



universidad  
de león

TESIS DOCTORAL

**LA MUERTE CELULAR INMUNOGÉNICA  
COMO POTENCIAL TRATAMIENTO  
ALTERNATIVO FRENTE A LA LEISHMANIASIS**

**María Álvarez Bardón**

Programa de doctorado: Ciencias Biomédicas y de la Salud

Tutor: Rafael Balaña Fouce

Dirigida por: Rafael Balaña Fouce y Rosa M<sup>a</sup> Reguera Torres

León, 2023



universidad  
de león

**TESIS DOCTORAL**

**La muerte celular inmunogénica  
como potencial tratamiento  
alternativo frente a la leishmaniasis**

María Álvarez Bardón



Ciencias Biomédicas y de la Salud  
Rafael Balaña Fouce  
Rosa M<sup>a</sup> Reguera Torres  
León, 2023



**UNIÓN EUROPEA**  
Fondo Social Europeo  
El FSE invierte en tu futuro



**Junta de  
Castilla y León**

La financiación de esta tesis doctoral ha sido posible gracias al Fondo Social Europeo y a la Junta de Castilla y León, a través de la Consejería de Educación, mediante el contrato predoctoral (LE051-18) concedido (ORDEN EDU/556/2019) al amparo de la convocatoria “Ayudas destinadas a financiar la contratación predoctoral de personal investigador 2018”.

## AGRADECIMIENTOS

*Siendo sinceros, no ha sido un camino fácil. Pero ha merecido la pena. Ha merecido la pena por volver a verme cumplir aquello que me he propuesto. Ha merecido la pena por haberme hecho más fuerte y segura de mí misma. Ha merecido la pena por hacerme ver de nuevo que estoy donde tenía que estar. Ha merecido la pena por haberme dado cuenta que la gente que tengo a mi alrededor ha estado ahí en mis peores momentos. Ha merecido la pena porque también lo han estado en los mejores. Ha merecido la pena por haberme sentido capaz de poder hacer todo lo que un día creí que no podría. Ha merecido la pena porque he podido. Ha merecido la pena por todo lo aprendido. Ha merecido la pena porque hoy me siento orgullosa de la persona en la que me he convertido. Ha merecido la pena por poner fin a estos últimos meses, que no han sido para nada fáciles. Ha merecido la pena porque es verdad que la satisfacción es mayor cuanto más cuesta. Ha merecido la pena porque he aprendido a reírme (más) de los problemas y a llorar de felicidad. Pero, ya está. Estoy a un paso de llegar a la meta.*

*Gracias a mis directores, Rosa y Rafa. Por confiar en mí y haberme enseñado tanto, desde el principio hasta el final. Todo lo que sé hoy en día del mundo de la investigación os lo debo a vosotros. Gracias también a Carlos y a Yoli, por haber estado siempre tan atentos conmigo.*

*Gracias a mi Nerea del alma, por ser mi apoyo incondicional. Llegarás allá donde tú quieras y conseguirás todo lo que te propongas, porque la clave está en el trabajo, el esfuerzo, la dedicación y la perseverancia y, a ti, todo eso te sobra por los cuatro costados. Qué feliz me ha hecho haberte encontrado en el camino. Te espero en la meta.*

*Gracias a “la clásica” Irene, por las charlas, por las risas y por tu trabajo. Mi padre te agradecerá siempre la amistad y la sonrisa que le has brindado a su hija cada día.*

*Gracias a mi Barbarilla y a Camino, por aconsejarme y enseñarme a dar mis primeros pasos firmes y seguros en el laboratorio. Gracias al resto de compañeros que habéis ido apareciendo a lo largo de estos años: Amaia, Cris, Giulio, Estela, Rubén, Sohaib, Cathy...*

*Gracias, Julio, por regalarme cactus y amenizarme las mañanas con tus “batallitas”. Gracias, Carlos, por tus ideas locas que nos salvan un poco del mundo real.*

*Y gracias a todos aquellos que me esperan cada día fuera de las cuatro paredes del laboratorio. A mis padres, por escucharme, ayudarme, animarme, apoyarme y decirme las palabras necesarias en el momento preciso. Es un orgullo ser vuestra hija. Gracias a mi Pelusita, por tus lametones y por sacarme a pasear cuando mi cabeza pedía aire fresco. A mi familia, por estar siempre al pie del cañón, removiendo cielo y tierra por los demás. Me conformo con tener la mitad de vuestra fortaleza. A mi Totito, que sé que seguirás viéndome cumplir sueños allí donde estés.*

