCR or by other receptors, for example the TLRs. Therefore, in the present study the possibility of binding of TLR2 from $\gamma\delta$ T lymphocytes with the LPG of *L. mexicana* was explored.

$\Gamma\delta$ T lymphocytes from spleen and ear dermis of the BALB/c mouse strain were used. For the studies in spleen, confocal microscopy was used to observe the colocalization between the TLR2 of the $\gamma\delta$ T lymphocytes and the LPG of *L. mexicana*, the phosphorylation of I κ B α in the $\gamma\delta$ T lymphocytes and their subsequent production of cytokines. The interaction between LPG and TLR2 was studied in the ear dermis of BALB/c mice infected with *L. mexicana*, analyzing the expression of TLR2 and the binding of anti-LPG in $\gamma\delta$ T cells by flow cytometry, subsequently the most abundant cytokines observed previously in the spleen were searched. It was found in spleen and dermis that $\gamma\delta$ T lymphocytes could recognize the LPG of *L. mexicana* through its TLR2, leading to an early release of enhanced levels of TNF- α , as compared compared to IL-4. In conclusion, it is proposed that the LPG of *L. mexicana* constitutes a new ligand for $\gamma\delta$ T lymphocytes, whose activation could contribute to the cytokine microenvironment at the site of infection and influence the innate and adaptive immune response.

1) Introducción

1.1 Generalidades de *Leishmania* y la leishmaniasis

El género *Leishmania* está compuesto por protozoarios que se transmiten al hospedero a través de un vector hematófago, en donde completan su desarrollo como parásitos intracelulares (Antinori *et al.*, 2012). Todas las especies de *Leishmania* contienen el núcleo en la parte posterior, mientras que en la parte anterior se encuentra el kinetoplasto, un organelo que contiene ADN organizado en maxi y minicírculos (Roberts *et al.*, 2009). Diversas especies de *Leishmania* pueden infectar al ser humano y generar una enfermedad tropical conocida como leishmaniasis, la cual afecta a 98 países alrededor del mundo (Alvar *et al.*, 2012). La leishmaniasis se manifiesta en diferentes formas clínicas que se presentan dependiendo de la especie de *Leishmania* infectante, de su sitio de replicación, como las mucosas nasofaríngeas, vísceras o piel, y de su interacción con el sistema inmune del hospedero (Serafim, 2017; Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

Se distinguen tres cuadros clínicos principales: leishmaniasis visceral (LV), leishmaniasis mucocutánea (MCL) y leishmaniasis cutánea (LC) (Cecílio *et al.*, 2014). De esta forma, la LV se caracteriza por la migración de los parásitos hacia las vísceras (bazo o hígado), mientras que la LC se origina por parásitos residentes en tejidos epiteliales y deriva en tres formas clínicas: Leishmaniasis mucocutánea, leishmaniasis cutánea localizada y leishmaniasis cutánea difusa (MCL, LCL y LCD, respectivamente) (**Fig. 1**) (Kaufer *et al.*, 2017). La MCL consiste en la migración de los parásitos a las mucosas nasofaríngeas; la LCD se origina por la migración de los parásitos y la aparición de múltiples nódulos sin ulceración, a diferencia de la LCL, en donde se presenta una lesión única que tiende a ulcerar (Kaufer *et al.*, 2017; Steverding, 2017).



Figura 1. Las principales manifestaciones de Leishmaniasis cutánea. Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) (A); leishmaniasis cutánea difusa (LCD) (B) y leishmaniasis mucocutánea (MCL) (C). Imágenes adaptadas de Torres-Guerrero *et al.*, 2017; McGwire y Satoskar, 2014.

En México, la mayor parte de los casos de leishmaniasis se presentan en los estados de Chiapas, Campeche, Tabasco y Quintana Roo, siendo la LCL la forma clínica más frecuente (CENAPRECE, 2015). La principal especie causal de la LCL en México es *Leishmania mexicana* y el vector confirmado es *Lutzomyia olmeca olmeca*; sin embargo, la distribución de este vector no coincide con la distribución de todos los casos de leishmaniasis, por lo tanto, se sospecha el papel como vector de otras especies de *Lutzomyia* infectadas con *L. mexicana* (González *et al.*, 2011). Lo anterior impacta en las estrategias actuales de prevención y control de la leishmaniasis en México, puesto que es necesario estudiar a los posibles vectores de *Leishmania* (González *et al.*, 2010).

1.2 Ciclo de vida de *Leishmania*

El género *Leishmania* se transmite a través de un vector infectado hacia un hospedero mamífero. La forma flagelada y móvil de *Leishmania* spp. se conoce como promastigote, el cual atraviesa diferentes etapas de diferenciación en el interior del vector hasta alcanzar la fase infectiva de promastigote metacíclico. La segunda forma se conoce como amastigote, se encuentra en el interior del hospedero como parásito intracelular, principalmente en células fagocíticas como los macrófagos (Kaufer *et al.*, 2017).

El ciclo de vida comienza cuando un flebótomo hembra (Diptera: Psychodidae), sea del género *Lutzomyia* (en el “Nuevo Mundo”) o *Phlebotomus* (en el “Viejo Mundo”), se alimenta de un vertebrado infectado, ingiriendo la fase de amastigote (**Fig. 2A**) (Serafim, 2017). Una vez al interior del vector, el incremento en el pH y la disminución de la temperatura inducen la diferenciación de los parásitos a la fase de promastigote procíclico, la cual se adhiere a la matriz peritrófica del sistema digestivo del vector y se divide activamente. Después de varios días el promastigote pasa por un proceso de metaciclogénesis para convertirse en promastigote metacíclico, el cual se ubica en la parte anterior de la probóscide del díptero (**Fig. 2B**). Cuando el vector vuelve a alimentarse de un vertebrado transmite a los promastigotes metacíclicos, los cuales entran en contacto con macrófagos de la dermis, son fagocitados y contenidos en un fagosoma (Descoteaux y Turco, 1999).

Una vez que los promastigotes se encuentran en el interior del macrófago, el fagosoma se une con un lisosoma para formar el fagolisosoma (**Fig. 2C**), mismo que probablemente induce el cambio de promastigote a amastigote debido al aumento de temperatura y disminución del pH; sin embargo, el amastigote sobrevive al interior del macrófago y se replica hasta lisis la célula y liberar a más amastigotes al medio extracelular, en donde pueden ser fagocitados por otros macrófagos (**Fig. 2D**). El ciclo de vida se completa cuando un flebótomo se alimenta de un hospedero infectado (Descoteaux y Podinovskaia, 2015).

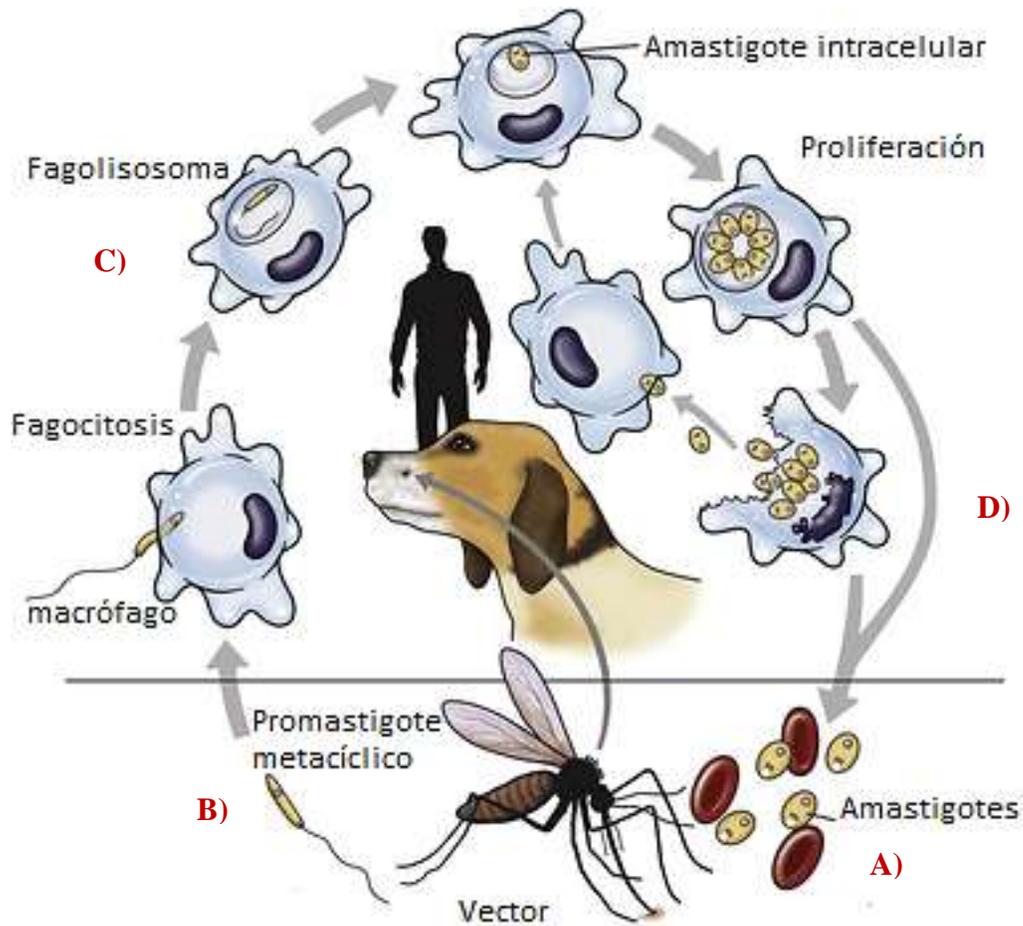


Figura 2. Ciclo biológico resumido del género *Leishmania*. El ciclo de vida inicia cuando un flebótomo hembra se alimenta de un vertebrado infectado e ingiere la fase de amastigote (A), el cual se diferencia a promastigote metacíclico y se transmite a otro vertebrado durante la alimentación de vector (B), infectando células fagocíticas y ubicándose en el interior de fagolisosomas (C), en donde se diferencia en amastigote, prolifera hasta lisar la célula y reinfecta más macrófagos (D) hasta ser ingerido por otro vector durante su alimentación, el cual lo transmitirá a un nuevo hospedero para completar el ciclo de vida. Adaptado de veteriankey.com/leishmaniosis.

1.3 Glicocálix de *Leishmania*: Lipofosfoglicano (LPG)

La superficie de los promastigotes está cubierta por una gruesa capa hidrofílica conocida como glicocálix, la cual está compuesta por moléculas conocidas como glicoconjugados, es decir, carbohidratos unidos covalentemente a lípidos o proteínas. La mayoría de los glicoconjugados están anclados a la superficie del parásito mediante un anclaje lipídico de glicosilfosfatidilinositol (GPI); por ejemplo: la glicoproteína de 63 kDa (gp63), el glicoinositolfosfolípido (GIPL's) y el lipofosfoglicano (LPG), siendo este último el más abundante en la superficie del promastigote (Franco *et al.*, 2012). La estructura del LPG puede dividirse en cuatro dominios: GPI (ancla lipídica), núcleo de glicanos (heptasacárido), cadena de fosfoglicanos (unidades repetidas de 15 a 40 fosfodisacáridos) y la 'cap' (di, tri o tetrasacáridos de manosa o galactosa) (**Fig. 3**) (Forestier *et al.*, 2015).

Los dominios GPI, el núcleo de glicanos y la fracción lineal de la cadena de fosfoglicanos (PG) son idénticos en todas las especies de *Leishmania*. Sin embargo, al entrar a metaciclogeñesis se duplica la cantidad de unidades repetidas de fosfoglicanos: de 15 repeticiones en el promastigote procíclico a 30 en el promastigote metacíclico; además, existe heterogeneidad en la estructura del LPG dependiendo de la especie de *Leishmania*. Por ejemplo, ocurre un reemplazo de la galactosa por arabinosa en el dominio cap, pueden existir sustituciones laterales en el dominio de repeticiones de fosfoglicanos o adiciones en el núcleo de glicanos, como la glucosa del LPG de *L. mexicana* (**Fig. 3C**) (Descoteaux y Turco, 1999). Estos cambios de estructura se han relacionado con la unión o desprendimiento del parásito al sistema digestivo del vector (Forestier *et al.*, 2015), lo que además podría tener importancia en la modulación de la respuesta celular inmune, como se verá más adelante (Descoteaux y Podinovskaia, 2015).

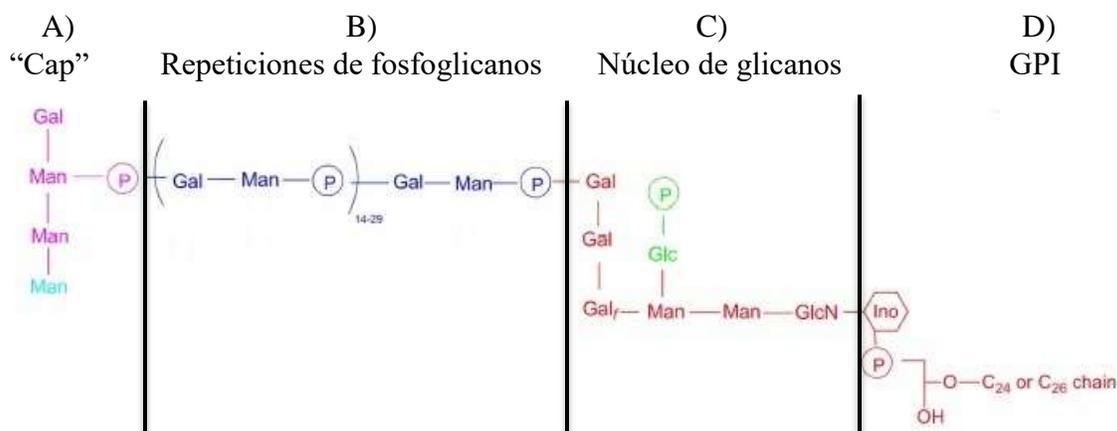


Figura 3. Representación de los cuatro dominios del LPG (*Leishmania donovani*). El ancla de GPI (**D**) y el núcleo de glicanos (**C**) se muestran en rojo, mientras que las unidades repetidas de fosfoglicanos se muestran en azul (**B**) y la cap de oligosacáridos en rosa (**A**). Gal, galactosa; Man, Manosa; Glc, glucosa; Galf, galactofuranosa; GlcN, glucosamina; Ino, inositol. Modificado de Forestier *et al.*, 2015.

1.4 Respuesta inmune contra *Leishmania*

1.4.1 Sitio de infección

La piel es uno de los órganos más grandes y constituye la primera barrera entre un vertebrado y las condiciones adversas del ambiente. Se puede dividir en dos compartimentos estructurales, epidermis y dermis (**Fig. 4**). La epidermis carece de vasos sanguíneos, está compuesta principalmente por varias capas de queratinocitos que contienen células de Langerhans intercaladas y melanocitos en el estrato más basal. La dermis está formada por una red de fibras de colágeno y elastina que componen la matriz extracelular (ECM), la cual es producida por fibroblastos, la población celular dominante, aunque también contiene células residentes del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos, linfocitos, células cebadas y células dendríticas. La dermis también alberga glándulas sebáceas y sudoríparas, posee vasos sanguíneos y linfáticos que permiten el ingreso de células del sistema inmune, que junto a las células residentes de la dermis, son las primeras en enfrentar a patógenos como *Leishmania* (Tay *et al.*, 2014; Matejuk, 2018).

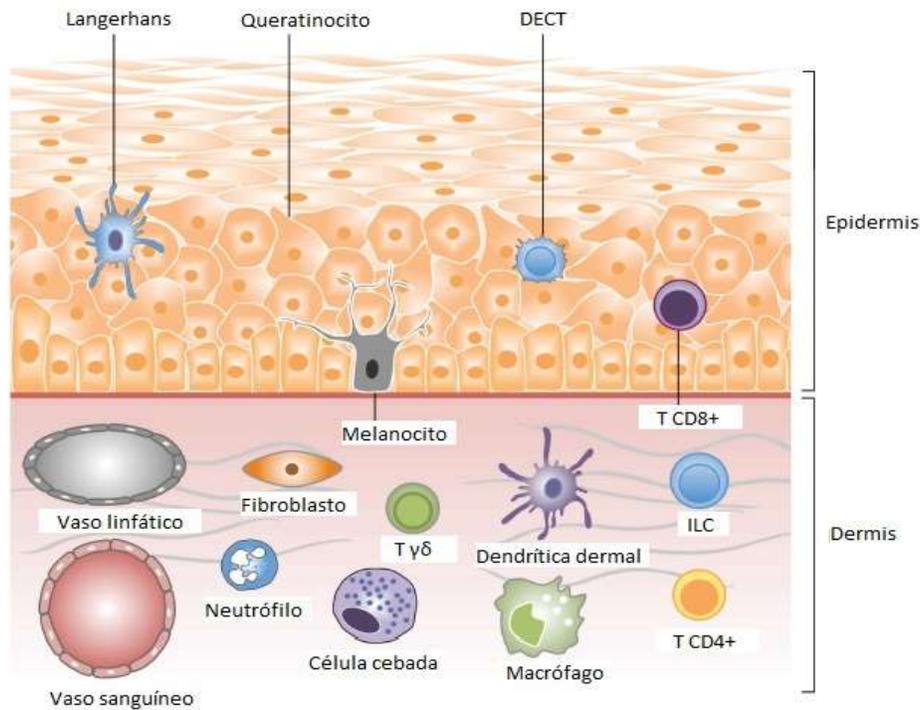


Figura 4. Composición celular de los compartimentos de la piel ilustrados con el modelo murino. En la epidermis se encuentran las células $\gamma\delta$ dendríticas epidérmicas (DETC, por sus siglas en inglés), además de T CD8+ de memoria; en la dermis los linfocitos T $\gamma\delta$ comprenden el 50% de la población linfoide, los T CD4+ restantes pueden ser efectoras o de memoria mientras que se ha reportado una población nueva de células linfoides innatas (ILC). Adaptado de Chong *et al.*, 2013.

El sistema inmune en la piel depende de la comunicación entre la compleja red de células con su entorno, además de la integridad de la epidermis y dermis, para mantener a cualquier patógeno en el exterior. Una vez que se rompe la homeostasis en la piel se facilita el inicio de un proceso infeccioso (Matejuk, 2018). Un ejemplo ocurre durante la transmisión de *Leishmania*, donde el vector atraviesa la epidermis hasta romper los capilares sanguíneos de la dermis para generar un charco de sangre (alimentación telmófaga) (Fig. 5). Relacionado a lo anterior, se ha hipotetizado que para la correcta transmisión de los promastigotes metacíclicos, éstos deben acumularse en la porción torácica del vector y producir un gel secretor de promastigote (PSG). Por lo tanto, el vector se bloquea parcialmente y necesita regurgitar el gel junto con los promastigotes con la finalidad de alimentarse, aumentando el daño provocado en la piel del hospedero e iniciando un proceso inflamatorio (Serafim *et al.*, 2017; Kamhawi, 2006).

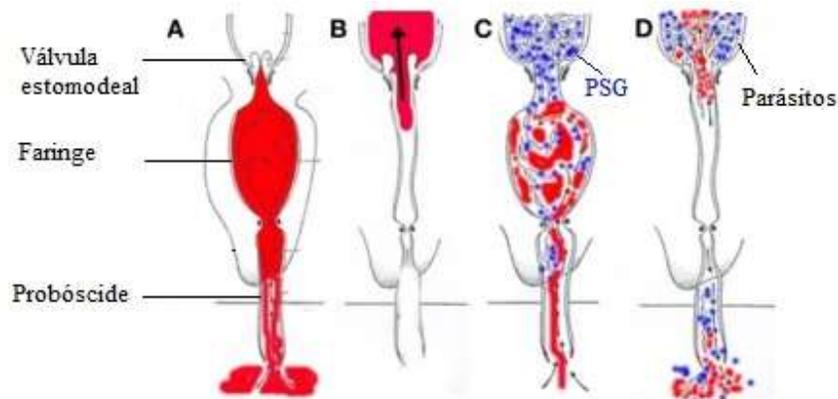


Figura 5. Modelo de regurgitación para la transmisión de *Leishmania*. Se observa un corte transversal del tracto digestivo anterior del vector: Sin infección aspira la sangre sin problemas (A) y se abre la válvula estomodeal (B). Con infección se observa un bloqueo de la válvula con el PSG del parásito, por lo que el vector no puede ingerir la sangre (C), así que regurgita (sangre, PSG y parásitos) (D) para tratar de alimentarse, transmitiendo a *Leishmania* en el proceso. Adaptado de Rogers, 2012.

Durante la reparación de la herida provocada por el vector inician procesos en la piel, tales como la coagulación de la sangre y la vasoconstricción, acompañados por una respuesta inflamatoria mediada por células cebadas o macrófagos, los cuales atraen a neutrófilos a través de quimiocinas CXCL1 y CXCL2. Posteriormente, atraen monocitos que se diferencian en macrófagos a través de la producción de quimiocinas como CCL2. En conjunto, el propósito de estas células fagocíticas es eliminar células dañadas, debris y a cualquier microorganismo invasor. Además de lo anterior, los macrófagos residentes y los macrófagos provenientes de monocitos exhiben un fenotipo antiinflamatorio, iniciando así la reparación de la herida (Serafim *et al.*, 2017). Por lo tanto, las células residentes de la piel son las primeras en responder ante una infección por *Leishmania*.

