

Papel de TLR2 en la regulación de la respuesta inmune innata en pacientes infectados por *Leishmania mexicana*.

Cañeda Guzmán C, Salaiza Suazo N, Fernández Figueroa E, Aguirre García M, Carrada Figueroa G, Cervantes Sarabia R, Becker I.
Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM

La leishmaniasis cutánea puede presentarse en dos formas clínicas polarmente opuestas: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Pacientes con LCL presentan una intensa respuesta inmune celular, que limita al parásito al sitio de la picadura de la mosca transmisora. Pacientes con LCD presentan una anergia de la respuesta inmune celular específica contra el parásito, permitiendo la propagación del parásito a toda la piel, formando nódulos que contienen abundantes macrófagos intensamente parasitados. Se desconocen los factores que determinan el curso del padecimiento y actualmente se piensa que se establecen las condiciones determinantes a nivel de la respuesta inmune innata. Una de las células que desempeña un papel central en la respuesta inmune innata es la célula NK (natural killer), porque produce citocinas activadoras del macrófago, como son IFN-gama y TNF-alfa. En modelos murinos, naturalmente resistentes a la leishmaniasis, se encontró que las células NK son indispensables para mantener la resistencia a la enfermedad. Recientemente nuestro grupo demostró que los receptores TLR2 en células NK reconocen directamente a lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania*, llevando a la translocación nuclear de NF- κ B y activación de la célula con producción de citocinas IFN-gama y TNF-alfa. En el presente trabajo analizamos el efecto que ejerce LPG de *Leishmania mexicana* sobre el receptor TLR2 de las células NK de pacientes con LCL y LCD para determinar si existen diferencias en la activación de las células NK de ambos grupos de pacientes. Purificamos células NK de sangre periférica de 14 pacientes con LCL y 5 LCD mediante anticuerpos monoclonales acoplados a inmunomagnetos. Incubamos las células NK *in vitro* con 10 μ g/ml de LPG durante 18 horas. Cuantificamos la producción de IFN-gama y TNF-alfa mediante ELISA y analizamos la expresión de TLR2 en la membrana celular por citometría de flujo. Para demostrar la unión de LPG a TLR2 realizamos inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti-TLR2 y revelamos el precipitado con anticuerpos anti-LPG. Mediante Western blot confirmamos la translocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B y analizamos las subunidades p50 y p65 en células NK de ambos grupos de pacientes. Encontramos que células NK de pacientes con LCL, estimuladas con LPG, incrementaron su producción de IFN-gama un promedio de 212 %, de TNF-alfa un 100%, aunado a un incremento en la expresión de TLR2 en membrana celular de 33% . A diferencia de esto, en pacientes con LCD se observó una inhibición de 52% en la secreción de IFN-gama y de 21 % en TNF-alfa cuando sus células NK fueron incubadas con LPG. En estos pacientes únicamente se encontró un ligero incremento de 6% de la expresión de TLR2 en la membrana de células NK. El análisis densitométrico de las bandas correspondientes a las subunidades p50 y p65 de NF- κ B mostró diferencias entre ambos grupos de pacientes. En pacientes con LCL no se observaron bandas de p65, encontrándose únicamente bandas de p52 y p50. El estímulo con LPG se asoció con cambios en la expresión de ambas subunidades, encontrándose una correlación inversamente proporcional en la intensidad de expresión entre las bandas p52 y p50, ya que un incremento en la expresión de p52 se asociaba con una disminución en la expresión de p50 y vice-versa.

En pacientes con LCD encontramos las subunidades p65 y p50 y no se observaron bandas de p52. En estos pacientes, el estímulo de LPG incrementó tanto la expresión de p65 como de p50. Los resultados preliminares indican que células NK de pacientes con LCL responden de manera distinta al estímulo con LPG de *Leishmania mexicana*, que células NK de pacientes con LCD. Mientras que pacientes con LCL responden con un incremento en la expresión de TLR2 y activación celular, los pacientes con LCD no presentan un incremento en TLR2 y tampoco se activan con el estímulo. Queda por explorarse si la distinta expresión relativa de las subunidades de NF- κ B: p52 y p50 en pacientes con LCL vs p65 y p50 en pacientes con LCD, se asocia con su capacidad activadora de la célula. Es el primer trabajo sobre la posible participación de TLR2 en la regulación de la respuesta inmune de pacientes con leishmaniasis de distinta severidad clínica.

Apoyado por DGAPA 37538-M y CONACYT IN231602-3.