*Gracias a mis amigos, porque “todos tenemos con quién”. A mi Nata, mi Pumbi, por quitarle peso a mis problemas y notarte siempre cerca, aunque a veces nos separen unos cientos de kilómetros. A mis chicos, ya hermanos: Jai, Dresó, Chechín, Agus, Carlis, Fer, Luis, Dieguis, Adri, Pelli. Mi Fer, desde Madrid. Gracias a los viejos: Silvi, Vir, Sari y Dani. Y gracias a los nuevos, Nere, Cris, Dani, Alex y Ru, por haberos convertido en el sitio “a dónde ir”.*

*Gracias a la música, a los conciertos y a las canciones, no sabéis lo feliz que me hacéis.*

*Gracias a la risa, por haberte convertido en mi arma de “construcción” masiva.*

*Y, ¿por qué no decirlo? Gracias también a mí.*

*Mereció la pena.*

## ÍNDICE

---

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XXII
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	XXIII
RESUMEN.....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. LEISHMANIASIS.....</b>	<b>4</b>
1.1.1. EL GÉNERO <i>Leishmania</i> .....	4
1.1.2. CICLO BIOLÓGICO DE <i>Leishmania</i> .....	4
1.1.3. EPIDEMIOLOGÍA .....	7
1.1.3.1. Leishmaniasis visceral (LV).....	7
1.1.3.2. Leishmaniasis cutánea (LC) .....	9
1.1.3.3. Leishmaniasis mucocutánea (LMC).....	10
<b>1.2. TRATAMIENTOS FRENTE <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>10</b>
1.2.1. QUIMIOTERAPIA frente <i>Leishmania</i> .....	11
1.2.1.1. Antimoniales pentavalentes (Sb <sup>V</sup> ).....	11
1.2.1.2. Anfotericina B desoxicolato (AmB-D) y Anfotericina B liposomal .....	11
1.2.1.3. Miltefosina .....	12
1.2.1.4. Paromomicina .....	12
1.2.2. VACUNAS frente <i>Leishmania</i> .....	13
1.2.2.1. Vacunas de primera generación .....	14
1.2.2.2. Vacunas de segunda generación.....	15
1.2.2.3. Vacunas de tercera generación .....	16
<b>1.3. RESPUESTA INMUNE FRENTE <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>17</b>
1.3.1. Neutrófilos.....	19
1.3.2. Macrófagos .....	20
1.3.3. Células dendríticas (DCs).....	23
1.3.4. Linfocitos T .....	24
1.3.5. TLRs.....	26

<b>1.4. CÉLULAS DENDRÍTICAS .....</b>	<b>29</b>
1.4.1. Desarrollo de las DCs:.....	30
1.4.2. Tipos de DCs:.....	31
1.4.2.1. DCs convencionales (cDCs):.....	32
A. cDC1: CD11c+MHCII+CD8 $\alpha$ +CD103+ .....	32
B. cDC2: CD11c+MHCII+CD11b+XCR1+Sirp $\alpha$ + .....	34
1.4.2.2. DCs plasmocitoides (pDCs): CD11c <sup>±</sup> +MHCII+CD45RA+CD317+Siglec-H <sup>+</sup> 35	
1.4.3. <i>Leishmania</i> y su interacción con las DCs.....	36
<b>1.5. PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA .....</b>	<b>37</b>
1.5.1. Vía clásica de presentación del MHC-I .....	39
1.5.2. Vía de presentación del MHC II.....	40
1.5.3. Presentación cruzada.....	41
1.5.4. <i>Leishmania</i> y la presentación cruzada antigénica.....	45
<b>1.6. RUTAS DE MUERTE CELULAR .....</b>	<b>46</b>
1.6.1. NECROSIS .....	47
1.6.2. APOPTOSIS.....	49
1.6.2.1. Apoptosis Intrínseca.....	49
1.6.2.2. Apoptosis Extrínseca .....	51
1.6.3. NECROPTOSIS .....	53
1.6.4. PIROPTOSIS.....	55
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>59</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
<b>3.1. MATERIALES.....</b>	<b>63</b>
3.1.1. LÍNEAS CELULARES .....	63
3.1.2. PARÁSITOS .....	63
3.1.3. RATONES .....	64
<b>3.2. MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
3.2.1. INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR INMUNOGÉNICA (ICD).....	64
3.2.1.1. Obtención de células progenitoras de médula ósea.....	64
3.2.1.2. Tratamiento con inductores de ICD .....	65
3.2.1.3. Ensayo de viabilidad con alamarBlue:.....	65