1.4.2 Primer contacto de *Leishmania* con el sistema inmune innato

El glicocálix altamente enriquecido con LPG del promastigote metacíclico constituye la primera barrera de *Leishmania* frente al sistema inmune del hospedero vertebrado (Forestier *et al.*, 2015). Una vez que el promastigote se diferencia a la fase de amastigote, se observa una disminución en la expresión de LPG, lo cual indica un papel predominante del mismo durante la fase inicial de infección (Descoteaux y Podinovskaia, 2015; Franco *et al.*, 2012), la cual se puede resumir en varios puntos:

(1) Durante la alimentación del vector se inoculan promastigotes en la charca de sangre, por lo que el parásito entra en contacto con el sistema de complemento. Sin embargo, los promastigotes metacíclicos son resistentes a la lisis por complemento debido a que la presencia del LPG previene la formación del complejo de ataque a membrana (MAC) y la formación de poros en la superficie del parásito (Descoteaux y Podinovskaia, 2015).

(2) El LPG puede ser reconocido por la proteína de unión a manosas (MBP) y la proteína C-reactiva (CRP), lo cual induce la fagocitosis del promastigote de una manera que no induce las actividades leishmanicidas del macrófago. Algo similar sucede cuando el LPG estimula la generación de las opsoninas C3b y C3bi, las cuales favorecen también la fagocitosis del parásito (Franco *et al.*, 2012).

(3) Si bien los neutrófilos eliminan patógenos mediante la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), desgranulación o fagocitosis seguida de un estallido oxidativo, se han observado diferencias en la respuesta microbicida del neutrófilo contra diferentes especies de *Leishmania* (Martínez-López *et al.*, 2018). La teoría del “caballo de Troya” se refiere a la infección silenciosa de neutrófilos por *L. major*, donde las células son hospederas temporales. Por otro lado, el LPG de *L. amazonensis* induce la formación de NET's de una manera dosis dependiente y es eficiente para eliminar a los promastigotes (Guimarães-Costa *et al.*, 2009).

(4) En el macrófago existen dos mecanismos principales que se activan para controlar la infección por *Leishmania*. El primero consiste en la generación de óxido nítrico (NO), y el segundo consiste en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante el estallido respiratorio. Sin embargo, para que ocurra el estallido respiratorio es necesaria la fusión de las vacuolas parasitóforas con los lisosomas, lo cual se inhibe por la presencia de LPG. Por otra parte, el LPG también se ha asociado con la exclusión de componentes citosólicos del complejo de la NADPH oxidasa de la membrana del fagosoma, impidiendo la producción de especies reactivas de oxígeno (Lodge *et al.*, 2006). Todo lo anterior favorece la persistencia de *Leishmania* el tiempo suficiente para que se produzca la respuesta inmune adaptativa.

1.4.3 Respuesta adaptativa contra *Leishmania*: Esquema Th1/Th2

El comienzo de la inmunidad adaptativa ocurre con la presentación antigénica de las células dendríticas para activar a los linfocitos T (Moll *et al.*, 1993; Konecny *et al.*, 1999). La cepa de ratones BALB/c presenta una respuesta tipo Th2 (**Fig. 6, B**), relacionada con la susceptibilidad a la infección con *L. major*, pues los linfocitos secretan citocinas antiinflamatorias como la IL-4 que promueve la producción de anticuerpos que favorecen la opsonización y fagocitosis del parásito por el macrófago; no obstante, la IL-4 disminuye la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (NOS2) en el macrófago debido a la activación de la arginasa, la cual induce la producción de poliaminas que inhiben la liberación de citocinas proinflamatorias, lo cual favorece la proliferación de los parásitos (Cecílio *et al.*, 2014). En contraste, la cepa C57BL/6 presenta una respuesta tipo Th1 (**Fig. 6, A**) que activa los macrófagos para la eliminación de los parásitos. Los linfocitos Th1 se caracterizan por ser activados en presencia de IL-12 y producir citocinas pro-inflamatorias tales como interferón- γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), citocinas que activan la NOS2 en los macrófagos permitiendo la destrucción del parásito (Sacks y Trauth, 2002).

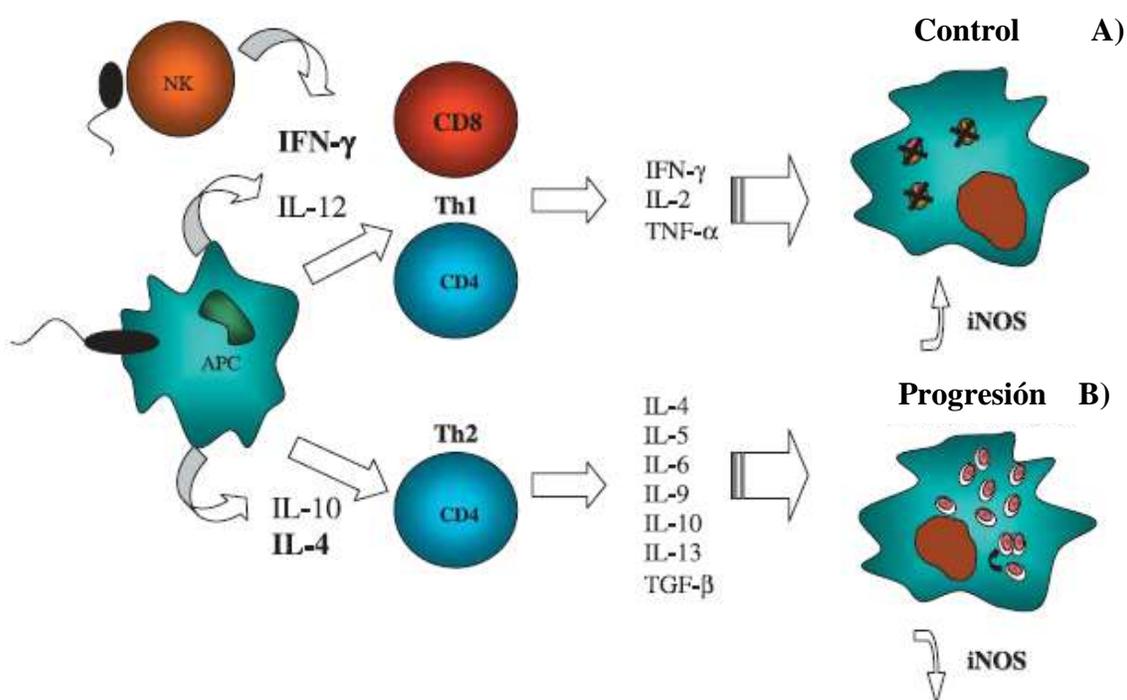


Figura 6. Esquema de la respuesta inmune Th1/Th2 contra *L. major*. La figura muestra la interacción entre una célula presentadora de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) y *L. major*, en donde después de fagocitar al parásito y presentar al antígeno a los linfocitos T CD4⁺ pueden presentarse los escenarios de control **A**) o progresión de la infección **B**). Adaptado de Ruíz-Hernández y Becker, 2007.

La dicotomía Th1/Th2 (**Fig. 6**) representa la respuesta inmune contra el género *Leishmania*, no obstante, la actividad protectora/perjudicial que se ha observado en esta dicotomía suele variar con respecto a la cepa de ratón, especie de *Leishmania* utilizada, cantidad de parásitos inoculados e incluso con el sitio de infección, que suele ser la oreja, cojinete plantar y la base de la cola (Maspi *et al.*, 2016). Esto indica la importancia de estudiar la respuesta inmune que genera cada especie, pues no se pueden comparar por completo. A continuación se presentan algunos ejemplos sobre la respuesta inmune contra *L. mexicana*, señalándose las diferencias con respecto a lo que se ha observado con *L. major*:

(1) La cepa C57BL/6 de ratón resistente a *L. major* no desarrolla adecuadamente una respuesta Th1 cuando es infectada con *L. mexicana*, no obstante, tampoco exhibe una respuesta robusta tipo Th2 (Buxbaum y Scott, 2005).

(2) Los ratones C57BL/6 infectados con *L. mexicana* contienen una gran cantidad de macrófagos y neutrófilos en las lesiones, con muy pocos linfocitos T en los nódulos linfáticos, lo cual podría estar relacionado con la lenta progresión de las lesiones en comparación con lo reportado con ratones C57BL/6 infectados con *L. major* que logran contener al parásito, presentan una mayor cantidad de linfocitos T en los nódulos linfáticos y menor cantidad de macrófagos y neutrófilos en las lesiones (Buxbaum *et al.*, 2002).

(3) La IL-4 se ha relacionado con la progresión de las lesiones en la cepa de ratón susceptible BALB/c a *L. major* (McMahon-Pratt & Alexander, 2004), mientras que durante la infección por *L. mexicana* en ratones BALB/c es probable que la IL-4 participe junto con la IL-13 en la cronicidad observada en las lesiones, pues los ratones BALB/c KO al receptor para ambas citocinas, IL-4Ra^{-/-}, resultaron ser más resistentes a desarrollar lesiones (Alexander *et al.*, 2002).

(4) A diferencia de lo observado en las lesiones de los ratones C57BL/6 infectados con *L. major*, se ha sugerido que las infecciones crónicas de *L. mexicana* podrían ser resultado de una inmunosupresión generalizada por la presencia de IL-10, lo cual se observó en diversos estudios utilizando la cepa C57BL/6 (Buxbaum *et al.*, 2008), donde se han vinculado también a los linfocitos T productores de IL-10 como los responsables de esta inmunosupresión (Buxbaum, 2015).

1.5 Linfocitos T $\gamma\delta$

Los linfocitos T pueden dividirse de acuerdo a las cadenas que componen el receptor de la célula T (TCR, por sus siglas en inglés) siendo T $\alpha\beta$ o T $\gamma\delta$. Cada cadena está constituida por dos dominios: el dominio amino terminal se conoce como variable (V) por presentar variación de secuencia, mientras que el dominio constante (C) (**Fig. 7B**) tiene secuencias conservadas (Lucas *et al.*, 2015). Las cadenas del TCR se unen mediante una secuencia formada por un enlace disulfuro (**Fig. 7A**) mientras su región transmembranal promueve la interacción del TCR con el complejo CD3. La diversidad del TCR $\gamma\delta$ depende del número de segmentos génicos: En el ratón, en la cadena γ existen 7 segmentos V y 3 J, y para la cadena δ existen 6 segmentos V, 2 D y 6 J, lo cual genera **21** combinaciones posibles para la cadena γ y **24** para la cadena δ (Chien *et al.*, 2014). Estas combinaciones permiten clasificar a los linfocitos T $\gamma\delta$ en subpoblaciones de acuerdo con el número de segmento V γ presente en el TCR (Heilig y Tonegawa, 1986).

A diferencia de los linfocitos T $\alpha\beta$, los linfocitos T $\gamma\delta$ comprenden un porcentaje inferior (~ 1-5%) de los linfocitos en sangre y órganos en la mayoría de los animales, aunque son particularmente abundantes en los órganos con abundante tejido epitelial, tales como los órganos reproductivos, intestino y piel, en donde pueden aumentar hasta el 50%. La mayoría se desarrolla en el timo, pero existe una población intestinal con un proceso de desarrollo “timo independiente” (Hayday y Gibbons, 2014). La gran mayoría permanece doble negativo, CD4⁻ CD8⁻ y, por lo tanto, el reconocimiento de antígenos es independiente de la presentación mediante MHC (Carding y Egan, 2002).

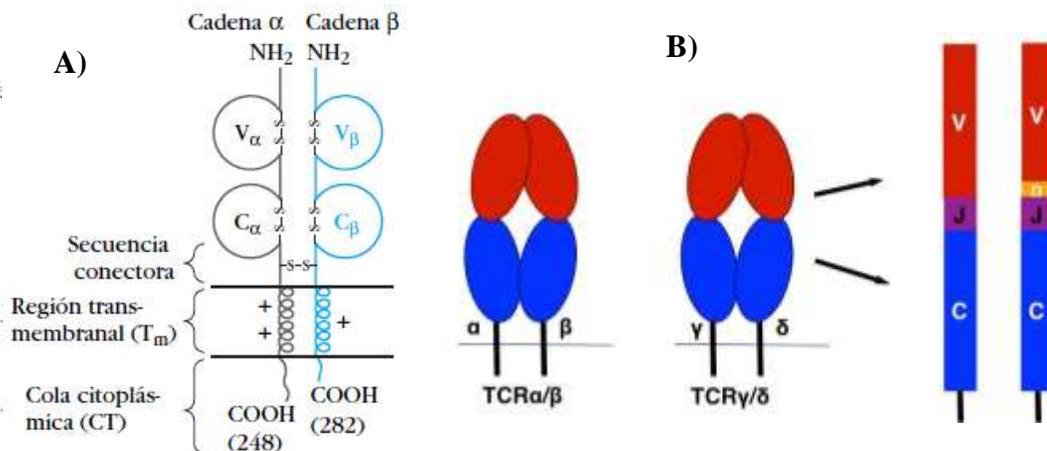


Figura 7. Estructura del TCR de los linfocitos T. Las cadenas del TCR (cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) se constituyen por dos dominios, el “variable” y el “constante”, la secuencia conectora entre ambas cadenas, la región transmembranal y la cola citoplásmica **A**). El dominio variable para las cadenas α y γ se compone de los segmentos V y J, mientras que en las cadenas β y δ se compone de los segmentos V, D y J **B**). Imagen B tomada de Kubys, 6 Ed. Imagen A, *T cell receptors - TCR*, s.f.

Ambas poblaciones de linfocitos T surgen de un precursor común doble negativo (DN) $CD4^- CD8^-$, el cual se divide de acuerdo con la expresión de CD44 y CD25 en DN1, DN2, DN3 y DN4. El reordenamiento de los loci para los TCR- γ , TCR- δ y TCR- β ocurre en la fase DN2 ($CD44^+$, $CD25^+$) para generar un TCR $\gamma\delta$ productivo o un pre-TCR $\alpha\beta$ (TCR- β acoplado al pre-TCR- α), por lo que la divergencia entre linajes ocurre antes de la fase DN3 ($CD44^-$, $CD25^+$) (Pang *et al.*, 2012). El modelo más aceptado para explicar el compromiso de linaje es conocido como “Fuerza de señal”, en donde una señalización fuerte del TCR induce el compromiso al linaje $\gamma\delta$, mientras que una débil induce al linaje $\alpha\beta$ (Hayes *et al.*, 2005; Fahl *et al.*, 2014). Además, se asume que los linfocitos T $\gamma\delta$ que expresan CD24 son linfocitos inmaduros que aún pueden cambiar al linaje $\alpha\beta$, no obstante, en caso de que expresen tanto CD24 como CD73 se asume que están irreversiblemente comprometidos al linaje $\gamma\delta$ (Coffey *et al.*, 2014).

El desarrollo de los T $\gamma\delta$ inicia en el timo fetal, distinguiéndose dos subpoblaciones de acuerdo con el grado de maduración: (1) Los linfocitos T $\gamma\delta$ $CD44^{low}$, $CD27^+$ y $CD62L^+$ que dejan el timo y colonizan órganos linfoides secundarios y sangre se les conoce como *naive*. (2) Otras subpoblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ permanecen más tiempo en el timo y presentan una mayor diferenciación, exportándose como $CD44^{high}$ de manera secuencial y en forma de “oleadas” (Fig. 8), las cuales se pueden identificar de acuerdo al segmento $V\gamma$ presente en su TCR (Prinz *et al.*, 2013).

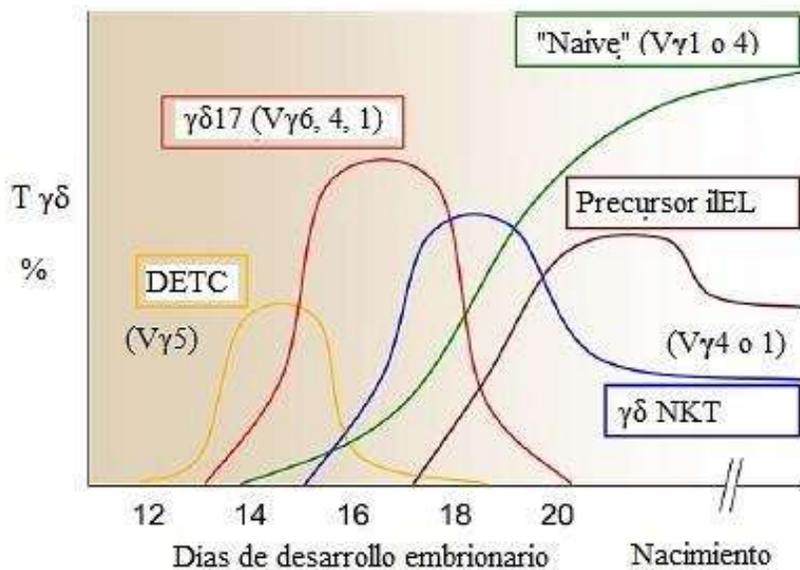


Figura 8. Desarrollo funcional de las “oleadas” de linfocitos T $\gamma\delta$ en el timo murino. La subpoblación $V\gamma 5$ (DETC) surge en el día 13 hasta el día 17; la $V\gamma 6$ ($\gamma\delta 17$) surge en el día 14 hasta el nacimiento; las $V\gamma 1$ y $V\gamma 4$ (Naive o $\gamma\delta$ NKT) surgen del día 16 hasta el nacimiento, mientras que los linfocitos T $\gamma\delta$ intraepiteliales del intestino (iIEL) también surgen del día 16 hasta el nacimiento y son $V\gamma 7$ (Carding y Egan, 2002). Imagen adaptada de Prinz *et al.*, 2013.

Adicionalmente a lo anterior, se descubrió que estas oleadas constituían subpoblaciones cuyo TCR era seleccionado mediante la unión a un ligando (evidencia indirecta), y además, estas subpoblaciones se ubican en determinados tejidos y presentan funciones previamente definidas (Hayday y Gibbons, 2014), por ejemplo:

DETC: Se conocen como células $\gamma\delta$ dendríticas epidérmicas (DETC, por sus siglas en inglés), a los linfocitos T $\gamma\delta$ que exhiben un TCR con el segmento $V\gamma 5^+$ y que migran a la epidermis, en donde exhiben una morfología tipo dendrítica. Es la subpoblación que expresa moléculas de superficie $CD44^{\text{high}}$, $CD122^+$ y $CD62L^-$ características de una selección previa mediante ligando, SKINT1 (proteína 1 de selección y mantenimiento de células T intraepiteliales), una proteína expresada en células epiteliales del timo (Sutoh *et al.*, 2018). Con respecto a sus funciones, son las primeras células en responder al daño cutáneo, pues secretan CCL3, CCL4 y el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) (Ramirez *et al.*, 2015).

$\gamma\delta 17$: Esta subpoblación se distingue por su tendencia a la producción de IL-17A y por ser altamente heterogénea con respecto al uso de segmentos de su TCR, aunque algunos de estos segmentos aparecen en mayor abundancia en ciertos órganos: en útero, lengua y la cavidad peritoneal se encuentran T $\gamma\delta V\gamma 6^+$, en dermis existe mayor abundancia de T $\gamma\delta V\gamma 4^+$ (Prinz *et al.*, 2013), mientras que las $V\gamma 1^+$ se encuentran en menor proporción en sangre, bazo y linfonodo (Pang *et al.*, 2012).

NKT $\gamma\delta$: Estos linfocitos T $\gamma\delta$ expresan el marcador NK1.1 y pueden usar los segmentos $V\gamma 4^+$ o $V\gamma 1^+$, se generan en el timo fetal como una población oligoclonal, mientras que conforme pasa el tiempo la población persiste debido a auto-renovación y se vuelve policlonal; por otro lado, también son capaces de migrar a la periferia y ubicarse en bazo e hígado. Una similitud que comparten con las NKT $\alpha\beta$ es su capacidad de producir IFN- γ e IL-4 de forma simultánea (Prinz *et al.*, 2013)

1.5.1 Ligandos y funciones

Para la activación y proliferación de los linfocitos T $\alpha\beta$ es necesario el reconocimiento de antígenos mediante su presentación por las moléculas MHC clase I o II, la unión de moléculas coestimuladoras y un microambiente de citocinas. Con los linfocitos T $\gamma\delta$ no existe un consenso acerca del tipo de antígenos que pueden reconocer y mediante qué moléculas estos antígenos son presentados (Born *et al.*, 2013), aunque pueden reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) o patrones moleculares asociados a daño (DAMP's) mediante el TCR sin una célula presentadora de antígeno, o en conjunto con otros receptores de superficie, como los receptores tipo toll (TLR's) o receptores de célula asesina natural (NKR's) (Vermijlen *et al.*, 2018).

Una vez reconocido el antígeno, se llevan a cabo sus funciones efectoras, que abarcan desde la producción de citocinas hasta la actividad citotóxica (Vermijlen *et al.*, 2018). Aunque la ontogenia de las células T $\gamma\delta$ se conoce por el modelo murino, los estudios de su actividad efectora son más frecuentes en humano, que también posee subpoblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ de acuerdo al uso preferencial de determinados segmentos para su TCR (Lefranc y Rabbitts, 1990), siendo la subpoblación V γ 9V δ 2 la mejor estudiada (Chien *et al.*, 2014). Los siguientes ejemplos de reconocimiento por TCR abarcan células T $\gamma\delta$ de ser humano y de ratón:

Reconocimiento directo del TCR-antígeno: El reconocimiento directo de las células endoteliales infectadas con citomegalovirus se lleva a cabo por la subpoblación humana de T $\gamma\delta$ V γ 4V δ 5, incluso se observó que no participa todo el TCR, pues únicamente la cadena γ interactúa con el receptor endotelial de proteína C (EPCR), lo cual indica la importancia del loop CDR3 de las cadenas del TCR $\gamma\delta$ durante el reconocimiento de antígeno (Witherden y Havran, 2012).

Reconocimiento mediante una molécula tipo MHC: Se identificó la butirofilina 3 (BTN3A1), expresada ubicuamente en células presentadoras de antígeno, como una molécula capaz de unirse a “fosfoantígenos”, los cuales son reconocidos por la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$ V γ 9V δ 2. Por lo tanto, los T $\gamma\delta$ podrían ser capaces de reconocer antígenos no peptídicos mediante presentación a través del MHC, por lo que los fosfoantígenos se convirtieron en un blanco terapéutico (Simões *et al.*, 2018).

Reconocimiento mediante TLR: Posteriormente a la estimulación de los linfocitos T $\gamma\delta$ con el lípido A de *Escherichia coli* se observó un incremento en el mRNA del TLR2, lo cual se confirmó con ratones deficientes en ese TLR^{-/-}. En otro reporte se encontró que un tipo de DAMP mitocondrial (MTD) induce la expresión de TLR2 y TLR4 en linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo de ratón, induciendo a su vez la producción de IL-1 β , IL-6, IL-10 y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), lo cual sugiere que los linfocitos T $\gamma\delta$ actúan en la reparación del daño tisular (Dar *et al.*, 2014).

Reconocimiento mediante NKG2D: En el modelo murino se ha comprobado que los linfocitos T $\gamma\delta$ de la epidermis (DETC) expresan constitutivamente el receptor NKG2D que puede reconocer ligandos en la línea celular A20 de linfoma B, induciendo la lisis de la A20 sin intervención del TCR, únicamente de NKG2D (Nitahara *et al.*, 2006).

Reconocimiento en conjunto: En un modelo *in vitro* se encontró que al estimularse linfocitos T $\gamma\delta$ V γ 9V δ 2 con ligandos para el TLR2 (Pam₃Cys) y con un anticuerpo dirigido al TCR, se incrementa su producción de IFN- γ (Dar *et al.*, 2014). En otro estudio se comprobó el reconocimiento de la proteína ULBP2 de una línea tumoral de glioblastoma por parte del NKG2D de linfocitos T $\gamma\delta$ V γ 9V δ 2, activando su actividad citotóxica, la cual se incrementó con un anticuerpo al TCR $\gamma\delta$ (Chitadze *et al.*, 2016). En otro reporte, la proteína ULBP4 puede ser reconocida tanto por el TCR como por el receptor NKG2D, lo cual es relevante ya que esta proteína aumenta su expresión en la superficie de células tumorales o células epiteliales infectadas con el virus Epstein-Barr (Kong *et al.*, 2009).

2) Antecedentes

2.1) *Leishmania* y linfocitos T $\gamma\delta$ de ratón

El primer estudio del papel de los linfocitos T $\gamma\delta$ en la infección por *Leishmania* buscó encontrar diferencias en la expansión de las T $\gamma\delta$ entre las cepas BALB/c y C57BL/6 con diferentes días de infección con *L. major*, sin embargo, no se observaron T $\gamma\delta$ en los ganglios linfáticos (Lohoff *et al.*, 1991). Posteriormente, en otro estudio se observó la proliferación continua de los linfocitos T $\gamma\delta$ en el bazo de la cepa BALB/c durante tres meses de infección con *L. major* y se observó un aumento en la carga parasitaria al bloquear el TCR $\gamma\delta$ con anticuerpos. Por otro lado, el mismo bloqueo del TCR $\gamma\delta$ provocó un retraso en la resolución de las lesiones en la cepa CBA/J resistente a *L. major*, lo cual indica que los linfocitos T $\gamma\delta$ participan en la curación del sitio de infección y posiblemente influyen en la disminución de la carga parasitaria (Rosat *et al.*, 1993).

Por otra parte, se descubrió que existe un incremento preferencial de la población V δ 4+ en el bazo de ratones BALB/c infectados durante 40 días con *L. major*. Se demostró también que esta población de linfocitos T $\gamma\delta$ se encontraba en división celular en hígado, nódulo linfático y bazo, principalmente en este último; además, el fenotipo de los linfocitos T $\gamma\delta$ mostraba un incremento en la expresión de las moléculas de superficie LFA-1, CD25, 4F2, CD44 y CD28, junto a una disminución de CD5 y Thy-1, sugiriendo que las células se encontraban activadas. De tal forma, los autores sugieren que la respuesta a *L. major* en la cepa BALB/c involucra la proliferación de los linfocitos T $\gamma\delta$ en tejidos linfoides, lo cual genera una subpoblación V δ 4+ activada (Rosat *et al.*, 1994).

Un tercer estudio encontró una relación entre la proliferación de los linfocitos $\gamma\delta$ con la presencia de linfocitos T $\alpha\beta$, pues los ratones atímicos de las cepas Swiss y BALB/c infectados con *L. major* no presentaban proliferación de linfocitos T $\gamma\delta$ en bazo. El mismo fenómeno se observó en ratones BALB/c deficientes en linfocitos T $\alpha\beta$. Mediante un tratamiento con anticuerpos para eliminar poblaciones CD4+ y CD8+, se encontró que la ausencia de la población T $\alpha\beta$ CD4+ tipo Th2 disminuía la proliferación de los linfocitos T $\gamma\delta$. Esto sugiere que las citocinas generadas por los linfocitos T $\alpha\beta$ CD4+ Th2 influye en la proliferación de los linfocitos T $\gamma\delta$ y no únicamente la respuesta a los antígenos de *L. major* (Rosat *et al.*, 1995).

Años después, un estudio mostró que los ratones C57BL/6 TCR δ -/- exhibían una carga parasitaria similar a los ratones silvestres durante 12 semanas de infección con *L. major* y desarrollaban una respuesta inmune Th1, lo cual no ocurrió con los ratones TCR α -/-, sugiriendo que los linfocitos T $\gamma\delta$ no eran esenciales para proteger a la cepa C57BL/6 de la infección con *L. major* (Satoskar *et al.*, 1997).

Se reportó que los linfocitos T CD4+ y T $\gamma\delta$ eran las principales células productoras de IL-4 en el hígado de los ratones de la cepa BALB/c a partir de la segunda semana de infección con *L. major*, sugiriendo que la producción de IL-4 por los linfocitos T $\gamma\delta$ podría relacionarse a la susceptibilidad de la infección por *L. major* (Yamashita *et al.*, 1999).

Posteriormente, se correlacionó la producción de IL-17A por linfocitos T $\gamma\delta$ con una mayor carga parasitaria en el hígado de ratones C57BL/6 durante los primeros siete días de infección con *L. donovani*, mientras que los ratones IL-17-/- presentaban menor carga parasitaria de los 7 hasta los 14 días postinfección. Se ha sugerido que el blanco celular para esta citocina son los monocitos, pues se encontró que tenían una mayor expresión de IL-17RA; aunque aún no se conoce el mecanismo de acción de la supresión de la IL-17A sobre los monocitos. Se postuló que la producción de IL-17A por parte de linfocitos T $\gamma\delta$ suprime el control temprano de la infección por *L. donovani* en hígado (Sheel *et al.*, 2015).

Otro estudio reportó que más del 75 % de las células productoras de IL-17A en el hígado y el bazo de ratones C57BL/6 eran linfocitos T $\gamma\delta$. Los ratones IL-17A-/- presentaban una menor carga parasitaria, disminución en la formación del granuloma y una menor acumulación de monocitos y neutrófilos en el hígado, mientras que los esplenocitos reestimulados con antígenos de *L. donovani* mostraban menor producción de IL-4 y mayor producción de IFN- γ en ambos casos a los 15 y 30 días de infección. Los autores sugieren que la producción de IL-17A por los linfocitos T $\gamma\delta$ influye en la formación del granuloma al facilitar la infiltración celular de neutrófilos y monocitos, los cuales están relacionados con el control del parásito en fases crónicas (Terrazas *et al.*, 2016).

Es importante mencionar que no hay reportes sobre la interacción entre linfocitos T $\gamma\delta$ y *L. mexicana*. Un estudio preliminar realizado en nuestro laboratorio reportó únicamente reportó porcentajes de linfocitos T $\gamma\delta$ en diversas cepas de ratones infectados con *L. mexicana*. En ratones BALB/c se encontró que la infección llevó a una disminución en el porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ en el timo y a un aumento en el bazo. En las cepas C57BL/6 (B6) y C3HeB/FeJ (C3H) los linfocitos T $\gamma\delta$ disminuyeron en el timo, aunque en la cepa B6 el porcentaje de células T $\gamma\delta$ aumentó en el bazo, mientras que en la cepa C3H disminuyó en el bazo (García-Ruíz, 2009). Estos datos mostraron que los linfocitos T $\gamma\delta$ responden a *L. mexicana*, sin embargo, no se investigó su función efectora.

De acuerdo a lo anterior, otros estudios revelaron que los linfocitos T $\gamma\delta$ responden ante la infección por *L. major* y *L. donovani* secretando citocinas que podrían contribuir a la resolución de la infección o a su exacerbación. Sin embargo, dado que la respuesta de las células del sistema inmune del hospedero varían de acuerdo a la especie infectante de *Leishmania*, es necesario estudiar el papel de los linfocitos T $\gamma\delta$ en la infección por *L. mexicana* con un estudio de los receptores innatos que puedan estar involucrados en el reconocimiento inicial de los ligandos del parásito.

2.2) Receptores tipo toll de ratón y LPG de *Leishmania*

Los receptores tipo toll (TLR) se descubrieron como el análogo en mamíferos de los receptores Toll presentes en *Drosophila*. Son receptores integrales de membrana que se componen de tres regiones: la región extracelular o ectópica, compuesta por “repeticiones ricas en leucina” (LRR), que suelen tener residuos de aminoácidos hidrofóbicos, una región transmembranal con residuos de aminoácidos sin carga y la región citoplasmática o dominio TIR (*Toll/IL-1 receptor*). Esta última se encuentra altamente conservada tanto en mamíferos como en *Drosophila*, lo cual permitió relacionar ambos receptores y sus vías de señalización con la respuesta inmunológica, ya que el factor de transcripción Relish presente en *Drosophila* regula la inducción de péptidos antibacterianos mediante el dominio TIR del receptor Toll (Botos *et al.*, 2011).

La familia TLR en el ratón se puede clasificar de acuerdo con su ubicación: los TLR1, 2, 4, 5, 6, 10, 11 y 12 se encuentran en la membrana celular y se reclutan al fagosoma después de la activación, mientras que los TLR 3, 7, 8 y 9 se encuentran principalmente en compartimentos intracelulares. Una vez que los TLR reconocen un PAMP se inicia la activación y reclutamiento de moléculas de señalización en el dominio TIR intracelular del TLR, MyD88, TIRAP, TRIF y/o TRAM, las cuales se unen a cinasas (IRAKs) que a su vez se unen a TRAF6, lo cual activa las cinasas del complejo IKK (Singh *et al.*, 2012). Éste a su vez fosforila a las I κ B's (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ y I κ B γ), las cuales liberan el factor de transcripción NF- κ B para su traslocación al núcleo (**Fig. 9**). El NF- κ B regula genes relacionados con la producción de citocinas generalmente proinflamatorias, tales como IL-1, IL-12 o TNF- α (Yamamoto y Gaynor, 2004; Reinhard *et al.*, 2012).

La expresión de los TLRs está codificada en línea germinal y carece de la diversificación presente en otros receptores como el TCR, por lo que el modo de reconocimiento depende de “patrones” comunes presentes en los patógenos (de ahí la importancia de reconocimiento de PAMP's). Los polimorfismos en los TLR's aunado a su capacidad de formar heterodímeros incrementan la cantidad de ligandos reconocidos por los TLRs (Chauhan *et al.*, 2017). Entre estos receptores, el más versátil con respecto al reconocimiento de antígenos es el TLR2, pues en ratones se observó que puede asociarse con el TLR1 o el TLR6. El heterodímero TLR1/2 reconoce lipopéptidos triacilados, como Pam3Cys, mientras que el heterodímero TLR2/6 reconoce lipopéptidos diacilados, como Pam2Cys, el cual carece de la cadena lipídica que se une a la región hidrofóbica del TLR1 (lo cual permite el reconocimiento Pam3Cys-TLR1/2) (Botos *et al.*, 2011). Además, se ha propuesto también que el TLR2 colabora funcionalmente con otros receptores, como el dectin-1, para el reconocimiento del β -glucano, componente de la pared celular micótica (Takeda y Akira, 2005).

El TLR2 reconoce antígenos microbianos de diferente origen, como el péptidoglicano de bacterias Gram positivas, lipoarabinomanano de *Mycobacterium* spp, anclas de GPI de *Trypanosoma cruzi* o la toxina modulina fenol soluble (PSM) de *Staphylococcus epidermis* y glicolípidos de *Treponema maltophilum* (Takeda y Akira, 2005), LPG de *L. major* (Becker *et al.*, 2003) y *L. mexicana* (Zamora-Chimal *et al.*, 2017), entre otros. El TLR2 se expresa en diversas células del sistema inmune, tales como macrófagos, células dendríticas, células cebadas o linfocitos T. Se expresan también en células no inmunes como células epiteliales o fibroblastos (Akira *et al.*, 2006), lo cual manifiesta su potencial durante el reconocimiento innato y adaptativo de un amplio margen de patógenos, como se ha comprobado con el género *Leishmania* a continuación:

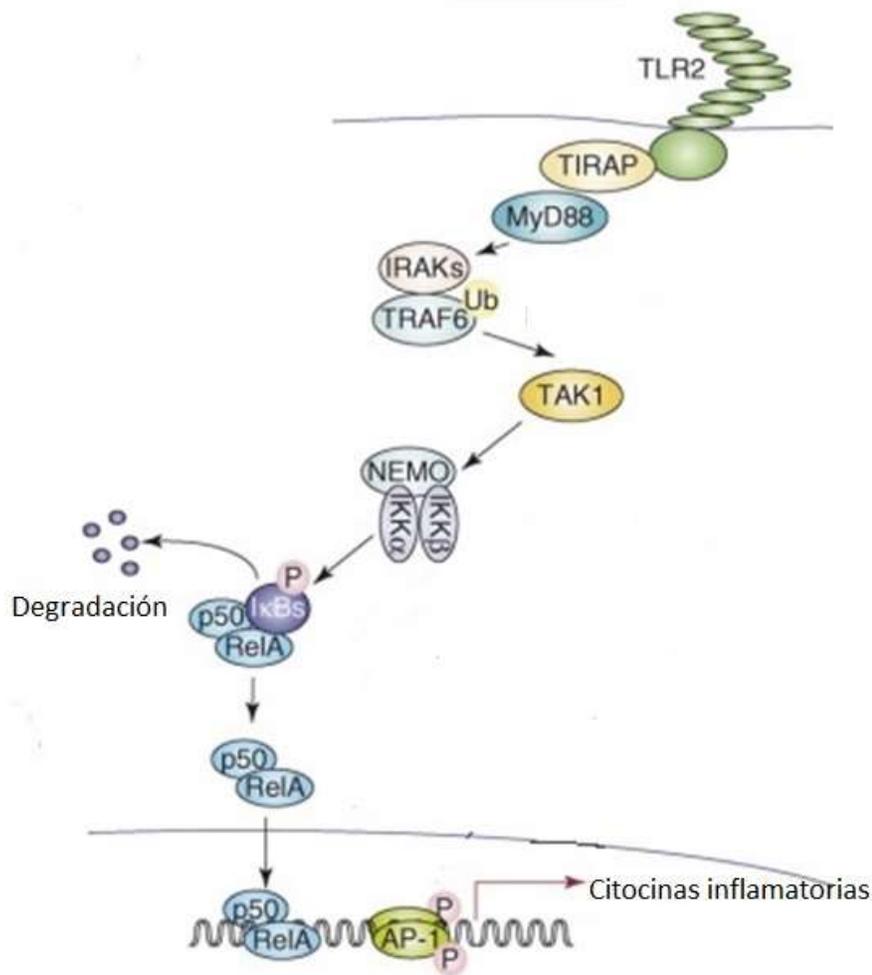


Figura 9. Vía de señalización NF-κB mediante TLR2. Una vez que se reconoce un ligando se inicia la activación y reclutamiento de moléculas de señalización, como MyD88 (TIRAP en caso de homodimerizar con el TLR6), que culmina con la fosforilación de la IκBα, la cual se ubiquitina para su posterior degradación en el proteosoma, liberando el factor de transcripción NF-κB (aquí ejemplificado con las subunidades p50 y RelA) para su posterior traslocación al núcleo. Adaptado de Kawai y Akira, 2007.

Los siguientes antecedentes se enfocan en los reportes del TLR2 de varias poblaciones celulares y el LPG de diversas especies de *Leishmania*:

En un estudio se observó que al incubar células NK de humano con LPG proveniente de promastigotes metacíclicos de *L. major*, aumenta la expresión del mRNA del TLR2 y la sobreexpresión del TLR2. Se cuantificó también una mayor secreción de IFN- γ en células NK co-incubadas con LPG y promastigotes de *L. major*, siendo superior con el LPG metacíclico, mientras que la producción de TNF- α fue muy similar con el LPG metacíclico y procíclico. Adicionalmente a lo anterior, se reportó la translocación del factor NF- κ B en las células co-incubadas durante una hora con 10 μ g/ml de LPG procíclico y metacíclico. En una co-incubación de tres horas se demostró la co-localización del TLR2 de las células NK con el LPG de *L. major*. Esto reveló que el LPG puede ser reconocido por el TLR2 en las células NK, llevando a su activación y a la producción de citocinas inflamatorias. La activación de este receptor fue asociada a las unidades repetidas de fosfoglicanos de la molécula de LPG (Becker *et al.*, 2003).

El modelo murino C57BL/6 KO para MyD88 (proteína adaptadora que ejerce un papel central en las vías de transducción de la familia TLR/IL-1R) mostró ser más susceptible a la infección por *L. major*, sugiriendo un papel crítico de la señalización por TLRs al inicio de la respuesta inmune, ya que MyD88 se encarga de iniciar una serie de eventos de señalización que llevan a la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias. Así mismo, se demostró que la activación de NF- κ B y la producción de TNF- α en macrófagos de la línea RAW-ELAM estimulados con LPG de *L. tropica*, *L. mexicana* y *L. aethiopica*, era mayor que cuando eran estimulados con el LPG de *L. major*. Los autores muestran que el LPG es un agonista del TLR2 y que la vía de señalización por TLR juega un papel importante en la resistencia contra *L. major* (de Veer *et al.*, 2003).

Otro reporte realizado con las cepas de ratón C57BL/6 y BALB/c mostró que el estímulo *in vitro* con 10 μ g/ml de LPG de *L. mexicana* en células cebadas provenientes de médula ósea induce una mayor expresión del TLR2, producción de IL-10, TNF- α y MIP-1 α y desgranulación en la cepa C57BL/6 que en BALB/c. Lo anterior podría indicar que parte de la susceptibilidad de la cepa BALB/c se atribuye a un mayor número de células cebadas desgranulando durante tiempos tempranos de infección (Villaseñor-Cardoso *et al.*, 2008).

Un estudio con macrófagos de la línea celular J774.1A proveniente de la cepa BALB/c indicaba que la co-incubación con 1 μ g/ml de LPG de *L. major* inducía la producción de óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) en los macrófagos, observándose una mayor producción en los macrófagos estimulados con LPG soluble al compararlo con LPG de membrana. Sin embargo, un tratamiento previo con un anticuerpo α -TLR2 redujo la producción de NO en los macrófagos estimulados con LPG (tanto con sLPG y mLPG) y este efecto no se observó con el anticuerpo α -TLR4, lo cual indica que la producción de NO depende del reconocimiento del LPG de *L. major* por el TLR2. Este estudio sugirió

también la participación de otros receptores dado que la producción de NO no fue eliminada por completo con el tratamiento α -TLR2 (Kavoosi *et al.*, 2009).

Otro estudio reveló que la expresión del LPG es distinta entre cepas virulentas y no virulentas de *L. major*. El tratamiento de ratones BALB/c con el ligando del TLR2 (peptidoglicano, PG), antes de la infección con cepas virulentas y no virulentas de *L. major* mostró una mayor cantidad de amastigotes en el interior de los macrófagos infectados con la cepa menos virulenta, lo cual indicó que el reconocimiento por TLR2 incrementó la supervivencia del parásito en el interior del macrófago. Así mismo, los macrófagos de ratones infectados con la cepa virulenta de *L. major* disminuyeron su expresión del TLR9. Esto mismo ocurrió en ratones inoculados con ligandos del TLR2 (PGN o Pam3CSK4). La inoculación de anticuerpos α -TLR2 y α -LPG en los ratones infectados no modificó la expresión de TLR9, aunque redujo la carga parasitaria en el nódulo linfático, el grosor del cojinete plantar y el número de amastigotes en los macrófagos, lo cual demostró que la disminución del TLR9 se debía a la actividad del TLR2. Este estudio demostró que mayor cantidad de LPG y su reconocimiento por TLR2 ayuda a la supervivencia de cepas virulentas en el macrófago al disminuir la expresión del TLR9 (Srivastava *et al.*, 2013).