3.2.1.4.	Ensayo de citotoxicidad mediante Lactato Deshidrogenasa (LDH) .....	66
3.2.1.5.	Cuantificación de la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9: .....	66
3.2.1.6.	Detección de IL-1 $\beta$ mediante ELISA.....	67
3.2.1.7.	ANEXO I.....	69
3.2.2.	CO-EXPLANTE .....	72
3.2.2.1.	Preparación del cargo .....	72
3.2.2.2.	Preparación del explante de bazo: .....	72
3.2.2.3.	ANEXO II.....	74
3.2.3.	DISEÑO DE LA CEPA <i>L. infantum</i> 2713 HASPB:OVA.....	76
3.2.3.1.	Generación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> .....	76
3.2.3.2.	Transformación de <i>E. coli</i> con el plásmido pLEXY-hyg2.1 HASPB:OVA 76	76
3.2.3.3.	Aislamiento del plásmido pLEXY-hyg2.1 HASPB:OVA .....	77
3.2.3.4.	Linearización del plásmido pLEXY-hyg2.1 HASPB:OVA.....	77
3.2.3.5.	Transfección de cepas de <i>Leishmania</i> con el plásmido pLEXY-hyg2.1 HASPB:OVA .....	78
3.2.3.6.	Microscopía confocal para la detección de la proteína OVA .....	79
3.2.3.7.	Western blot de fluorescencia de extractos de <i>Leishmania</i> .....	79
3.2.3.8.	ANEXO III.....	81
3.2.4.	MEDICIÓN DE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS RAW 264.7 TRAS EL TRATAMIENTO CON RADIACIÓN UV.....	84
3.2.4.1.	Cultivo e infección de macrófagos RAW 264.7 .....	84
3.2.4.2.	Irradiación de macrófagos RAW 264.7 con UV .....	84
3.2.4.3.	Citometría de flujo .....	84
3.2.4.4.	ANEXO IV.....	86
3.2.5.	CUANTIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN DE RAW 264.7 IRRADIADAS CON UV 87	87
3.2.5.1.	ANEXO V.....	88
3.2.6.	PRESENTACIÓN CRUZADA CON CÉLULAS B3Z.....	89
3.2.6.1.	Diferenciación de BMDC con GM-CSF:.....	89
3.2.6.2.	Estimulación de las BMDC con LPS.....	89
3.2.6.3.	Preparación de RAW 264.7 infectadas e irradiadas con UV .....	89

3.2.6.4.	Co-cultivo de BMDC con RAW 264.7 .....	89
3.2.6.5.	Preparación de bolas recubiertas con OVA/BSA (bbOVA) .....	90
3.2.6.6.	Sub-cultivo de células B3Z .....	90
3.2.6.7.	Lavar bbOVA .....	90
3.2.6.8.	Preparación de las diluciones de OVA soluble (sOVA) .....	90
3.2.6.9.	Preparación de las diluciones del péptido SIINFEKL .....	90
3.2.6.10.	Lavar y fijar BMDC .....	90
3.2.6.11.	Co-cultivo de BMDC y B3Z .....	91
3.2.6.12.	Revelar el ensayo .....	91
3.2.6.13.	ANEXO VI. ....	92
3.2.7.	CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE BMDC .....	94
3.2.7.1.	Diferenciación de BMDC mediante el ligando Flt3L .....	94
3.2.7.2.	Citometría de flujo .....	94
3.2.7.3.	ANEXO VII. ....	96
3.2.8.	PRESENTACIÓN CRUZADA ANTIGÉNICA CON CÉLULAS OT-I .....	98
3.2.8.1.	Expansión de cDC1 <i>in vivo</i> para su uso en experimentos <i>ex vivo</i> .....	98
3.2.8.2.	Aislamiento de cDC1 .....	98
3.2.8.3.	Preparación del cargo .....	99
3.2.8.4.	Estimulación de cDC1 .....	100
3.2.8.5.	Fijación de las DCs .....	100
3.2.8.6.	Aislamiento de linfocitos T CD8+ .....	100
3.2.8.7.	Tinción de células T CD8+ con CellTrace Yellow .....	101
3.2.8.8.	Co-cultivo de DCs y células T CD8+ .....	101
3.2.8.9.	Citometría de flujo .....	101
3.2.8.10.	ANEXO VIII. ....	103
3.2.9.	FENOTIPADO DE BAZO SANO E INFECTADO PARA DCs .....	106
3.2.9.1.	Procesamiento del bazo .....	106
3.2.9.2.	Citometría de flujo .....	106
3.2.9.3.	Aislamiento de Pan-DCs .....	106
3.2.9.4.	Microscopía confocal .....	107
3.2.9.5.	ANEXO IX. ....	108