Un trabajo realizado en ratones C57BL/6 TLR2^{-/-} infectados con promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* mostraron lesiones más grandes, controlaron sus infecciones en etapas más prolongadas y cursaron con mayores niveles de IL-10, IL-4 e IL-13 en el nódulo linfático que ratones silvestres. En contraste, los ratones C57BL/6 TLR2^{-/-} infectados con promastigotes de *L. major* lograron sanar. Asimismo, al infectar ratones C57BL/6 TLR2^{-/-} con promastigotes de *L. mexicana* LPGI^{-/-} (que carecen del dominio de fosfoglicanos) se notó que los ratones desarrollaban lesiones comparables a los ratones silvestres. No obstante, los parásitos LPGI^{-/-} sí expresan un LPG de superficie incompleto manteniendo el ancla lipídica de GPI, el cual puede ser reconocido por TLR2. Este estudio no pudo descartar que la activación del TLR2 por LPG es responsable del control de la replicación de *L. mexicana* (Halliday *et al.*, 2016).

Un estudio *in vitro* de células dendríticas estimuladas con LPG de *L. mexicana* demostró una co-localización de LPG y TLR2 asociado a una fosforilación de I κ B α en ratones de las cepas C57BL/6 y BALB/c. Se encontraron ligeras diferencias entre las cepas de ratón: la cepa C57BL/6 mostró un mayor incremento en las moléculas coestimuladoras CD86 y CD40, en la expresión de MHC II y CD1d y una mayor secreción de IL-12p70 y TNF- α por células dendríticas. Así mismo, la coincubación de células NKT con las células dendríticas estimuladas con LPG durante 48 h también generó una mayor producción de IFN- γ por las NKT en ratones C57BL/6, lo cual se relacionó con la secreción de IL-12p70 por parte de las células dendríticas. Lo anterior indica que el LPG de *L. mexicana* activa a las células NKT a través de una vía indirecta con la estimulación del TLR2 (Zamora-Chimal *et al.*, 2017).

2.3) Justificación

La transmisión del género *Leishmania* ocurre a través de las lesiones provocadas en la piel por el vector y la inoculación posterior de los promastigotes, cuya superficie está compuesta principalmente por LPG, que protege al parásito del sistema del complemento, aunque también es el ligando de los receptores TLR2 de las células del sistema inmune. El reconocimiento del LPG por TLR2 activa a las células, induciendo la secreción de citocinas que pueden favorecer la resolución de la infección mediante la activación de los macrófagos infectados, o bien por la polarización de la respuesta inmune hacia un fenotipo Th1 (IFN- γ , IL-12p70) con inflamación local provocada por TNF- α . Por otro lado, la activación puede también polarizar la respuesta inmune hacia un fenotipo Th2 (IL-4), favoreciendo la progresión de la enfermedad. Aun se desconoce el papel que desempeñan los linfocitos T $\gamma\delta$ en esta polarización.

Los linfocitos T $\gamma\delta$ pertenecen al linaje linfoide, aunque también presentan características “innatas” con capacidad de reconocer PAMPs, DAMPs, antígenos fosfatados y lipídicos mediante su TCR sin intervención de una célula presentadora de antígenos, o mediante receptores innatos como los TLR. Su función efectora abarca desde la producción de citocinas hasta la actividad citotóxica. Estudios previos han revelado datos contradictorios sobre su posible papel en infecciones por *Leishmania*, debido posiblemente al uso de distintas especies de *Leishmania*, distintas cepas de ratón, distintos modelos *in vivo* e *in vitro* y variaciones en el análisis de citocinas y tiempos de infección. Por otra parte, no se han estudiado los mecanismos de activación de linfocitos T $\gamma\delta$ por *L. mexicana*.

Dado que los linfocitos T $\gamma\delta$ son células abundantes de la dermis y la epidermis que pueden reconocer componentes lipídicos y grupos fosfatos de LPG del parásito a través de receptores innatos como los TLR, estas células posiblemente juegan un papel decisivo en la inducción de la respuesta inmune en infecciones por *L. mexicana*. El presente proyecto estudiará si los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden ser activados por *L. mexicana* a través del reconocimiento de LPG del parásito por el receptor TLR2.

3) Hipótesis

Los linfocitos T $\gamma\delta$ reconocen el LPG de *L. mexicana* a través del TLR2, lo cual induce su activación.

4) Objetivos

4.1 Objetivo general

Analizar el efecto del LPG de *L. mexicana* sobre la activación a través del TLR2 de los linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos de ratones BALB/c.

4.2 Objetivos particulares

- Observar si el LPG de *L. mexicana* es reconocido por los linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo a través del TLR2.
- Analizar la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en los linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo estimulados con LPG de *L. mexicana*.
- Analizar la producción de IL-17, IFN- γ , TNF- α e IL-4 por los linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo estimulados con LPG de *L. mexicana*.
- Analizar la expresión del TLR2 y el reconocimiento de LPG de *L. mexicana* en los linfocitos T $\gamma\delta$ de la dermis de la oreja de ratones BALB/c.
- Analizar la producción de TNF- α e IL-4 por los linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis de ratón por el estímulo de LPG de *L. mexicana*.

5) Metodología

5.1 Material biológico:

5.1.1 Ratones de laboratorio

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 10 a 12 semanas de edad, provenientes del bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, que se encuentra en el Hospital General de México. La crianza y mantenimiento de los ratones se llevó a cabo siguiendo las directrices nacionales de ética para la salud animal estipuladas en la NOM-062-ZOO-199.

Para observar el fenómeno de colocalización en células de bazo se utilizaron ratones hembras de 12 semanas de edad para obtener una suspensión celular enriquecida de linfocitos T $\gamma\delta$, la cual se dividió en las condiciones experimentales que son explicadas en la sección 5.2. Para analizar la expresión del TLR2 y su reconocimiento de LPG en linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis de oreja, se emplearon ratones macho a partir de las 12 semanas de edad, como se explica en la sección 5.3.

5.1.2 Cultivo de promastigotes de *L. mexicana* en medio M199

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c previamente infectados con 1×10^6 de promastigotes de *L. mexicana* en el cojinete plantar. El ratón fue sacrificado mediante dislocación cervical, la lesión generada en el sitio de infección se desinfectó con alcohol al 70% y se le realizó un aspirado mediante una jeringa de insulina de 0.5 ml con PBS, pH 7.4, el cual fue transferido a medio de cultivo M199 suplementado SFB (Biowest, cat. S1650-500) al 10%.

Se tomó 1 mL de cultivo en fase estacionaria, la cual se encuentra aproximadamente en el día cinco de cultivo, y se centrifugó a 3500 RPM durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante para resuspender el precipitado en 1 mL de PBS. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se resuspendió en 1 mL de amortiguador fosfato salino (PBS). El procedimiento anterior se repitió y se tomó una alícuota para realizar una dilución 1:10 con glutaraldehído y contar a los parásitos en una cámara de Neubauer. Al final se utilizaron 2×10^6 promastigotes en fase estacionaria para realizar la infección en la oreja, de acuerdo a la metodología 5.3.

5.2 Enriquecimiento de los linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo de ratón

Se sacrificaron tres ratones hembras BALB/c de 12 semanas mediante dislocación cervical y en condiciones asépticas. Se les extrajo el bazo y se colocaron en 3 ml de PBS pH 7.4 con 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, cat. 15070063). Los bazos se disgregaron con PBS en una malla metálica de 150 μm , se recuperó la suspensión celular, se llevó a un volumen de 15 ml de PBS y se centrifugó con un ciclo de 2000 RPM durante 10 minutos a 4 °C. El ciclo anterior se utilizó cada vez que se lavó la muestra con PBS (lavado de células).

Posteriormente se realizó un gradiente de densidad con Histopaque® (Sigma-aldrich cat. 10771) para separar las células mononucleares, centrifugando a 2000 RPM durante 20 minutos a 20 °C con desaceleración baja para no romper el gradiente. La interfase de células mononucleares fue aspirada, se lavó dos veces con PBS frío, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en solución lítica para eliminar eritrocitos, incubándose durante 10 minutos a 4 °C. Se realizaron dos lavados con PBS y el precipitado se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo RPMI suplementado al 10% con SFB, del cual se tomó una alícuota para realizar un conteo celular, utilizándose azul tripano como marcador vital.

Para enriquecer la población de linfocitos T $\gamma\delta$ se utilizaron columnas inmunomagnéticas del kit “TCR γ/δ + T Cell Isolation” (Miltenyi Biotec, cat. 130-092-125). La metodología de uso del kit consiste en dos selecciones, la primera es negativa y la segunda positiva. Antes de la selección negativa se marcan las células con el cóctel “Non-T Cell Depletion Cocktail” que se compone de dos anticuerpos: (1) “ α -TCR $\gamma\delta$ -Biotin”, para marcar indirectamente a la población de linfocitos T $\gamma\delta$ con biotina y (2) “ α -CD45R y α -CD11B microbeads (microperlas)”, el cual está acoplado a perlas inmunomagnéticas y reconoce a la población mieloide (células dendríticas y macrófagos, principalmente), la cual se adhiere a la columna durante la selección negativa realizada en el separador MACS.

Después de la selección negativa se colectó el eluyente, se lavó y se agregó el anticuerpo α -biotin acoplado a microperlas, el cual se une a los linfocitos T $\gamma\delta$ previamente acoplados con biotina; de esta forma los linfocitos T $\gamma\delta$ se adhieren a la columna magnética y se eluyen otras poblaciones celulares. Al final se remueve la columna del separador para lavar con PBS y recolectar el eluyente con la muestra final de los linfocitos T $\gamma\delta$.

5.2.1 Pureza de muestra de los linfocitos T $\gamma\delta$ enriquecidos de bazo

Para estimar la pureza de la muestra de los linfocitos T $\gamma\delta$ previamente enriquecidos se utilizó la técnica de citometría de flujo. Se fijaron 200,000 células por condición en paraformaldehído al 2% durante media hora a 4 °C. Se lavaron a 2000 RPM por 10 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se realizó la tinción extracelular: los linfocitos T $\gamma\delta$ se marcaron con anticuerpos conjugados α -TCR $\gamma\delta$ con alofococinina (APC) hecho en hámster (1:50) (Biolegend, cat. 118115) y α -CD3 con ficoeritrina (PE), hecho en rata (1:50) (Biolegend, cat. 100206). Se utilizaron los controles de autofluorescencia e isotipos (1:50 cada uno) IgG de hámster con APC (BD Pharmingen, cat. 553954) e IgG de rata en PE (BD Pharmingen, cat. 553925). Las muestras se incubaron durante 30 minutos, se realizaron dos lavados, se resuspendieron en PBS y se colocaron en tubos de citometría hasta su lectura en el citómetro de flujo (Becton Dickinson, FACS Canto II).

5.2.2 Colocalización del TLR2 de linfocitos T $\gamma\delta$ estimulados con LPG

Para realizar este experimento y los posteriores, fue necesario utilizar un anticuerpo primario α -LPG generado previamente en el laboratorio (Zamora-Chimal *et al.*, 2017). Se plaquearon 400 mil linfocitos T $\gamma\delta$ en una placa de fondo plano de 96 pozos y se incubaron a 37 °C durante 12 horas. A excepción del control “sin estímulo”, se estimularon las células durante tres horas con 10 μ g/mL de LPG de *L. mexicana*. Posteriormente se realizó un lavado con PBS a 2000 RPM durante 10 minutos a 4 °C, posteriormente bloquearon los receptores Fc de las células con suero de cabra al 10% durante 10 minutos a 4 °C. Después se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante media hora a 4 °C. Las muestras se lavaron con PBS antes de realizar la marca de receptores extracelulares con el anticuerpo conjugado α -TCR $\gamma\delta$ con APC hecho en hámster (1:50) y con los anticuerpos primarios α -LPG hecho en ratón (1:25) y α -TLR2 hecho en cabra (1:25) (Santa Cruz Biotechnology, cat. 16237), incubando durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente las muestras se lavaron con PBS y se resuspendieron con los anticuerpos secundarios, incubándose durante 30 minutos a 4 °C: α -IgG de ratón acoplado con PE hecho en cabra (1:50, para marcar el α -LPG) (BD Pharmingen, cat. 550589), α -IgG de acoplado con FITC hecho en conejo (1:50, para acoplarse al α -TLR2) (Zymed, 81-1611). Se utilizaron controles de autofluorescencia, isotipo (IgG de hámster con APC, 1:50), controles primarios, como α -LPG hecho en ratón (1:25) y α -TLR2 hecho en cabra (1:25), y secundarios como α -IgG de ratón acoplado con PE hecho en cabra (1:50) y α -IgG de conejo acoplado con FITC hecho en cabra (1:50). Las muestras se lavaron dos veces con PBS y se colocaron en un portaobjetos, se dejaron secar y se les agregó DAPI (Sigma-Aldrich, cat. 0381) para realizar la contratinción de los núcleos. Se colocó un cubreobjetos, se sellaron los bordes con barniz y se protegieron de la luz antes de tomar las imágenes en el microscopio confocal Leica (Leica-Microsystems); se utilizó el programa LAS X (Leica-Microsystems) para el conteo de células positivas.

5.2.3 Cinética de fosforilación de I κ B α en los linfocitos T $\gamma\delta$

Los linfocitos T $\gamma\delta$ se estimularon con 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPG y 10 $\mu\text{g/mL}$ de PG (peptidoglicano de bacterias Gram-negativas utilizado como control positivo para TLR2) a diferentes tiempos: 5, 15, 30 y 60 minutos. Después se fijaron con BD Citofix/CytopermTM (BD Biosciences, cat. 554655) y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Para los controles se fijaron células sin estímulo. Se lavaron las muestras y se resuspendieron en suero de cabra al 10% durante 10 minutos a 4 °C para el bloqueo del pegado inespecífico. Después se lavaron con PBS, se decantó el sobrenadante y se realizó la tinción extracelular con el anticuerpo conjugado α -TCR $\gamma\delta$ con APC hecho en hámster (1:50). Posteriormente se realizaron dos lavados con Perm Wash (BD Biosciences, cat. 554723) para permeabilizar las células y marcarlas con el anticuerpo primario α -Phospho-I κ B α hecho en ratón (1:50) (Cell Signaling Technology, cat. 9246), incubando durante 30 minutos a 4 °C. Se lavaron dos veces con Perm Wash y se realizó la tinción con el anticuerpo secundario α -IgG de ratón acoplado con FITC hecho en conejo (1:50) (DAKO, F-0261). Se utilizaron muestras sin estímulo para el control de autofluorescencia, isotipo IgG de hámster con APC (1:25), control primario α -Phospho-I κ B α hecho en ratón (1:50) y secundario α -IgG de cabra acoplado con FITC (1:50), incubando por 30 minutos a 4 °C. Después se lavaron dos veces con Perm Wash y resuspendieron en PBS, se colocaron en un portaobjetos, se dejaron secar, se agregó DAPI para la contratinción de los núcleos, se colocó un cubreobjetos y se sellaron los bordes con barniz. Se tomaron las imágenes en el microscopio confocal Leica y se utilizó el programa LAS X (Leica-Microsystems) para el análisis (Apéndice 10.1.3).

5.2.4 Producción de TNF- α , IL-4, INF- γ e IL-17 en T $\gamma\delta$ de bazo

La suspensión enriquecida de los linfocitos T $\gamma\delta$ se plaqueó en medio RPMI con SFB al 15% y se incubó durante cuatro horas a 37 °C con CO² al 5%. Se agregó 1 μL de Brefeldina A (BD Pharmingen, cat. 555029) a todas las muestras y se estimularon por separado con 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPG o 10 $\mu\text{g/mL}$ de PG durante 8 horas. Después se lavaron con PBS y se realizó la tinción extracelular con anticuerpos conjugados: α -TCR $\gamma\delta$ con APC hecho en hámster (1:50) y α -CD3 con PE hecho en rata (1:50). Las muestras y sus controles (apéndice 10.2) se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se realizaron dos lavados con PBS. Para iniciar la tinción intracelular se fijaron con Cytofix (BD Biosciences, cat 554655) durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente se lavaron dos veces con Perm Wash y se dividieron en dos para incubarse con los siguientes anticuerpos conjugados durante 30 minutos a 4 °C, todos en dilución 1:50 y hechos en rata: α -IL-4 con PeCy7 (BD Pharmingen, cat. 509117), α -TNF- α con PerCP-Cy5.5 (Biolegend, cat. 506322) y α -IFN- γ con Pacific Blue (BD Pharmingen, cat. 505818), mientras que la otra mitad se marcó con α -IL-17 con PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen, cat. 508120). Se lavaron con Perm Wash hasta resuspender las células en PBS, después se colocaron en tubos de citometría y se leyeron en el citómetro FACS Canto II.

5.3 Reconocimiento de LPG de *L. mexicana* por linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis de oreja

Para este experimento se buscó analizar el fenómeno *in vivo* con células de dermis de oreja de ratón BALB/c. Los ratones fueron anestesiados con isoflorano e inoculados de manera subcutánea en ambas orejas con jeringas de insulina de un calibre de 31G x 3mm con PBS, LPG (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o parásitos (2×10^6 promastigotes) en un volumen de 10 μL (**Fig. 10, B**). Para los controles se utilizaron orejas de ratones sin tratamiento. Una hora después, se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical, se cortó cada oreja desde su base (**Fig. 10, C**), se cubrieron por completo con crema depilatoria y se dejaron a temperatura ambiente de cinco a diez minutos (**Fig. 10, D**). Después se retiró el exceso de crema depilatoria con una gasa con PBS (**Fig. 10, E**) y se realizaron tres lavados en placas Petri con 5 mL de PBS suplementado al 10% con SFB y 1% de penicilina/estreptomicina, moviendo las orejas y transfiriéndolas a placas nuevas con PBS limpio (**Fig. 10, F**). Se realizó la separación de láminas dérmicas (**Fig. 10, H**) y se cortaron en cuatro pedazos con tijeras estériles (**Fig. 10, I**).

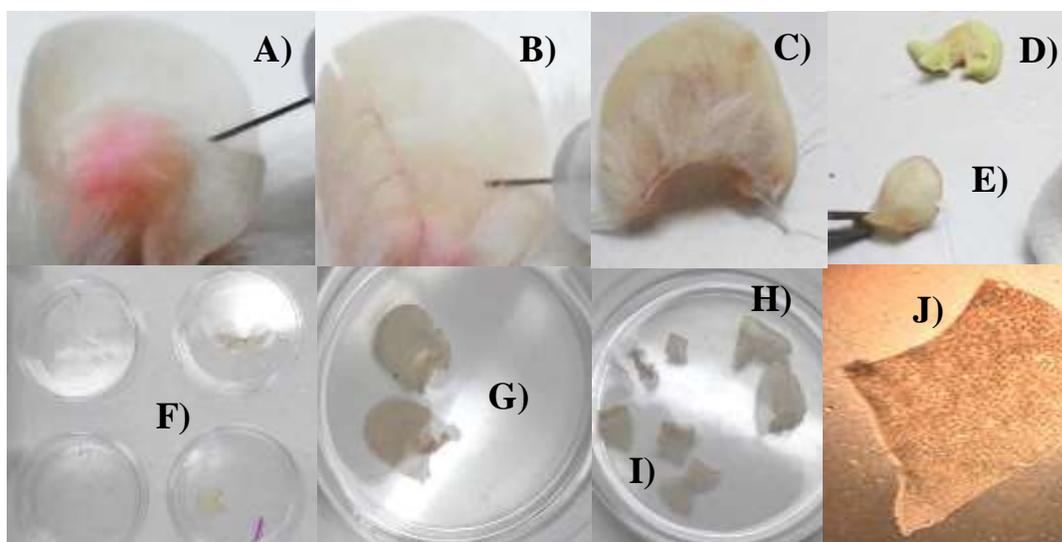


Figura 10. Tratamiento y obtención de orejas de ratón. Inóculo con 10 μL de PBS con colorante vegetal para ilustrar el sitio de inóculo **A**). Resumen de la obtención de orejas: Inoculación con 10 μL de PBS comercial, LPG o promastigotes **B**). Corte de orejas desde la base **C**). Tratamiento con crema depilatoria **D**) y limpieza de orejas con gasas húmedas con PBS **E**). Lavados con PBS **F**). Orejas limpias antes de separar **G**). Una oreja separada en cara ventral y dorsal **H**) y ambas partes cortadas en cuatro partes **I**). Dermis separada de la epidermis después de una hora de incubación con medio RPMI con EDTA 10mM **J**).

Las orejas se transfirieron a microtubos con 1 mL de medio RPMI pH 7.4 a 10 mM de EDTA, 4.5 g/L de glucosa, 10% SFB y se incubaron durante una hora a 37 °C con CO² al 5%. Las orejas se transfirieron a una placa Petri con 5 mL del medio RPMI a 10 mM de EDTA a temperatura ambiente, la cual se colocó en un microscopio estereoscópico para realizar la separación de dermis-epidermis: se utilizaron agujas de jeringas de insulina de un calibre de 27G x 13mm para levantar la epidermis, separando la dermis en un microtubo con RPMI suplementado al 10% con SFB y 1% de penicilina/estreptomicina. Se depositó la dermis en 500 µL de colagenasa de *Clostridium histolyticum* al 0.0025%, (Sigma-Aldrich, cat. C5138-1G) y tripsina tipo IX al 0.1% (Sigma-Aldrich, cat. T-0134) al 4 mM de EDTA, y se incubó a 37 °C por 20 minutos con CO² al 5%. Las muestras se depositaron en un recipiente con hielo antes de macerar el tejido, para lo cual se colocó un cell strainer de 40 µm (Corning cat. 431750), se humedeció con RPMI a 10 mM de EDTA y se depositó el contenido de colagenasa con dermis. El tejido se maceró con un émbolo estéril por tres minutos, enjuagando con RPMI a 10 mM de EDTA y macerando dos veces más. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 2000 RPM durante 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenante y se resuspendió el precipitado en 500 µL de RPMI con SFB al 10%.

5.3.1 Expresión de TLR2 en linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis

A partir de la suspensión celular obtenida de la dermis de oreja descrita en la sección 5.3, cada muestra se resuspendió durante un minuto y se transfirió la mitad del volumen a otro microtubo, después se fijaron con paraformaldehído al 2% por media hora a 4 °C. Se lavaron con PBS y se centrifugaron a 2000 RPM durante 10 minutos a temperatura ambiente, se decantaron y se incubaron en anticuerpo α -CD16/CD32 (1:100) (eBioscience 14-0161-85) toda la noche para el bloqueo de pegado inespecífico. Al día siguiente se lavaron las muestras (LPG, parásitos, sin estímulo y PBS), se dividieron en dos y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con los siguientes anticuerpos: la mitad se marcó con los anticuerpos conjugados α -TCR $\gamma\delta$ con APC hecho en hámster (1:50) y α -CD3 con PE hecho en hámster (1:50) (Biolegend, cat. 100308), y la otra mitad se marcó con el anticuerpo conjugado α -TLR2 con AlexaFluor 488 hecho en ratón (1:25) (BioLegend, cat. 121807) y el anticuerpo primario α -LPG hecho en ratón (1:25). Se realizaron controles de autofluorescencia, isotipos IgG de hámster con APC (1:50), IgG de hámster con PE (1:50) (BD Pharmingen, cat. 550085), IgG de ratón con FITC (1:50) (BD Pharmingen, cat. 555748) y un control secundario α -IgG de ratón acoplado con Cy3 hecho en cabra (1:100). Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS y las muestras incubadas con el anticuerpo α -LPG se resuspendieron con el anticuerpo secundario α -IgG de ratón acoplado con Cy3 hecho en cabra (1:100, para acoplarse al α -LPG) (Biolegend, cat. 405309), incubando durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS, se resuspendieron en PBS y se colocaron en tubos de citometría, almacenándose a 4 °C hasta su lectura en el citómetro FACS Canto II.

5.3.2 Inmunofluorescencia: Producción de TNF- α e IL-4 en dermis

Para el análisis de la producción de citocinas se anestesiaron ratones BALB/c con isofluorano, se inocularon de manera subcutánea PBS, LPG (10 μ g) o parásitos (2×10^6 promastigotes) en un volumen de 10 μ L en ambas orejas con jeringas de insulina de un calibre de 31G x 3mm durante 12 horas. Para los controles de isotipo, secundario y autofluorescencia se utilizaron orejas de ratones sin tratamiento. Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, se les cortaron las orejas en condiciones asépticas y se cubrieron con crema depilatoria por cinco a diez minutos. Después se retiró el exceso de crema y se lavaron las orejas en placas con 5 mL de PBS suplementado al 10% con SFB y 1% de penicilina/estreptomicina.

Se insertó cada oreja en posición vertical en una cámara llena de OCT rotulada y se almacenaron a -70 °C. Cada bloque de OCT fue cortado en un criostato a -27 °C, los tejidos se montaron en portaobjetos tratados y se fijaron en acetona a -20 °C por 10 minutos. Se dejaron secar antes de delimitar cada muestra con un plumón de cera, y se realizaron tres lavados con PBS antes de bloquear con BSA al 5%, α -Fc 1:50 y suero de rata al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se sacudió el bloqueo y se lavaron las muestras (tres por condición, LPG, parásitos, sin estímulo y PBS) tres veces con PBS antes de marcar con los siguientes anticuerpos conjugados: α -TCR $\gamma\delta$ con APC hecho en hámster (1:25), α -CD3 con PE hecho en hámster (1:50), α -TNF- α con FITC hecho en rata (1:50) (Biolegend, cat. 506303), o α -IL-4 con FITC hecho en rata (1:50) (BD Pharmingen, cat. 557728). Los controles fueron: de autofluorescencia e isotipo (1:50 cada uno) IgG de hámster con APC, IgG de ratón con PE e IgG de rata con FITC (BD Pharmingen, cat. 553929) y se procesaron aparte. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en una cámara protegida de la luz. Se retiró el anticuerpo, se lavaron tres veces con PBS antes de agregar DAPI sobre cada muestra, después se colocó un cubreobjetos y se sellaron los bordes con barniz. Las muestras se colocaron en una cámara húmeda a 4 °C y se protegieron de la luz antes de ser leídas en el microscopio confocal Nikon A1 A1 HD25 / A1R HD25. Se obtuvieron 10 imágenes a 40X de cada muestra y se analizaron con el programa fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

5.4 Análisis de resultados

Se utilizó el programa FlowJo™ para el análisis de todos los datos del citómetro de flujo FACS Canto II, y el programa Prism GraphPad sexta versión para Windows 10 para realizar el análisis estadístico de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney junto con el método de comparaciones múltiples de Dunnett. Se utilizó también el programa LAS X, de Leica-Microsystems para el análisis de imágenes obtenidas en el microscopio confocal Leica, y se utilizó el programa Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) para analizar las imágenes obtenidas en el microscopio confocal Nikon A1.

6) Resultados

6.1 Linfocitos T $\gamma\delta$ enriquecidos de bazo de ratón

6.1.1 Colocalización del TLR2 de linfocitos T $\gamma\delta$ estimulados con LPG

Primero se analizó el reconocimiento del LPG de *L. mexicana* por el TLR2 de linfocitos T $\gamma\delta$. Para esto se incubaron linfocitos T $\gamma\delta$ con LPG durante 3 horas y se realizó un conteo de 100 células positivas a los marcadores (**Fig. 11**): se observó que del total células positivas al TCR $\gamma\delta$, un 74.4 % se unió al LPG, y de este porcentaje, la unión ocurrió mediante el TLR2 del 56.2 % de las células, es decir, colocaliza el TLR2 con LPG. Además se observó un 18% de células que se unieron al LPG sin involucrar al TLR2. Todo lo anterior indica que los linfocitos T $\gamma\delta$ poseen la capacidad de unirse al LPG, y de estos, la mayoría lo reconoce a través de su TLR2.

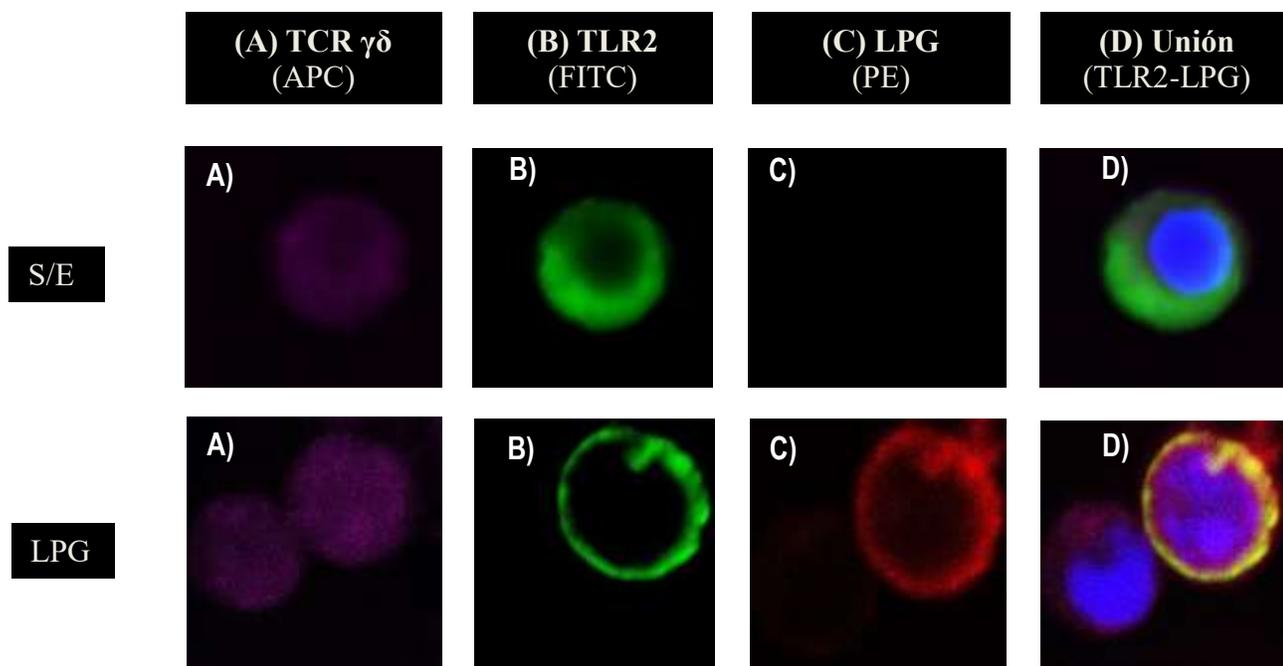


Figura 11. Colocalización de TLR2 y LPG en linfocitos T $\gamma\delta$. La fila superior muestra el control sin estímulo (S/E) y la fila inferior muestra las células estimuladas con LPG. En la columna A se muestra la tinción del “TCR $\gamma\delta$ ” en morado (APC), en la columna B se muestra la tinción del “TLR2” en verde (FITC), en la columna C se muestra la tinción del “LPG” en rojo (PE) y en la columna D se muestra la “Colocalización” en amarillo, que resulta de la suma del verde (TLR2) y del rojo (LPG). Los núcleos se observan en azul (DAPI). Imágenes representativas de un experimento único.

6.1.2 Activación de la vía del TLR2 de linfocitos T $\gamma\delta$ estimulados con LPG mediante la fosforilación de I κ B α

Después de que se determinó el reconocimiento del LPG por el TLR2 de los linfocitos T $\gamma\delta$, se buscó la fosforilación de I κ B α como evidencia de la activación de la vía del TLR2. El control sin estímulo en los diferentes tiempos mostró una fosforilación basal entre el 10 y 14 % de las células, que no superó a ninguno de los estímulos. Para las células estimuladas con LPG se observó fosforilación a los 15 minutos con un 59.4 %, la cual decae a los 30 minutos con 32.7 % y vuelve a aumentar a los 60 minutos con un 67.5 % de las células mostrando fosforilación de I κ B α . A diferencia de esto, el estímulo con PG mostró un incremento progresivo a partir de los cinco minutos con un 33.3 % hasta los 60 minutos con el 75.2 % de células mostrando I κ B α fosforilado (**Fig. 12**). Por lo tanto, estos datos sugieren que el LPG induce la activación de la vía del TLR2 con dos picos de actividad a los 15 y 60 minutos.

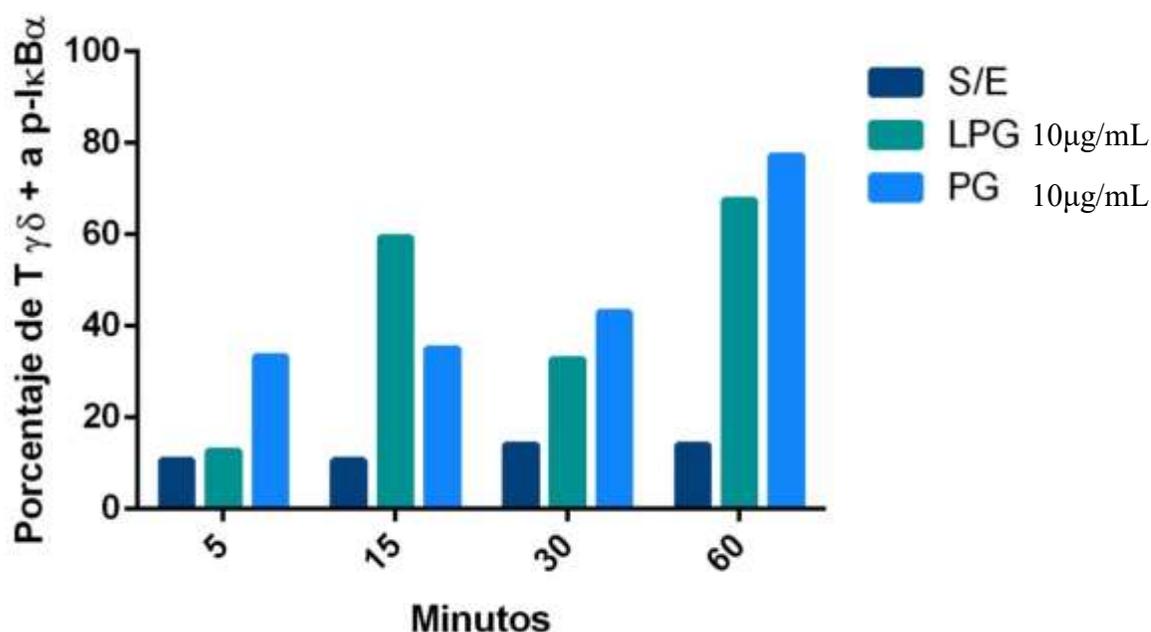


Figura 12. Cinética de fosforilación de I κ B α de linfocitos T $\gamma\delta$ estimulados con LPG. Se estimularon células T $\gamma\delta$ enriquecidas de bazo con LPG durante 5, 15, 30 y 60 minutos, posteriormente se obtuvo un porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ positivos a la fosforilación de I κ B α . El control positivo consistió en linfocitos T $\gamma\delta$ estimulados con peptidoglicano (PG), el cual es un ligando para el TLR2, mientras que el control negativo se generó con linfocitos T $\gamma\delta$ sin estimular, con la finalidad de mostrar la fosforilación basal de la molécula. Datos representativos de un experimento único.

6.1.3 Producción de citocinas intracelulares por los linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo estimulados con LPG

Una vez demostrado el reconocimiento de LPG y activación de TLR2, se buscó evidencia de activación de los linfocitos T $\gamma\delta$ mediante su producción de citocinas. El porcentaje de células con tinción intracelular de IL-17 fue del 4.55 % en el control S/E, mientras que el estímulo con LPG y PG mostró que el 1 % de los linfocitos T $\gamma\delta$ fueron positivos para IL-17 (disminuyendo 4.55 veces en ambos casos). El porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ positivos para IFN- γ fue de 1.64 % en el control S/E, con PG fue del 7.91 % (con 4.82 veces de incremento con respecto al basal), y con el LPG fue de 0.45 % (disminuyendo 3.64 veces con respecto al basal) (**Fig. 13**). Por otro lado, el porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ positivos para TNF- α en el control sin estímulos (S/E) fue del 18 %, mientras que ambos estímulos incrementaron los linfocitos T $\gamma\delta$ positivos para TNF- α : el PG generó 34.5 % (1.91 veces de incremento con respecto al basal) y el LPG generó 32.1 % (1.78 veces de incremento con respecto al basal). Adicionalmente, el porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ positivos para IL-4 fue de 3.28 % en el control S/E, mientras que con ambos estímulos incrementó su número: 21.6 % en la muestra con PG (6.58 veces de incremento con respecto al basal) y 11.2 % con LPG (3.41 veces de incremento con respecto al basal) (**Fig. 13**). Estos resultados sugieren que los linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo de ratón se activan por el reconocimiento del LPG, induciendo una mayor cantidad de células productoras de la citocina proinflamatoria TNF- α , e inesperadamente, también producen la citocina antiinflamatoria IL-4.

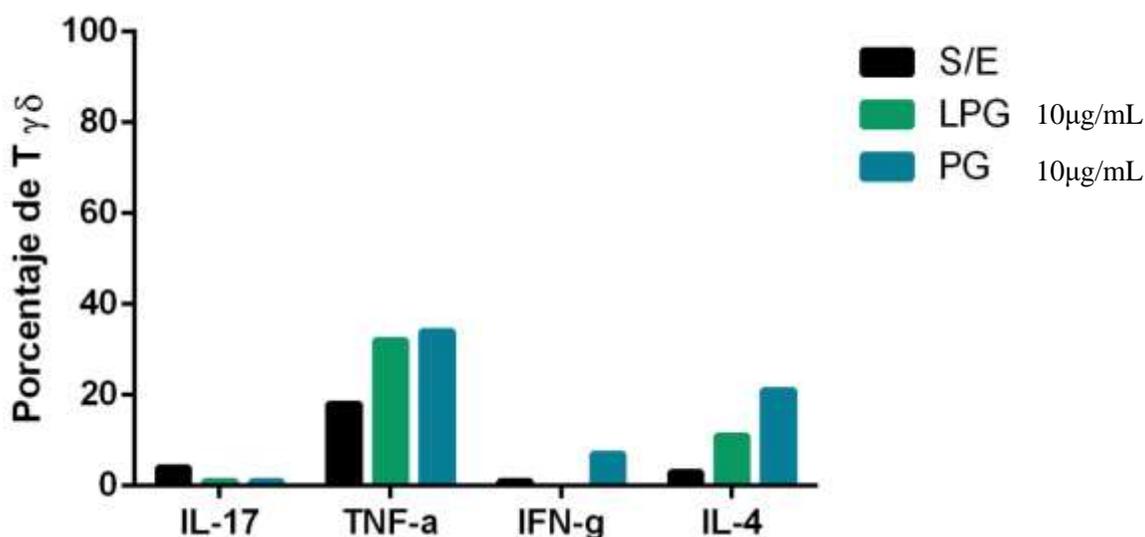


Figura 13. Producción de citocinas por los linfocitos T $\gamma\delta$ estimulados con LPG. Se estimularon células T $\gamma\delta$ enriquecidas de bazo con LPG por 8 horas y posteriormente se cuantificó el porcentaje de células positivas para IL-17, TNF- α , IFN- γ e IL-4. Como control negativo se agregó una condición sin estimular, como control positivo se utilizó PG, debido a que es un ligando para el TLR2. Datos representativos de un experimento único.

6.2 Linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis de oreja de ratón

6.2.1 Reconocimiento del LPG de *L. mexicana* por el TLR2 de linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis

Dado que se había observado el reconocimiento de LPG por TLR2 en linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo, quedó por explorarse si los abundantes linfocitos T $\gamma\delta$ presentes en tejidos epiteliales de la dermis, donde se encuentran entre las primeras células de entrar en contacto con *Leishmania*, responden de la misma manera ante LPG que los T $\gamma\delta$ de bazo. Por lo tanto, se estudió la frecuencia de linfocitos T $\gamma\delta$ reconocidos por el anticuerpo anti-LPG en ratones inoculados con 2×10^6 de promastigotes de *L. mexicana* o con LPG. En este experimento se utilizaron ratones sin estímulo como controles. Se encontró que el 40 % de los linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis se unieron al LPG purificado, y al inocular al parásito se obtuvo que el 22 % de estas células se unieron al LPG del parásito (**Fig. 14**). Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las muestra sin estímulo y las muestras con LPG y *L. mexicana*. Estos datos indican que el LPG purificado o presente en el parásito es reconocido por los linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis.

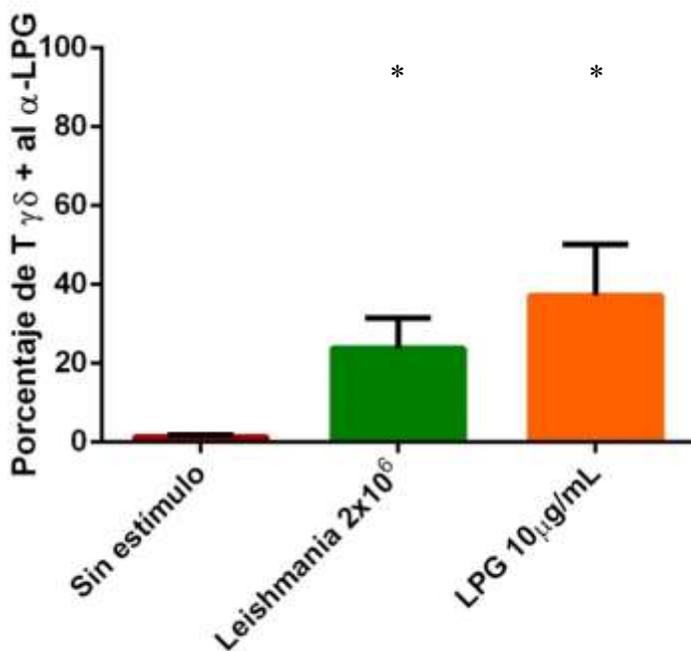


Figura 14. Linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis de oreja positivos al α -LPG. Se inoculó 10 μg de LPG o 2×10^6 parásitos por vía subcutánea en la oreja de ratones, obteniéndose el porcentaje de células que tenían LPG en su membrana después de 1 hr de la aplicación de los inóculos. Como control se utilizaron orejas de ratones sin inocular. Los datos representan la mediana \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes y se consideraron estadísticamente significativos con una $p < 0.05$ (*).

6.2.2 Modulación de la expresión del TLR2 de linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis de oreja de ratón

Teniendo en cuenta el reconocimiento del LPG por los linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis, se analizó la expresión del TLR2 de acuerdo a cada uno de los estímulos anteriores, y adicionalmente se agregó un control negativo donde se inoculó PBS. La expresión basal del TLR2 en el control sin estímulo S/E mostró una intensidad media de fluorescencia (IMF) de 2416. En el control de PBS se obtuvo una IMF de 2207, observándose una disminución de 1.09 veces. En contraste, el inóculo de PG aumentó la expresión del TLR2 a una IMF de 3266 (con un incremento de 1.35 veces con respecto al S/E). Por otro lado, el inóculo de parásitos obtuvo una IMF de 1521, representando una disminución de 1.58 veces con respecto al S/E, mientras que el de LPG obtuvo una IMF de 1436 con una disminución de 1.68 veces con respecto al S/E, por lo que ambos inóculos mostraron una reducción en la expresión del TLR2 (**Fig. 15**). Tomando en cuenta lo anterior, los resultados sugieren que a pesar de activar la vía de TLR2, el LPG y los parásitos inducen una disminución de la expresión del TLR2 en los linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis.