<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>110</b>
<b>4.1. CAPÍTULO I: NECROPTOSIS.....</b>	<b>111</b>
4.1.1.    Inducción a la necroptosis en cultivos primarios BMDM.....	111
4.1.1.1.    Inducción a la necroptosis por LPS .....	112
4.1.1.2.    Inducción a la necroptosis por inhibidores IAPs .....	114
4.1.2.    Inducción a la necroptosis en cultivos de macrófagos RAW 264.7 .....	118
4.1.3.    Evaluación de la activación de caspasas en necroptosis .....	119
4.1.4.    Evaluación de la producción de IL-1 $\beta$ en necroptosis.....	120
4.1.5.    Efecto de los DAMPs producidos en necroptosis sobre sobre la viabilidad de <i>L. donovani</i> LV9 iRFP.....	121
4.1.5.1.    DAMPs producidos durante la necroptosis en BMDM.....	122
4.1.5.2.    DAMPs producidos durante la necroptosis en RAW 264.7 .....	123
<b>4.2. CAPÍTULO II: APOPTOSIS INTRÍNSECA. ....</b>	<b>125</b>
4.2.1.    Inducción a la apoptosis intrínseca por CHX en BMDM .....	125
4.2.2.    Inducción a la apoptosis intrínseca por CHX en RAW 264.7 .....	126
4.2.3.    Inducción a la apoptosis intrínseca por inhibidores en BMDM .....	127
4.2.4.    Inducción a la apoptosis intrínseca por inhibidores en RAW 264.7 .....	129
4.2.5.    Evaluación de la activación de caspasas en la apoptosis intrínseca.....	129
4.2.6.    Evaluación de la producción de IL-1 $\beta$ en la apoptosis intrínseca .....	131
4.2.7.    Efecto de los DAMPs producidos en el proceso de apoptosis intrínseca sobre la viabilidad de <i>L. donovani</i> LV9 iRFP.....	132
4.2.7.1.    DAMPs producidos durante la apoptosis intrínseca en BMDM.....	132
4.2.7.2.    DAMPs producidos durante la apoptosis intrínseca en RAW 264.7.....	134
<b>4.3. CAPÍTULO III: APOPTOSIS EXTRÍNSECA .....</b>	<b>136</b>
4.3.1.    Inducción a la apoptosis extrínseca en BMDM .....	136
4.3.2.    Inducción a la apoptosis extrínseca en RAW 264.7 .....	138
4.3.3.    Evaluación de la activación de caspasas en la apoptosis extrínseca.....	139
4.3.4.    Evaluación de la producción de IL-1 $\beta$ en la apoptosis extrínseca .....	140
4.3.5.    Efecto de los DAMPs producidos en la apoptosis extrínseca sobre la viabilidad de <i>L. donovani</i> LV9 iRFP.....	141
4.3.5.1.    DAMPs producidos durante la apoptosis extrínseca en BMDM.....	141
4.3.5.2.    DAMPs producidos durante la apoptosis extrínseca en RAW 264.7.....	142