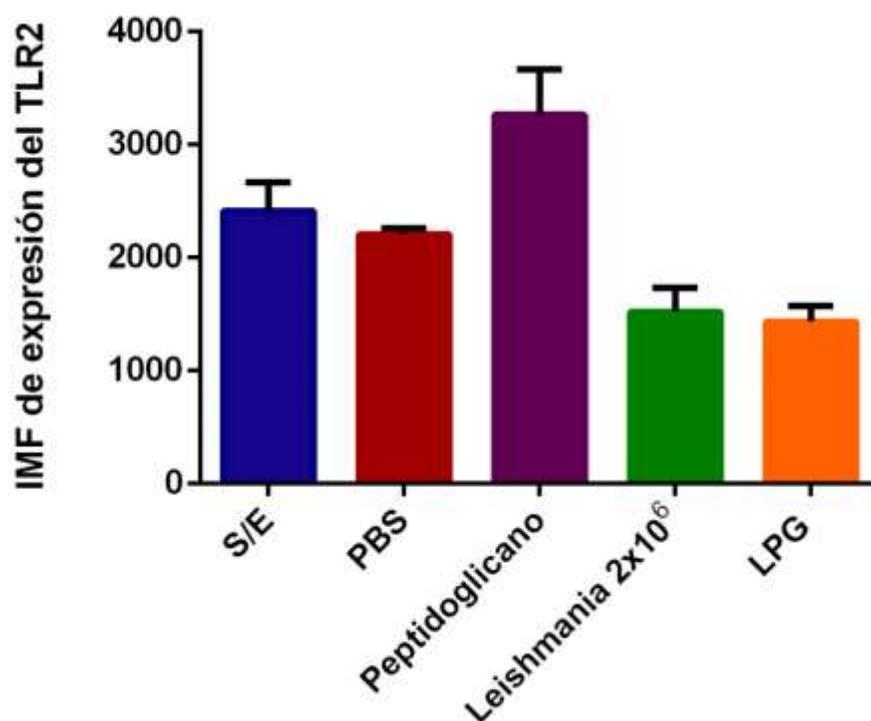


Figura 15. Expresión del TLR2 en linfocitos T $\gamma\delta$ de oreja de ratón. Se inocularon ratones BALB/c durante una hora con diferentes estímulos: Los controles negativos consistieron de ratones sin estímulo (S/E) e inoculados con PBS, mientras que el control positivo fue el peptidoglicano (PG) y las condiciones experimentales fueron 10 μ g de LPG o 2×10^6 parásitos. Los datos representan la IMF del TLR2 \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

6.2.3 Porcentaje de células productoras de TNF- α e IL-4 de linfocitos T $\gamma\delta$ de oreja de ratón

Al observarse reconocimiento del LPG por el TLR2 de las T $\gamma\delta$ de dermis se buscó la presencia de las citocinas más abundantes observadas en bazo. Se observó que en condiciones basales sin estímulo, el 1.6 % de las células eran positivas para TNF- α . En el control con PBS fue del 17.2 % (10.75 veces mayor número de células positivas con respecto al S/E). De manera interesante, el número de células positivas con el estímulo de peptidoglicano únicamente fue de 6.8 % (4.25 veces de incremento con respecto al S/E). El mayor porcentaje de células productoras de TNF- α se observó con el estímulo de *Leishmania*, donde se observaron 32.5 % de células positivas (20.31 veces de incremento con respecto al S/E) y el estímulo de LPG indujo un 41 % de células T $\gamma\delta$ de dermis positivas para TNF- α (25.6 veces de incremento con respecto al S/E); ambos estímulos presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) contra el control sin estímulo (**Fig. 16**). Todo lo anterior sugiere que los linfocitos T $\gamma\delta$ producen principalmente TNF- α por el estímulo con LPG y con promastigotes de *L. mexicana*.

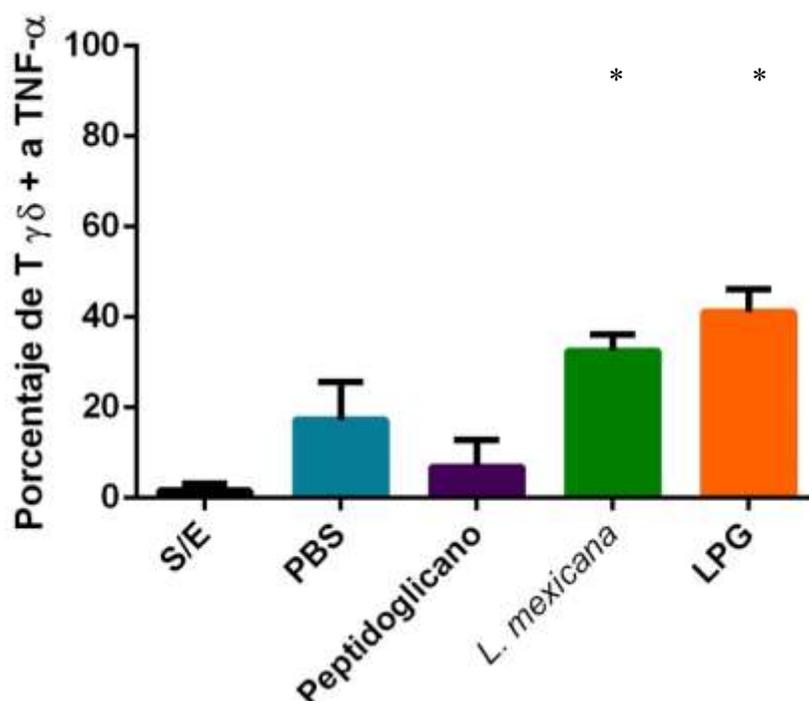


Figura 16. Porcentaje de producción de TNF- α por linfocitos T $\gamma\delta$ de oreja de ratón. Se inocularon ratones BALB/c durante 12 horas con diferentes estímulos: Los controles negativos consistieron de ratones sin estímulo (S/E) e inoculados con PBS, mientras que el control positivo fue el peptidoglicano y las condiciones experimentales fueron LPG (10 μ g) o 2×10^6 parásitos. Los datos representan la mediana de células productoras de TNF- α \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes y se consideraron estadísticamente significativos con una $p < 0.05$ (*).

El porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ de oreja positivos para IL-4 fue casi nulo (0.8%) en el control S/E. El número se incrementó con el estímulo de PBS observándose 1.9 % de células positivas (2.37 veces de incremento con respecto al S/E). El peptidoglicano no indujo células productoras de IL-4, mientras que el estímulo de *L. mexicana* indujo un 0.6 % (1.33 veces de disminución con respecto al S/E). En contraste, los ratones inoculados con LPG generaron un incremento considerable de linfocitos T $\gamma\delta$ positivos para IL-4, alcanzando el 12.57 % (15.71 veces de incremento con respecto al S/E) y obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (**Fig. 17**).

Por lo tanto, los linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis de oreja de ratón estimulados con LPG también producen IL-4, similar a lo observado en los linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo.

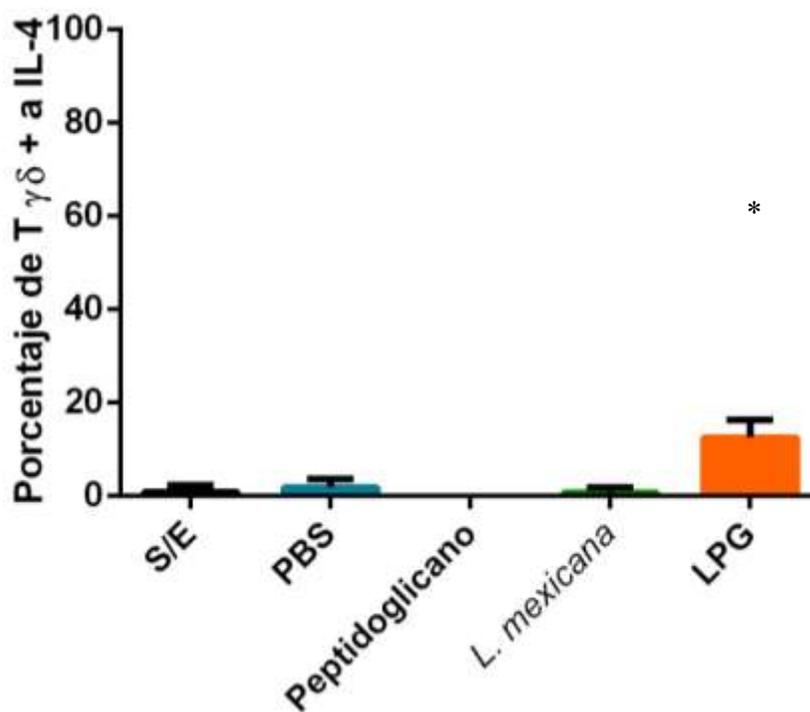


Figura 17. Porcentaje de producción de IL-4 por linfocitos T $\gamma\delta$ de oreja de ratón. Se inocularon ratones BALB/c durante 12 horas con diferentes estímulos: Los controles negativos consistieron de ratones sin estímulo (S/E) e inoculados con PBS, mientras que el control positivo fue el peptidoglicano y las condiciones experimentales fueron 10 μg de LPG o 2×10^6 parásitos. Los datos representan la mediana

de células productoras de IL-4 \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes y se consideraron estadísticamente significativos con una $p < 0.05$ (*).

6.3 Resumen de resultados

Durante el presente estudio se observó que los linfocitos T $\gamma\delta$ reconocían el LPG de *L. mexicana* mediante su TLR2, y como evidencia de activación se observó la fosforilación de la I κ B α y la producción de citocinas, siendo mayor la producción de TNF- α a comparación de la IL-4, mientras que el IFN- γ e IL-17 permanecían ausentes (**Fig. 18**).

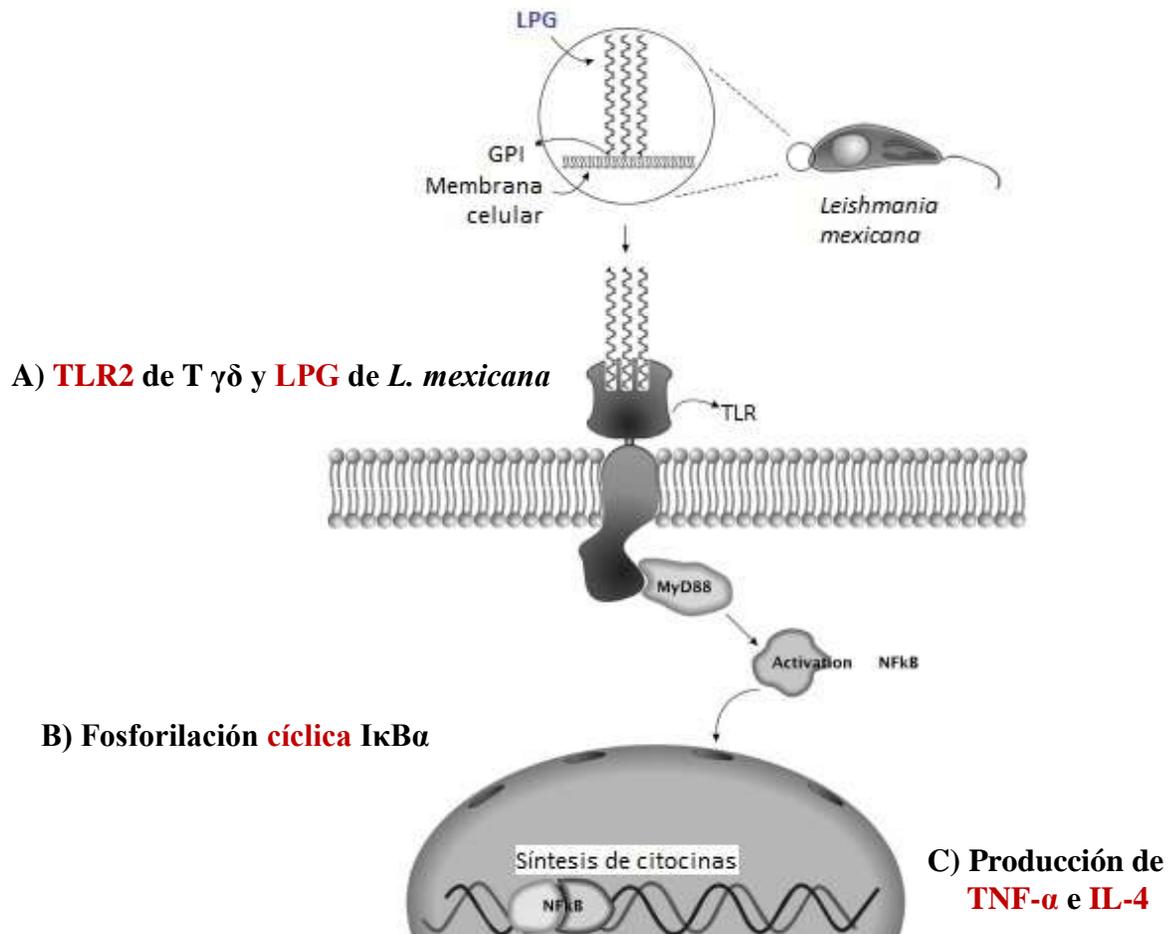


Figura 18. Activación de los linfocitos T $\gamma\delta$ por el reconocimiento de LPG de *L. mexicana* mediante el TLR2. El modelo propuesto a continuación señala que la unión entre el LPG de *L. mexicana* y el TLR2 en los linfocitos T $\gamma\delta$: **A)** induciría la fosforilación de la I κ B α ; **B)** el factor de transcripción NF- κ B se traslocaría al núcleo e induciría la producción de citocinas como TNF- α ; **C)** mientras que la IL-4 podría producirse mediante una activación conjunta de NF- κ B y NFAT (Minematsu *et al.*, 2011). Modificado de Tuon *et al.*, 2008.

7) Discusión

En el presente estudio se evaluó si los linfocitos T $\gamma\delta$ podrían activarse mediante la unión de su TLR2 y el LPG de *L. mexicana*. Se observó la colocalización de ambas moléculas, la fosforilación de I κ B α y la producción de TNF- α e IL-4 en las células T $\gamma\delta$ del bazo, mientras que las células T $\gamma\delta$ de la dermis modulan la expresión de su TLR2 al unirse al LPG purificado o el LPG presente en promastigotes de *L. mexicana*. Interesantemente, se observaron linfocitos T $\gamma\delta$ que se unen al LPG pero no a través del TLR2, lo cual implica la unión de esta molécula con un receptor no estudiado. Se ha descrito que los linfocitos T $\gamma\delta$ expresan TLR2, 3, 4, 7, 8 y 9 que les permiten responder a diferentes PAMP's (Dar *et al.*, 2014). El LPG es un PAMP de *Leishmania* que puede interactuar también con otros TLRs, como sucede durante el reconocimiento del LPG de *L. braziliensis* por el TLR4 de macrófagos peritoneales de la cepa C57BL/6 (Ibraim *et al.*, 2013). Por lo tanto, las células T $\gamma\delta$ que fueron incubadas con LPG y no colocalizaron con TLR2 podrían estar reconociéndolo mediante TLR4, lo cual podría corroborarse mediante el bloqueo con anticuerpos dirigidos a este receptor.

Al inocular parásitos en dermis de las orejas de ratones BALB/c se observó la unión *in vivo* del LPG, tomando eventos únicos en el citómetro de flujo para inferir que únicamente la molécula se encontraba pegada al TLR2 de la célula. La liberación del LPG de la membrana se pudo deber a la lisis por complemento que ocurre después de que los parásitos entran en contacto con la dermis (Merle *et al.*, 2015), lo que posiblemente libera la molécula y deja disponibles los dominios del LPG para su interacción con el TLR2. Los dominios de LPG que se unen al TLR2 son el GPI y las repeticiones de fosfoglicano. Se ha comprobado que el GPI del LPG de *L. major* es reconocido a través del TLR2 de la línea celular de macrófagos murinos RAW-ELAM (de Veer *et al.*, 2003). Esto también podría estar ocurriendo en los linfocitos T $\gamma\delta$ utilizados en el presente estudio, ya que el anticuerpo anti-LPG de *L. mexicana* utilizado en este trabajo tiene afinidad por el ancla lipídica (Apéndice 10.1.1), lo cual sugiere que después de la lisis por complemento, el LPG se desprende de la membrana y expone su dominio GPI. En cuanto a la región de fosfoglicanos, las células NK reconocen las repeticiones de fosfoglicanos del LPG proveniente de promastigotes metacíclicos de *L. major*, lo cual se comprobó debido a la incubación del LPG con el anticuerpo anti-LPG WIC 79.3 que reconoce fosfoglicanos, lo cual disminuía el efecto estimulador hacia el TLR2 sobre las células NK (Becker *et al.*, 2003). Con base en lo anterior, es muy probable que el TLR2 de los linfocitos T $\gamma\delta$ reconozca el dominio GPI del LPG, y aunado a esto, el reconocimiento de las repeticiones de fosfoglicanos del LPG podría favorecer el reconocimiento de los promastigotes, los cuales exhiben una mayor cantidad de fosfoglicanos debido a la elongación del LPG (Becker *et al.*, 2003). Esto último posiblemente estaba ocurriendo con los parásitos utilizados en este estudio, ya que fueron cosechados en su fase estacionaria, en donde se espera una mayor cantidad de promastigotes metacíclicos.

Posteriormente, una vez que se observó el reconocimiento del LPG, se comprobó que la expresión del TLR2 de los linfocitos T $\gamma\delta$ variaba entre estímulos, incrementándose con el estímulo de peptidoglicano y disminuyendo con los estímulos de LPG purificado y con los promastigotes de *L. mexicana*. Esto podría deberse a que el patrón de expresión de los TLR puede aumentar de acuerdo al estado de maduración celular (Takeda *et al.*, 2003). Por ejemplo, se ha observado que los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos T reguladores expresan TLR2 en la superficie celular una vez que se han activado con anticuerpos anti-CD3 activadores (Liu *et al.*, 2006). Esto podría explicar el aumento del TLR2 en los linfocitos T $\gamma\delta$ estimulados con peptidoglicano, pues se ha reportado que aumenta la expresión del TLR2 y TLR4 al reconocer ligandos como alarminas mitocondriales, inducidas por quemaduras que estimulan a dichos receptores (Schwacha y Daniel, 2008; Schwacha *et al.*, 2013). De igual forma, se habría esperado que el estímulo con LPG indujera un aumento en la expresión del TLR2, pues se ha comprobado que es un ligando para este receptor en diferentes poblaciones celulares (Becker *et al.*, 2003; de Veer *et al.*, 2003; Villaseñor-Cardoso *et al.*, 2008; Zamora-Chimal *et al.*, 2017). No obstante, la disminución de TLR2 por el LPG o el parásito observada en este estudio posiblemente se debe a la presencia de IL-4 producida por las T $\gamma\delta$. Anteriormente se había observado la disminución en la expresión del TLR2 en las células NK provenientes de pacientes con LCD (Cañeda-Guzmán *et al.*, 2014) y esta disminución también se ha reportado en macrófagos de pacientes con una infección crónica de *L. major* (Tolouei *et al.*, 2013). En ambos casos, es probable que la disminución del TLR2 se deba a la elevada presencia de IL-4 en este tipo de infecciones (Pirmez *et al.*, 1993). Ya que existen estudios que sugieren que la IL-4 disminuye la expresión de TLR2 en células dendríticas murinas (Wu *et al.*, 2008) y células epiteliales de intestino humano (Mueller *et al.*, 2006), es posible que la producción de IL-4 por linfocitos T $\gamma\delta$ de dermis influya en la disminución autocrina de la expresión del TLR2 mediante un mecanismo aún no descrito, lo que podría implicar un fenómeno de inhibición provocado por el LPG de *L. mexicana*

Una vez analizado el fenómeno de colocalización entre el LPG y el TLR2, se observó que la vía de señalización involucraba el aumento y la disminución en la fosforilación de la molécula I κ B α , un tipo de fosforilación cíclica que se ha reportado en células dendríticas estimuladas con LPG de *L. mexicana* (Zamora-Chimal *et al.*, 2017). Actualmente, se sabe que la activación del complejo de cinasas IKK fosforila a la I κ B α para permitir la traslocación del factor NF- κ B, lo cual involucra receptores como los TLR (Hinz y Scheidereit, 2014). Adicionalmente, existe un reporte del LPG en el interior de macrófagos modulando cinasas, como la PKC (proteína cinasa C) (Delgado-Domínguez *et al.*, 2010). De acuerdo a lo anterior, el LPG es reconocido por el TLR2 e induce la actividad celular, pero una vez al interior de la célula, el LPG podría modular la fosforilación del complejo IKK, lo cual pudiera ser responsable de la fosforilación cíclica de la I κ B α . Esto implicaría un aumento o disminución en la traslocación del factor NF- κ B, y posiblemente, el aumento o disminución en la producción de citocinas inflamatorias.

Para confirmar la activación por TLR2, se analizó también la producción de citocinas, donde se observó que el número de linfocitos T $\gamma\delta$ estimulados con LPG productores de TNF- α era superior al número de linfocitos T $\gamma\delta$ productores de IL-4 en las primeras 12 horas de interacción; además, no se observó la producción de IFN- γ o IL-17, lo cual es destacable ya que los linfocitos T $\gamma\delta$ son productores de estas citocinas (Prinz *et al.*, 2013). El TNF- α aumentaría la expresión de la enzima NOS2 en macrófagos, misma que participa en el control de la infección mediante la producción de especies reactivas de nitrógeno (Sacks y Trauth, 2002), por lo que la presencia de TNF- α favorecería la eliminación de los parásitos. Sin embargo, el TNF- α induce también la expresión de quimiocinas que atraen a fagocitos como neutrófilos y macrófagos. Ambas células son susceptibles de infectarse con el parásito y mantener una respuesta inflamatoria, la cual incrementaría la producción de metaloproteinasas dirigidas a la matriz extracelular, generando un microambiente hostil que podría destruir el tejido (Portou *et al.*, 2015). En contraste, la presencia de IL-4 favorecería la persistencia de los parásitos en el interior de los macrófagos, al disminuir la actividad de la enzima NOS2, debido a la activación de la arginasa. Esta enzima induce la producción de poliaminas que inhiben la liberación de citocinas proinflamatorias (McMahon-Pratt y Alexander, 2004), por lo que la presencia de IL-4 en dermis podría atenuar la respuesta inflamatoria provocada por el TNF- α .

Con relación a lo anterior, la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α ocurre mediante la vía de señalización del TLR2 a través de la inducción del factor NF- κ B (Yamamoto y Gaynor, 2004), ¿pero cómo podría llevarse a cabo la producción de IL-4 mediante el mismo receptor, siendo una citocina antiinflamatoria? Una explicación sugiere la participación de la vía de señalización del factor nuclear de células T activadas (NFAT por sus siglas en inglés). Este factor regula los genes en los linfocitos T en respuesta a las señales mediadas por TCR. Se ha encontrado también su activación en el linaje mieloide, durante el reconocimiento de antígeno mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR por sus siglas en inglés), incluyendo a los TLR (Bendickova *et al.*, 2017). Por ejemplo, el factor NFAT se encontró activo constitutivamente en macrófagos durante el reconocimiento de los ligandos Pam₃CSK₄ y LPS mediante el TLR2 y TLR4 (Minematsu *et al.*, 2011). La activación de este factor de transcripción se encontró también en la respuesta del TLR9 de macrófagos ante *Aspergillus*, donde se observó la participación en conjunto con el factor NF- κ B durante la producción de TNF- α (Herbst *et al.*, 2015). Otro reporte demostró que el factor NFAT regula la producción de IL-4 en basófilos (Qi *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, aunque aún no se ha reportado directamente la activación de NFAT por un ligando de TLR y su producción de IL-4, se especula que la producción de IL-4 en los linfocitos T $\gamma\delta$ podría llevarse a cabo mediante el reconocimiento por TLR y activación del factor NFAT, lo cual requiere de estudios adicionales para comprobarlo. Otra opción involucraría la producción de IL-4 por los linfocitos T $\gamma\delta$ mediante la activación del factor NFAT por el reconocimiento de LPG directamente por el TCR, aunque no fue posible observar ese fenómeno en el presente estudio.

Tomando en cuenta los antecedentes y los resultados obtenidos en el presente estudio, se hipotetiza que el reconocimiento del LPG de *L. mexicana* mediante el TLR2 de los linfocitos T $\gamma\delta$ induce su producción de IL-4 y TNF- α (se desconoce si la producción de IL-4 involucra el factor de transcripción NFAT). Estas citocinas complementarían sus funciones en la dermis, el sitio de infección: El TNF- α podría estimular la eliminación de los parásitos en los macrófagos infectados y participar en la quimioatracción de células como los neutrófilos y macrófagos, mientras que la producción en menor cantidad de la IL-4 podría actuar como un regulador del proceso inflamatorio y de los procesos microbicidas llevados a cabo por el TNF- α . Tomando en cuenta el modelo *in vivo* y el curso natural de infección, es posible que la IL-4 regule también otros mediadores inflamatorios que se pudieran estar produciendo por el daño del tejido durante la alimentación del vector, por lo que los linfocitos T $\gamma\delta$ podrían contribuir a la respuesta inmune local y a la modulación de la inflamación durante el primer contacto con *L. mexicana*.

8) Conclusión

El LPG de *L. mexicana* constituye un nuevo ligando para los linfocitos T $\gamma\delta$, cuyo reconocimiento directo mediante el TLR2 y su posterior activación manifiesta el potencial de estas células para responder a *L. mexicana* en tiempos tempranos. Estas células contribuyen al microambiente del sitio de infección con la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , que atrae a células fagocíticas al sitio y activaría a los macrófagos infectados. La concomitante producción de citocinas antiinflamatorias, como la IL-4, podría regular la inflamación presente en la dermis, ayudando a la supervivencia del parásito y reparación del tejido.

8.1) Perspectivas

- La producción de TNF- α en la dermis podría sugerir un papel temprano de los linfocitos T $\gamma\delta$ en la estimulación de macrófagos infectados con *L. mexicana*.
- La producción temprana de IL-4 por linfocitos T $\gamma\delta$ podría sugerir una vía de transcripción mediante TLR2 no explorada, la vía NAFT.
- La capacidad migratoria de los linfocitos T $\gamma\delta$ de la dermis sugiere que podrían producir IL-4 en ganglio, influyendo en la respuesta adaptativa Th2.
- Al observarse producción de citocinas con un estímulo inócuo de solución salina estéril, es posible que deba considerarse la sensibilidad de las poblaciones celulares al vehículo y al daño al tejido causado por la inoculación con jeringas.

9) Literatura citada

- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
- Alexander, J. *et al.* An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2923–2933 (2002).
- Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **7**, (2012).
- Antinori, S., Schifanella, L. & Corbellino, M. Leishmaniasis : new insights from an old and neglected disease. 109–118 (2012).
- Becker, I. *et al.* *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* **130**, 65–74 (2003).
- Bendickova, K., Tidu, F. & Fric, J. Calcineurin–NFAT signalling in myeloid leucocytes: new prospects and pitfalls in immunosuppressive therapy. *EMBO Mol. Med.* **9**, 990–999 (2017).
- Born, W. K., Kemal Aydintug, M. & O’Brien, R. L. Diversity of $\gamma\delta$ T-cell antigens. *Cell. Mol. Immunol.* **10**, 13–20 (2013).
- Botos, I., Segal, D, M. & Davies, D, R. The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Cell Press.* **19**, 447-459 (2011).
- Buxbaum, L. U. Interleukin-10 from T Cells, but Not Macrophages and Granulocytes, Is Required for Chronic Disease in *Leishmania mexicana* Infection. **83**, 1366–1371 (2015).
- Buxbaum, L. U. A detrimental role for IgG and Fc γ R in *Leishmania mexicana* infection. 197–209 (2008).
- Buxbaum, L. U. & Scott, P. Interleukin 10- and Fc Receptor-Deficient Mice Resolve *Leishmania mexicana* Lesions. **73**, 2101–2108 (2005).
- Buxbaum, L. U., Uzonna, J. E., Goldschmidt, M. H. & Scott, P. Control of New World cutaneous leishmaniasis is IL-12 independent but STAT4 dependent. 3206–3215 (2002).

- Cañeda-Guzmán, I. C. *et al.* 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**, (2014).
- Carding, S. R. & Egan, P. J. $\gamma\delta$ T cells: Functional plasticity and heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 336–345 (2002).
- Cecílio, P. *et al.* Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. **5**, 1–16 (2014).
- CENAPRECE. Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de la leishmaniasis. *Cent. Nac. Vigil. Epidemiol. y Control enfermedades* 1–38 (2015).
- Chauhan, P., Shukla, D., Chattopadhyaya, D., Saha, B. Redundant and regulatory roles for Toll-like receptors in *Leishmania* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **190**, 167–186 (2017).
- Chien, Y., Meyer, C. & Bonneville, M. $\gamma\delta$ T Cells: First Line of Defense and Beyond. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 121–155 (2014).
- Chitadze, G. *et al.* NKG2D- and T-cell receptor-dependent lysis of malignant glioma cell lines by human $\gamma\delta$ T cells: Modulation by temozolomide and A disintegrin and metalloproteases 10 and 17 inhibitors. *Oncoimmunology* **5**, (2016).
- Chong, S. Z., Evrard, M. & Ng, L. G. Lights, camera, and action: Vertebrate skin sets the stage for immune cell interaction with arthropod-vectored pathogens. *Front. Immunol.* **4**, 19–21 (2013).
- Coffey, F. *et al.* The TCR ligand-inducible expression of CD73 marks $\gamma\delta$ lineage commitment and a metastable intermediate in effector specification. *J. Exp. Med.* **211**, 329–343 (2014).
- Dar, A. A., Patil, R. S. & Chiplunkar, S. V. Insights into the relationship between toll like receptors and gamma delta T cell responses. *Front. Immunol.* **5**, 1–12 (2014).
- De Veer, M. J. *et al.* MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: Possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2822–2831 (2003).
- Delgado-Domínguez, J., González-Aguilar, H., Aguirre-García, M., Gutiérrez-Kobeh, L., Berzunza-Cruz, M., Ruiz-Remigio, A., Robles-Flores, M. & Becker, I. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst

- in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasite Immunol.* **32**, 440–449 (2010).
- Descoteaux, A. & Podinovskaia, M. Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction. *Future Microbiol.* **10**, 111–129 (2015).
- Descoteaux, A. & Turco, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1455**, 341–352 (1999)
- Diaz, N. L., Fernandez, M., Figueira, E., Ramirez, R., Monsalve, I. B., & Tapia, F. J. (2003). Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental dermatology*, **3**, 288-293.
- Fahl, S. P., Coffey, F. & Wiest, D. L. Origins of $\gamma\delta$ T Cell Effector Subsets: A Riddle Wrapped in an Enigma. *J. Immunol.* **193**, 4289–4294 (2014).
- Forestier, C.-L., Gao, Q. & Boons, G.-J. Leishmania lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 1–7 (2015).
- Franco, L. H., Beverley, S. M. & Zamboni, D. S. Innate Immune Activation and Subversion of Mammalian Functions by Leishmania Lipophosphoglycan. *J. Parasitol. Res.* **2012**, 1–11 (2012).
- González, C. *et al.* Current knowledge of Leishmania vectors in Mexico: How geographic distributions of species relate to transmission areas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **85**, 839–846 (2011).
- González, C. *et al.* Climate change and risk of leishmaniasis in North America: Predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, (2010).
- Guimarães, A. B. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *PNAS*, **106**, 6748–6753 (2009).
- Halliday, A., Bates, P. A., Chance, M. L. & Taylor, M. J. Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a role in controlling cutaneous leishmaniasis in vivo, but does not require activation by parasite lipophosphoglycan. *Parasites and Vectors* **9**, 1–14 (2016).
- Hayday, A. & Gibbons, D. Brokering the peace: the origin of intestinal T cells. *Europe PMC Funders Group* **1**, 172–174 (2014).

- Hayes, S. M., Li, L. Q. & Love, P. E. TCR signal strength influences $\alpha\beta/\gamma\delta$ lineage fate. *Immunity* **22**, 583–593 (2005).
- Heilig, J. S. & Tonegawa, S. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature* **322**, 836–840 (1986).
- Hinz, M. & Scheidereit, C. The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond. *EMBO Rep.* **15**, 46–61 (2014).
- Ibraim, I. C. et al. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasites and Vectors* **6**, (2013).
- Immunología de Kuby. 6a ed. México D. F.: McGraw-Hill, 2007. xxii, 574 p . ISBN 9789701064542.
- Kamhawi, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* **22**, 439–445 (2006).
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D. & Barratt, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites and Vectors* **10**, 1–17 (2017).
- Kavoosi, G., Ardestani, S. K. & Kariminia, A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania* major phosphoglycans (PGs). *Parasitology* **136**, 1193–1199 (2009).
- Kawai, T. & Akira, S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* **13**, 460–469 (2007).
- Konecny, P., Stagg, A. J., Jebbari, H., English, N., Davidson R. N., & Knight S, C. Murine dendritic cells internalize *Leishmania* major promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary Tcell proliferation in vitro. *Eur. J. Immunol.* **29**, 1803–1811 (1999).
- Kong, W. et al. The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCR 9/ 2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCR and NKG2D. *Blood* **114**, 310–317 (2009).
- Lazarski, C. A., Ford, J., Katzman, S. D., Rosenberg, A. F. & Fowell, D. J. IL-4 Attenuates Th1-Associated Chemokine Expression and Th1 Trafficking to Inflamed Tissues and Limits Pathogen Clearance. *PLoS One* **8**, (2013).

- Lefranc, M. P. & Rabbitts, T. H. A nomenclature to fit the organization of the human T-cell receptor γ and δ genes. *Res. Immunol.* **141**, 615–618 (1990).
- Li, Q. *et al.* Enhanced NFkappaB activation and cellular function in macrophages lacking IKK1. *Sci. York* **102**, (2005).
- Liu, H., Komai-Koma, M., Xu, D. & Liew, F. Y. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 7048–7053 (2006).
- Lodge, R., Diallo, T. O. & Descoteaux, A. Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol.* **8**, 1922–1931 (2006).
- Lohoff, M., Dingfelder, J. & Rollinghoff, M. A Search for Cells Carrying the $\gamma\delta$ T Cell Receptor in Mice Infected with *Leishmania major* *CURR TOP MICROBIOL.* **173**, (1991).
- Lucas, B. *et al.* Adaptive Immune-like γ/δ T Lymphocytes Share Many Common Features with Their α/β T Cell Counterparts. *J. Immunol.* **195**, 1449–1458 (2015).
- McGwire B, S. & Satoskar, A, R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Q. J. Med.* **107**, 7–14 (2013).
- Martínez-López, M., Soto, M., Iborra, S. & Sancho, D. Leishmania Hijacks myeloid cells for immune escape. *Front. Microbiol.* **9**, 1–16 (2018).
- Maspi, N., Abdoli, A. & Ghaffarifar, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog. Glob. Health.* **110**, 247–260 (2016).
- Matejuk, A. Skin Immunity. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* **66**, 45–54 (2018).
- Mcmahon-pratt, D. & Alexander, D. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immun Rev* **201**, 206–224 (2004).
- Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement system part II: Role in immunity. *Front. Immunol.* **6**, 1–26 (2015).
- Minematsu, H., M. J. Shin, A. B. Celil Aydemir, K. O. Kim, S. A. Nizami, G. J. Chung, and F. Y. Lee. Nuclear presence of nuclear factor of activated T cells (NFAT) c3 and

- c4 is required for Toll-like receptor-activated innate inflammatory response of monocytes/macrophages. *Cell. Signal.* **23**, 1785–1793 (2011).
- Moll, H., Fuchs, H. & Blank, C. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* **13**, 1595–1601 (1993).
- Mueller, T., Terada, T., Rosenberg, I. M., Shibolet, O. & Podolsky, D. K. Th2 Cytokines Down-Regulate TLR Expression and Function in Human Intestinal Epithelial Cells. *J. Immunol.* **176**, 5805–5814 (2006).
- Nitahara, A. *et al.* NKG2D ligation without T cell receptor engagement triggers both cytotoxicity and cytokine production in dendritic epidermal T cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1052–1058 (2006).
- Ramirez, K., Witherden, D. A. & Havran, W. L. All hands on DE(T)C: Epithelial-resident $\gamma\delta$ T cells respond to tissue injury. *Cell Immunol.* **296**, 57–61 (2015).
- Roberts, L. S., Janovy, J., y Schmidt, G. D. (2009). *Gerald D. Schmidt y Larry S. Roberts' foundations of parasitology*. Boston: McGraw-Hill.
- Ruíz-García, B. Efecto del Biostim en las células T- $\gamma\delta$ en la leishmaniasis murina. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México (2009).
- Pang, D. J., Neves, J. F., Sumaria, N. & Pennington, D. J. Understanding the complexity of $\gamma\delta$ T-cell subsets in mouse and human. *Immunology* **136**, 283–290 (2012).
- Pirmez, C. *et al.* Cytokine patterns in the pathogenesis of human Leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* **91**, 1390–1395 (1993).
- Portou, M. J., Baker, D., Abraham, D. & Tsui, J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review. *Vascul. Pharmacol.* **71**, 31–36 (2015).
- Prinz, I., Silva-Santos, B. & Pennington, D. J. Functional development of $\gamma\delta$ T cells. *Eur. J. Immunol.* **43**, 1988–1994 (2013).
- Qi, X., Nishida, J., Chaves, Lee., Ohmori, K. & Huang, H. CCAAT/Enhancer-binding Protein α (C/EBP α) Is Critical for Interleukin-4 Expression in Response to FcRI Receptor Cross-linking. *J. Biol. Chem.* **18**, 16063–16073 (2011).

- Reinhard, K., Huber, M., Lohoff, M. & Visekruna, A. International Journal of Medical Microbiology The role of NF- κ B activation during protection against Leishmania infection. *Int. J. Med. Microbiol.* **302**, 230–235 (2012).
- Rogers, M. E. The role of Leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front. Microbiol.* **3**, 1–13 (2012).
- Rosat, J. P. *et al.* Selective expansion of activated V delta 4+ cells during experimental infection of mice with Leishmania major. *Eur. J. Immunol.* **24**, 496–9 (1994).
- Rosat, J., Macdonald, H. R. & Louis, J. A. A role for gamma delta+ T cells during experimental infection of mice with Leishmania major. **150**, 550–555 (1993).
- Rosat *et al.* Expansion of $\gamma\delta$ + T cells in BALB/c mice infected with Leishmania major is dependent upon Th2-type CD4+ T cells. *Infect. Immun.* **63**, 3000–3004 (1995).
- Ruíz, H., J. & Becker, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **29**, 671–678 (2007).
- Sacks, D. & Noben-trauth, N. THE IMMUNOLOGY OF SUSCEPTIBILITY AND RESISTANCE. **2**, (2002).
- Satoskar, A., Okano, M. & David, J. R. $\gamma\delta$ T Cells Are Not Essential for Control of Cutaneous Leishmania major Infection in Genetically Resistant C57BL/6 Mice. 1649–1652 (1997).
- Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. *et al.* "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nat. methods* **9**, 676-682, PMID 22743772. (2012).
- Schwacha, M. G. & Daniel, T. Up-regulation of cell surface Toll-like receptors on circulating $\gamma\delta$ T-cells following burn injury. *Cytokine* **44**, 328–334 (2008).
- Schwacha, M. G., Meenakshi R., Zhang, Q., Nunez-Cantu, O & Cap, A, P. Mitochondrial damage-associated molecular patterns activate $\gamma\delta$ T-cells. *Innate Immun*, **3**, 261–268. (2014).
- Serafim, T. D., Dey, R., Nakhasi, H. L. & Jesus, G. Unique Features of Vector-Transmitted Leishmaniasis and Their Relevance to Disease Transmission and Control. **2**, 91–114 (2017).
- Sheel, M., Lynette B., Teija C. M. F., Labastida-Rivera, F., Faleiro, R, J., Bunn, P, T., Montes de Oca, M., Edwards, C, L., Ng, S, S., Kumar, R., Amante, F, H., Best, S, E.

- et al.* IL-17A-Producing $\gamma\delta$ T Cells Suppress Early Control of Parasite Growth by Monocytes in the Liver. *J. Immunol.* **195**, 5707–5717 (2015).
- Simões, A. E., Di Lorenzo, B. & Silva-Santos, B. Molecular determinants of target cell recognition by human $\gamma\delta$ T cells. *Front. Immunol.* **9**, 1–7 (2018).
- Singh, R. K., Srivastava, A. & Singh, N. Toll-like receptor signaling: A perspective to develop vaccine against leishmaniasis. *Microbiol. Res.* **167**, 445–451 (2012).
- Srivastava, S., Pandey, S. P., Jha, M. K., Chandel, H. S. & Saha, B. Leishmania expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clin. Exp. Immunol.* **172**, 403–409 (2013).
- Steverding, D. The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors* **10**, 1–10 (2017).
- Sutoh, Y., Mohamed, R. H. & Masanori, K. Origin and evolution of Dendritic epidermal T Cells. *Front. Immunol.* **9**:1059 (2018).
- Takeda, K., Akira, S. Toll-like Receptors in Innate Immunity. *Meas. Immun. Basic Biol. Clin. Assess.* **17**, 80–90 (2005).
- Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. TOLL-LIKE RECEPTORS *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335–376 (2003).
- Tay, S. S. *et al.* The Skin Immune Atlas: Three-Dimensional Analysis of Cutaneous Leukocyte Subsets by Multiphoton Microscopy. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 84–93 (2014).
- Terrazas, C. *et al.* IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. *FASEB J.* **30**, 1135–1143 (2016).
- Tolouei, S., Hejazi, S. H., Ghaedi, K., Khamesipour, A. & Hasheminia, S. J. TLR2 and TLR4 in Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania major*. *Scand. J. Immunol.* **78**, 478–484 (2013).
- Tuon, F., Amato, V. S., Hélio, A. B., AlMusawi, T., Duarte, M. & Amato-Neto, V. Toll-Like Receptors and Leishmaniasis. *Infect. Immun.* **76**, 866–872 (2008).
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J. & Arenas, R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research* **6**, 750 (2017).