<b>4.4. CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS Y FENOTIPADO DE DCs ESPLÉNICAS .....</b>	<b>145</b>
4.4.1. Generación de cepas de <i>L. infantum</i> que producen OVA en la superficie de la membrana plasmática .....	145
4.4.2. Inducción a la apoptosis por irradiación UV de RAW 264.7 .....	150
4.4.3. Cuantificación de la infección por <i>L. infantum</i> 2713 mCh-HASPB:OVA en células RAW 264.7 irradiadas con UV .....	152
4.4.4. Ensayo de presentación cruzada con células B3Z .....	153
4.4.5. Evaluación de la activación de BMDC .....	155
4.4.6. Ensayo de presentación cruzada con células OT-I.....	157
4.4.7. Fenotipado de DCs esplénicas en ratones infectados por <i>L. infantum</i> 2713 HASPB:OVA.....	160
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>166</b>
5.1. MUERTE CELULAR INMUNOGÉNICA (ICD) .....	167
5.2. PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS Y FENOTIPADO DE DCs ESPLÉNICAS .....	179
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>186</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>188</b>
<b>8. ANEXO X: Aportación.....</b>	<b>237</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1   Esquema de la clasificación taxonómica jerárquica del género <i>Leishmania</i>.</b> Información obtenida de la base de datos de Schoch et al., 2020. ....	4
<b>FIGURA 2   Esquema de la clasificación taxonómica jerárquica de los géneros <i>Phlebotomus</i> y <i>Lutzomyia</i>.</b> Información obtenida de la base de datos de Schoch et al., 2020. ....	5
<b>FIGURA 3   Representación esquemática de la arquitectura celular y subcelular de <i>Leishmania</i>.</b> A) Promastigote. B) Amastigote intracelular. C) Amastigotes infectando la vacuola parasitófora dentro de un fagocito de mamífero (Aebischer & Mrva, 2016). ....	6
<b>FIGURA 4   Ciclo biológico de parásitos de <i>Leishmania</i>.</b> Cuando un flebótomo se encuentra infectado con promastigotes y pica a un hospedador mamífero, los promastigotes son liberados al torrente sanguíneo, donde son fagocitados por macrófagos. En el interior de estas células, los promastigotes se transforman en amastigotes, los cuales se multiplican hasta que el macrófago se rompe, son liberados de nuevo al torrente sanguíneo y pueden infectar otros macrófagos cercanos. Los amastigotes pueden ser tomados por otros flebótomos cuando se alimentan de la sangre del hospedador. En el intestino medio del vector, los amastigotes se diferencian a promastigotes, los cuales viajan a las glándulas salivares, ya listos para infectar un nuevo hospedador. ....	6
<b>FIGURA 5   Situación endémica de LV a nivel mundial en 2020.</b> Imagen modificada de WHO, 2021. ....	8
<b>FIGURA 6   Situación endémica de LC a nivel mundial en 2021.</b> Imagen modificada de WHO 2021. ....	9
<b>FIGURA 7   Estructura química de los derivados de Sb<sup>v</sup> (A) antimoniato de meglumina y (B) estibogluconato de sodio.</b> Imagen modificada de Frézard et al., 2008. ....	11
<b>FIGURA 8   Estructura química de la anfotericina B</b> (Angiolella et al., 2017). ....	12
<b>FIGURA 9   Estructura química de la Miltefosina</b> (Saint-Pierre-Chazalet et al., 2009). ....	12
<b>FIGURA 10   Estructura química de la Paromomicina</b> (Carneiro et al., 2010). ....	13
<b>FIGURA 11   Estrategias de vacunación frente la leishmaniasis</b> (Keerti & Kumar, 2021). ....	13
<b>FIGURA 12   Estrategias de vacunación.</b> 1) Leishmanización. Promastigotes vivos causan lesiones en la piel. 2) Parásitos vivos atenuados son inyectados intradérmicamente a través de la piel, sin generar riesgo de infección ni lesiones en la piel. 3) Los promastigotes se transforman en amastigotes y son internalizados por células dendríticas (DCs), las cuales viajan a los ganglios linfáticos para realizar la presentación antigénica a las células T. 4) Diferentes poblaciones de células T efectoras y de memoria generadas tras la presentación antigénica. 5) Debido a la baja parasitemia, estas poblaciones de células T persisten en el cuerpo, proporcionando protección a largo plazo contra la picadura del vector que contiene parásitos de <i>Leishmania</i> virulentos. Imagen modificada de (Pacheco-Fernandez et al., 2021). ....	15
<b>FIGURA 13   Dogma central de la vacunación.</b> Las células T protectoras del huésped generadas en el proceso de inmunización crean un estado de protección del hospedador frente al desarrollo de enfermedades tras la exposición al patógeno (Zutshi et al., 2019). ....	16
<b>FIGURA 14   Impacto de la infección por <i>Leishmania</i> en las células del sistema inmune</b> (Costa-Da-silva et al., 2022). ....	18
<b>FIGURA 15   Actividad pro- o anti-inflamatoria de los neutrófilos.</b> Entre sus funciones destacan: la liberación de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas, NETs, liberación de ROS, presentación de antígenos y supresión de la respuesta inmune. Imagen modificada de Chan et al., 2022. ....	19
<b>FIGURA 16   Polarización de los macrófagos hacia el perfil M1 y M2 en la infección por <i>Leishmania</i></b> y su implicación en la patogénesis de la enfermedad. La vía clásica de polarización de los macrófagos se produce en presencia de IFN- $\gamma$ , generándose macrófagos con fenotipo M1, los	

cuales son capaces de producir citoquinas pro-inflamatorias, ROS y RNS que promueven la eliminación de *Leishmania*. La vía alternativa de polarización de los macrófagos se produce en presencia de IL-4 e IL-13, generándose macrófagos con fenotipo M2 anti-inflamatorio, los cuales permiten la supervivencia de los amastigotes (Zutshi et al., 2019).....21

**FIGURA 17 | *Leishmania* inhibe la generación de ROS y RNS y promueve la síntesis de poliaminas para su correcta supervivencia en el interior del hospedador (Gupta et al., 2022). ....22**

**FIGURA 18 | Interacción entre DCs y células T.** Las DCs proporcionan tres señales clave para activar las células T vírgenes e iniciar la respuesta inmune adaptativa. Primeramente, los complejos MHC cargados con el antígeno son reconocidos por los TCRs de las células T. Una segunda señal coestimuladora ocurre entre las moléculas CD80/CD86 de la DC con la molécula CD28 presente en la célula T. Si CD80/CD86 interacciona con la molécula CTLA-4, se transmite una señal inhibitoria para la activación de la célula T. Finalmente, una tercera señal que depende de las citoquinas liberadas por parte de las DCs, que inducirán el desarrollo hacia un fenotipo concreto de células T efectora. Imagen modificada de Filley & Dey, 2017.....24

**FIGURA 19 | Tipos de TLRs y sus correspondientes ligandos.** Los diferentes TLRs se clasifican en TLRs de superficie celular (TLR1, 2, 4, 5 y 6), y TLRs localizados de endosomas (TLR3, 7, 8 y 9). Estos receptores forman homodímeros o heterodímeros y tienen sus respectivos ligandos para ser activados. Después de la unión del ligando a los TLRs, los TLR se dimerizan y experimentan un cambio conformacional para reclutar proteínas adaptadoras aguas abajo para mediar en las vías de señalización celular. Imagen tomada de Noh et al., 2020.....27

**FIGURA 20 | Inhibición de la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B debido al aumento de la expresión de A20 provocada por *Leishmania*,** disminuyendo el proceso inflamatorio y la producción de IL-1 $\beta$ . Imagen modificada de Gupta et al., 2017.....29

**FIGURA 21 | Esquema de la diferenciación de DCs** a partir de células madre hematopoyéticas de médula ósea y un precursor mielóide común. A partir de células madre hematopoyéticas (CD34+), se generan dos tipos de precursores comunes: el mielóide (PMC) y el linfóide (PLC). A partir del PMC, se desarrollan los megacariocitos, los eritrocitos, los monocitos, las DCs y los granulocitos. A partir del PLC, se diferencian las células T, B y NK. Imagen modificada de Wildes et al., 2021.....30

**FIGURA 22 | Moléculas coestimuladoras y sus ligandos.** La modulación de la activación de las células T está mediada por una interacción de diferentes moléculas coestimuladoras expresadas en DCs que tienen función inmunogénica o tolerogénica. La imagen muestra una descripción general de los receptores expresados en DC y sus ligandos de unión en las células T. Imagen modificada de Hubo et al., 2013. ....31

**FIGURA 23 | Esquema de los subtipos de DCs con sus marcadores de superficie y TLRs más característicos. A) cDC1. B) cDC2. C) pDC. ....33**

**FIGURA 24 | Estructura de las moléculas MHC (A) de tipo I (MHC-I) y (B) de tipo II (MHC-II)...38**

**FIGURA 25 | Vía clásica de presentación antigénica en moléculas del MHC-I (Blum et al., 2013). ....40**

**FIGURA 26 | Vía de presentación antigénica en moléculas MHC-II (Blum et al., 2013).....41**

**FIGURA 27 | Vía de presentación cruzada antigénica. A) Vía vacuolar. B) Vía citosólica (Blander, 2018). ....43**

**FIGURA 28 | Vías de transporte vesicular. A) Vía ERGIC. B) Vía ERC. C) Vía LRO. Imagen modificada de Blander, 2018. ....44**