- Vermijlen, D., Gatti, D., Kouzeli, A., Rus, T. & Eberl, M. $\gamma\delta$ T cell responses: How many ligands will it take till we know? *Semin. Cell Dev. Biol.* **84**, 75–86 (2018).
- Villaseñor-Cardoso, M. I. *et al.* Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host. *Parasite Immunol.* **30**, 425–434 (2008).
- Witherden, D. A. & Havran, W. L. EPCR: A stress trigger for $\gamma\delta$ T cells. *Nat. Immunol.* **13**, 812–814 (2012).
- Wu, Q. *et al.* Toll-like receptor 2 down-regulation in established mouse allergic lungs contributes to decreased mycoplasma clearance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 720–729 (2008).
- Yamamoto, Y. & Gaynor, R. B. I κ B kinases: Key regulators of the NF- κ B pathway. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 72–79 (2004).
- Yamashita, T., Miyata, H. & Miyaji, C. CD4 + and / or $\gamma\delta$ + T cells in the liver spontaneously produce IL-4 in vitro during the early phase of *Leishmania major* infection in susceptible BALB / c mice. **73**, 109–119 (1999).
- Zamora-Chimal, J. *et al.* NKT cell activation by *Leishmania mexicana* LPG: Description of a novel pathway. *Immunobiology* **222**, 454–462 (2017).

10) Apéndice

10.1 Metodología complementaria a la sección 5 “Metodología”

10.1.1 Inmunofluorescencia α -LPG

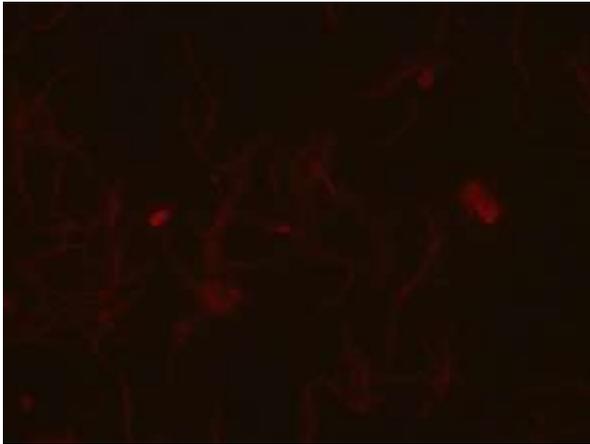
Se tomó 1 mL de medio de cultivo de los promastigotes, se centrifugó a 3500 RPM por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante para resuspender el precipitado en 1 mL de PBS; se repitió el procedimiento anterior y se tomó una alícuota para realizar una dilución 1:10 con glutaraldehído y contar con una cámara de Neubauer. Del número obtenido se utilizaron dos millones de parásitos por condición, teniéndose cuatro condiciones en total.

Los parásitos se centrifugaron y se resuspendieron en paraformaldehído a 4 °C durante 20 minutos, en seguida se lavaron dos veces con PBS, centrifugando a 3500 RPM por 10 minutos. Posteriormente se lavaron dos veces con PermWash (mismo ciclo), se dividieron en cuatro muestras y se marcaron con los siguientes anticuerpos durante 30 minutos a 4 °C: Dos muestras de parásitos se marcaron con el anticuerpo primario α -LPG hecho en ratón (1:150), mientras que dos controles se marcaron con los anticuerpos secundarios α -IgG de ratón hecho en conejo (1:50) acoplado a FITC y α -IgG de ratón hecho en cabra (1:50) acoplado a Rodamine.

En seguida se lavaron dos veces con PermWash, centrifugando a 3500 RPM por 10 minutos y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con las siguientes condiciones: Los parásitos marcados con el anticuerpo primario α -LPG se marcaron con α -IgG de ratón hecho en cabra (1:50) acoplado a Rodamine (SC 2092) y otra muestra con α -IgG de ratón hecho en conejo (1:50) acoplado a FITC (DAKO, F-0261), mientras que los controles secundarios únicamente se lavaron con PermWash.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavaron dos veces con PermWash, centrifugando a 3500 RPM por 10 minutos y al final se resuspendieron en PBS. Después se colocó cada muestra en un portaobjetos rotulado, se dejaron secar y se agregó DAPI sobre cada muestra, después se colocó un cubreobjetos y se sellaron los bordes con barniz. Las muestras se colocaron en una cámara húmeda a 4 °C y se protegieron de la luz antes de ser leídas en el microscopio confocal Leica.

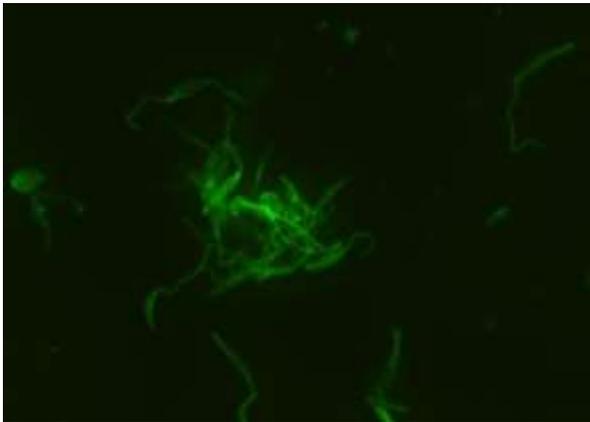
Parásitos teñidos con Rodamine



Control secundario Rodamine



Parásitos teñidos con FITC



Control secundario FITC



Figura 19. Inmunofluorescencia de parásitos marcados con α -LPG. Se permearon dos millones de promastigotes de *L. mexicana* por condición y el α -LPG se acopló con anticuerpos secundarios. En la figura superior izquierda se aprecian parásitos marcados con Rodamina y su control de anticuerpo secundario a la derecha. En la figura inferior izquierda se observan parásitos marcados con FITC y su control secundario a la derecha. Este experimento adicional confirmó que el anticuerpo α -LPG generado en el laboratorio tenía afinidad por el LPG del parásito.

10.1.2 Pureza de muestra de linfocitos T enriquecidos de bazo de ratón

Se buscó conocer la pureza de la muestra de los linfocitos T $\gamma\delta$ previamente enriquecidos con las columnas inmunomagnéticas del kit “TCR γ/δ + T Cell Isolation” (Miltenyi Biotec, cat. 130-092-125) y marcadas con anticuerpos conjugados α -TCR $\gamma\delta$ en APC hecho en hámster (1:50) y α -CD3 en PE hecho en rata (1:50). Se observa en el cuadrante 2 (Q2) del panel derecho la población deseada que consiste en el doble positivo TCR $\gamma\delta$ y CD3 del 43.9% y en el cuadrante 3 (Q3) un positivo únicamente al TCR $\gamma\delta$ del 11% (Fig. 20).

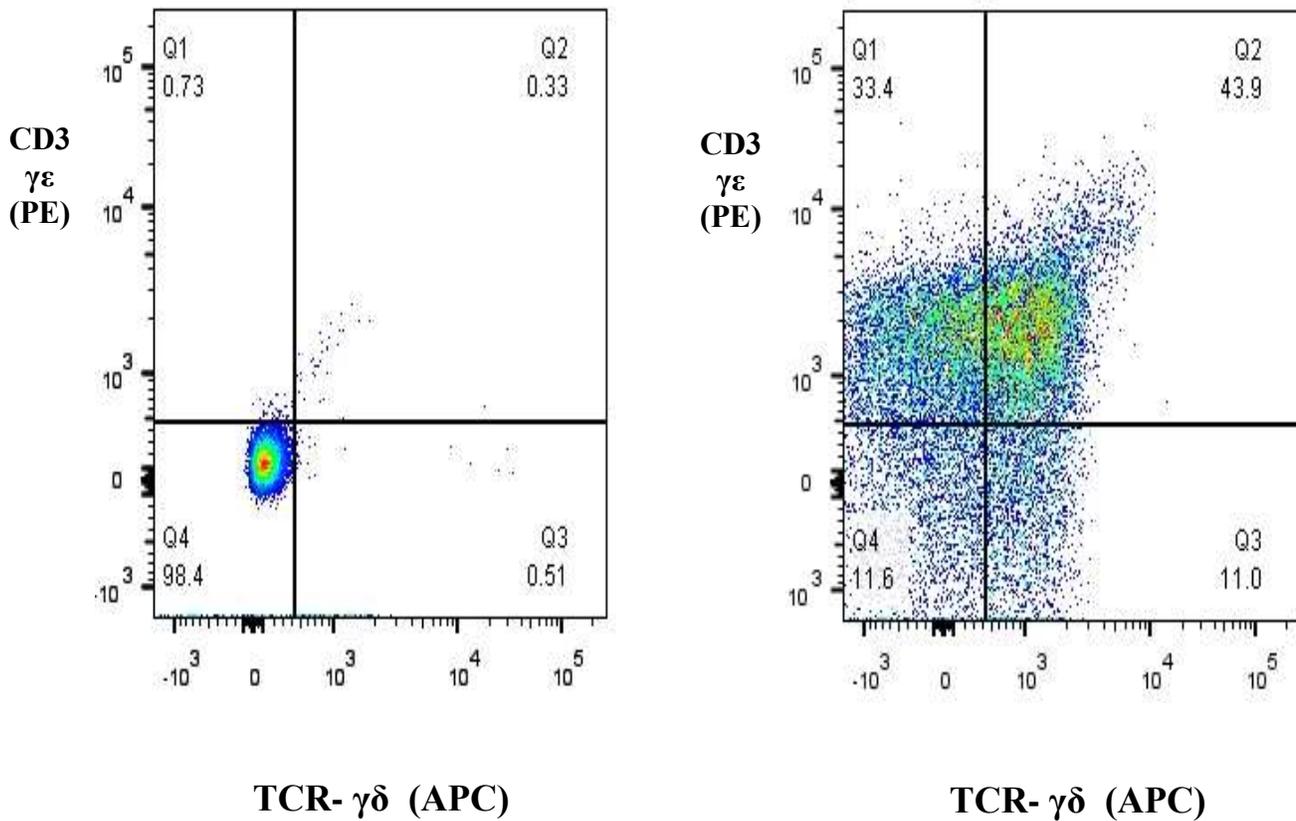


Figura 20. Tinción extracelular de linfocitos T $\gamma\delta$ enriquecidos de bazo de ratón. Se marcó una alícuota de la muestra obtenida con los anticuerpos anti-TCR- $\gamma\delta$ en APC y anti-CD3 $\gamma\epsilon$ en PE. En el panel izquierdo se observa el control de autofluorescencia, que sirvió para delimitar la positividad de la población de linfocitos T $\gamma\delta$, y en el panel derecho aparece la muestra de linfocitos T $\gamma\delta$. La imagen corresponde a un experimento representativo de cada enriquecimiento celular realizado.

10.1.3 Cinética de fosforilación de I κ B α en las células T $\gamma\delta$

Para conocer la fosforilación I κ B α de los linfocitos T $\gamma\delta$, las células se estimularon con 10 μ g/mL de LPG y 10 μ g/mL de PG a diferentes tiempos: 5, 15, 30 y 60 minutos antes de realizar las tinciones con el anticuerpo conjugado α -TCR $\gamma\delta$ en APC hecho en hámster (1:50) y el anticuerpo primario α -Phospho-I κ B α hecho en ratón (1:50), el cual se acopló con el anticuerpo secundario α -IgG de cabra acoplado a FITC hecho en conejo (1:50) y se utilizó DAPI para la contratinción de núcleos. Con las imágenes obtenidas se realizó un conteo del número de células positivas al anti-TCR- $\gamma\delta$ en APC (morado, no alcanza a mostrarse), al α -Phospho-I κ B α en FITC (verde) y al DAPI, obteniéndose un porcentaje de positividad (**Fig. 21**).

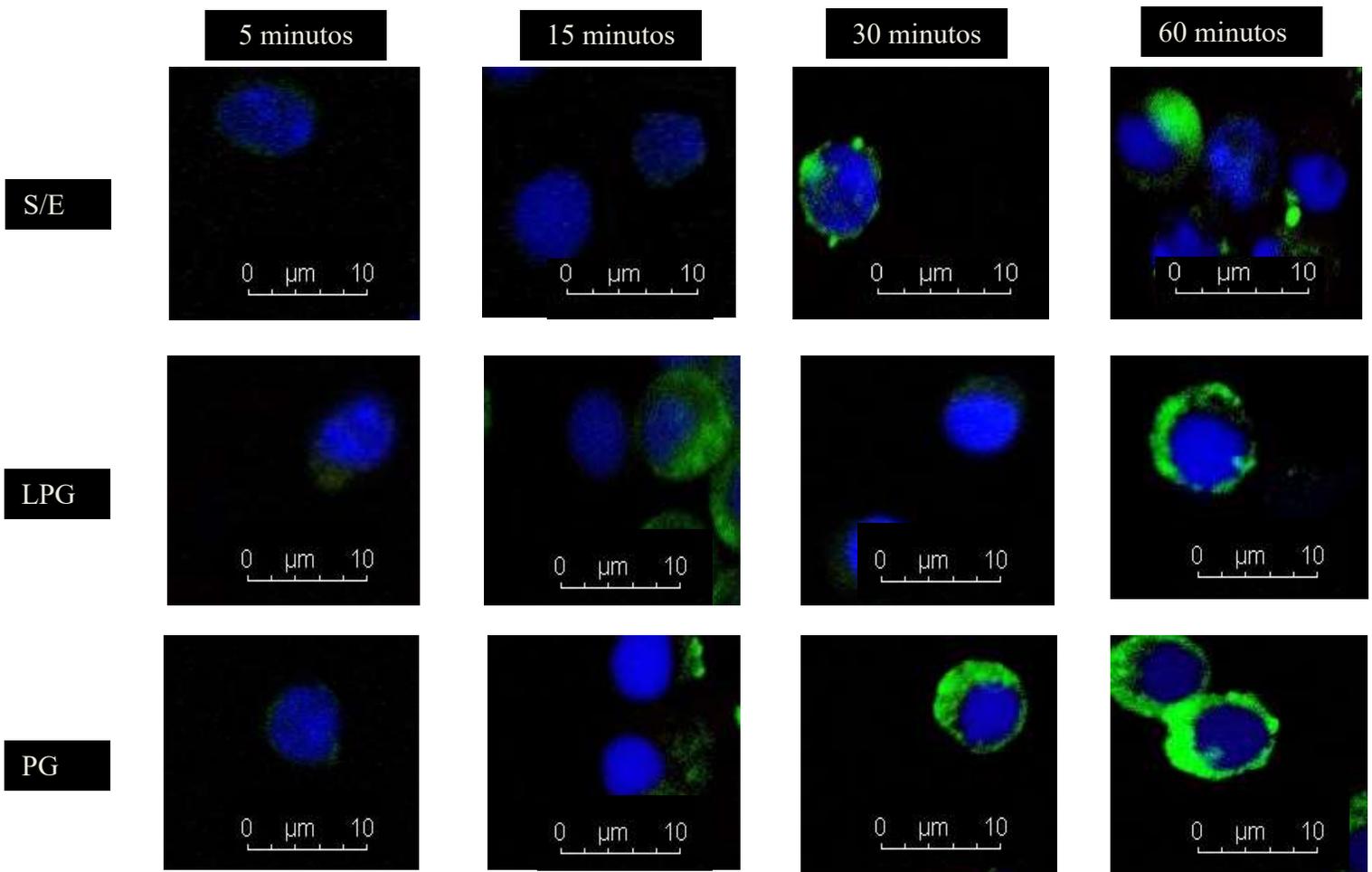


Figura 21. Fosforilación I κ B α de linfocitos T $\gamma\delta$. Se estimularon linfocitos T $\gamma\delta$ con LPG a diferentes tiempos. La primera fila corresponde al sin estímulo (S/E), la segunda al estímulo de lipofosfoglicano (LPG) y la tercera al estímulo de peptidoglicano (PG); mientras que cada columna corresponde a un tiempo diferente. La fosforilación se observa en verde (FITC) y el núcleo en azul (DAPI). Imágenes representativas de un experimento.

10.1.4 Producción de TNF- α e IL-4 de linfocitos T $\gamma\delta$ de oreja de ratón

Se utilizaron tres orejas de ratones macho de 12 semanas de edad para cada condición: Control de autofluorescencia, control de isotipos, 10 μ L de PBS comercial; 10 μ L de LPG de *L. mexicana* y 10 μ L de 2×10^6 millones de promastigotes de *L. mexicana*; se incluyeron en bloques de OCT y se cortaron con un grosor de 4 μ m antes de marcarse con los siguientes anticuerpos: α -TCR $\gamma\delta$ en APC hecho en hámster (1:25), α -CD3 en PE hecho en hámster (1:50), α -TNF- α en FITC hecho en rata (1:50) o α -IL-4 en FITC hecho en rata (1:50). Después se obtuvieron imágenes y se compararon con los controles de autofluorescencia e isotipos. La figura 22 muestra el proceso que se siguió para contar las células positivas a las citocinas, en este caso se ejemplifica TNF- α acoplado a FITC y se sobreexpuso la imagen correspondiente al α -TCR $\gamma\delta$ (d) para facilitar la observación.

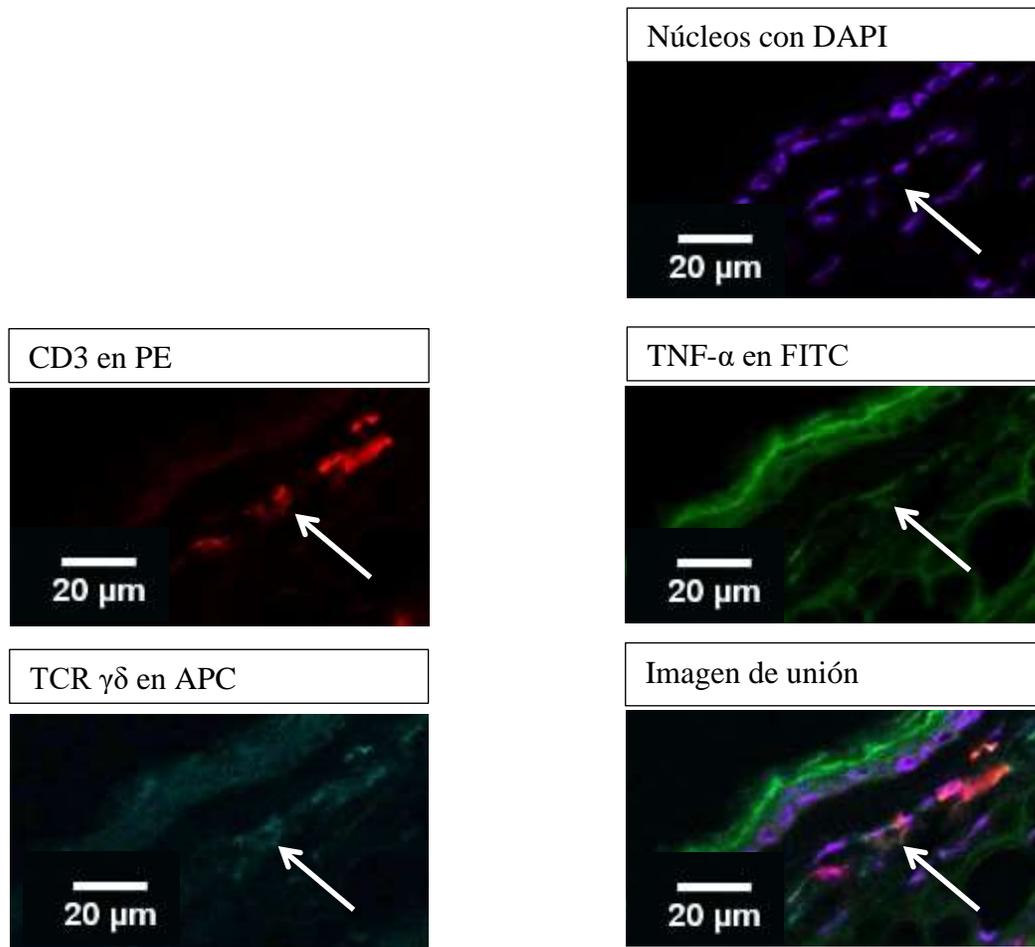


Figura 22. Corte de oreja de ratón inoculada con 2×10^6 *L. mexicana*. Se incluyeron muestras de oreja en OCT y se realizaron marcas de inmunofluorescencia para buscar la producción de TNF- α e IL-4. La flecha blanca indica la presencia de una célula positiva a los anticuerpos utilizados. Imágenes representativas.

10.2 Controles de citometría para el objetivo con linfocitos T $\gamma\delta$ de bazo

Controles experimentales para los experimentos de citometría de flujo: Con la finalidad de eliminar el traslape de los espectros de emisión de fluorescencia de los anticuerpos se realizó la matriz de compensación, la cual pudo utilizarse en todos los experimentos restantes. También se incluyeron controles de autofluorescencia para tener una referencia de la fluorescencia natural de las células, así como se incluyeron controles isotipo para los anticuerpos conjugados y controles secundarios para los anticuerpos que debían acoplarse a un anticuerpo primario. Todos se utilizaron a una dilución 1:50.

Experimento	Anticuerpo	Marca
Controles de compensación citometría intracelular	Rat α -mouse PerCP-Cy5.5 α -CD8a	BD Pharmingen, cat. 551162
	Rat α -mouse PeCy7 α -CD4	BD Pharmingen, cat. 552775
	Hámster α -mouse APC α -CD3	BD Pharmingen, cat. 553066
	Rat α -mouse Pacific Blue MHCII	Biolegend, cat. 116616
Controles isotipo (Citometría y confocal)	Isotipo PE Rat	BD Pharmingen, cat. 553925
	Isotipo APC	BD Pharmingen, cat. 553954
	Isotipo PerCP-Cy5.5 Rat	BD Pharmingen, cat. 550765
	Isotipo PeCy7 Rat	BD Pharmingen, cat. 552784