**FIGURA 29 | Papel de los factores de virulencia de *Leishmania* en la entrada al hospedador y su diferenciación desde promastigotes a amastigotes. Imagen modificada de Gupta et al., 2022.....46**

**FIGURA 30 | Secuencia de eventos para una correcta respuesta inmune mediada por linfocitos T a partir de células que sufren ICD (Lamberti et al., 2020). ....47**

**FIGURA 31 | Esquema de la ruta necrótica frente a la apoptótica (Naruka, 2023).....48**

<b>FIGURA 32   Esquema de la ruta intrínseca de apoptosis.</b> Imagen modificada de Ichim & Tait, 2016.....	50
<b>FIGURA 33   Esquema de la ruta extrínseca de apoptosis.</b> Imagen modificada de Ichim & Tait, 2016.....	52
<b>FIGURA 34   Mecanismo molecular de la necroptosis.</b> La unión de TNF induce la formación del complejo I o ripoptosoma, dando como resultado de la activación de la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B. Si esta vía se encuentra inhibida, se activa el complejo IIa, donde la caspasa 8 induce la apoptosis. Si RIPK1 se encuentra desubiquitinado o se ha inhibido su fosforilación, se genera el complejo IIb, induciéndose de nuevo apoptosis. Si la caspasa 8 se encuentra inhibida, RIPK1 y RIPK3 forman el complejo denominado necrosoma, resultando en la activación de MLKL a través de una cascada de fosforilación. MLKL fosforilado sufre un proceso de oligomerización y migra a la membrana plasmática, iniciando la formación de poros. Asimismo, los ligandos de muerte, como FasL o TRAIL, y el LPS pueden activar la necroptosis mediante la formación de necrosomas. Imagen modificada de Seo et al., 2021. ....	54
<b>FIGURA 35   Mecanismo molecular de piroptosis. A)</b> Vía canónica: mediada por inflammasoma, caspasa 1 y GSDMD. <b>B)</b> Vía no canónica: desencadenada en ausencia de inflammasoma, y mediada por caspasa 11 y GSDMD. Ambas vías concluyen con la liberación de IL-1 $\beta$ e IL-18 a través de los poros generados por GSDMD. ....	57
<b>FIGURA 36   Participación de la caspasa 3 y RIPK3 en el proceso de formación del inflammasoma y la escisión de GSDM</b> (Chen et al., 2019).....	58
<b>FIGURA 37   Vector pLEXY-pac iRFP.</b> ....	69
<b>FIGURA 38   Esquema del procedimiento de trabajo para el tratamiento con los inhibidores.</b> ....	69
<b>FIGURA 39   Esquema de la placa de trabajo para el tratamiento con los inhibidores de proteínas implicadas en rutas de muerte celular.</b> .....	69
<b>FIGURA 40   A)</b> Esquema del mecanismo de la reducción de resazurina a resorufina en el ensayo del alamarBlue (Ligasová & Koberna, 2021). <b>B)</b> Esquema del mecanismo del ensayo de citotoxicidad LDH (Tribioscience, 2019). ....	70
<b>FIGURA 41   Esquema del porcentaje teórico de las poblaciones de DCs y células T presentes en un bazo sano de ratón.</b> ....	74
<b>FIGURA 42   Esquema del procedimiento de trabajo para la realización del co-explante.</b> ....	74
<b>FIGURA 43   Esquema del contenido de un pocillo en el experimento del co-explante.</b> Se muestran las relaciones de los diferentes tipos de células empleadas en el experimento. ....	74
<b>FIGURA 44   Vector pLEXY-hyg2.1.</b> Imagen modificada de Jena Bioscience, 2023. ....	81
<b>FIGURA 45   Proceso de transfección de <i>Leishmania</i> con el vector pLEXY-hyg2.1 HASPB:OVA.</b> Imagen modificada de (Chang et al., 2022). ....	81
<b>FIGURA 46   Esquema de las diferentes poblaciones que pueden ser detectadas tras la tinción con IP y Anexina-V,</b> mostrándose los sitios de unión de cada reactivo, donde la Anexina-V se une a la fosfatidilserina y el IP al ADN. Imagen modificada de Kupcho et al. (Kupcho et al., 2019).....	86
<b>FIGURA 47   Esquema de la presentación cruzada antigénica empleando células B3Z.</b> .....	92
<b>FIGURA 48   Esquema de la placa de trabajo empleada en el experimento de presentación cruzada con células B3Z.</b> Se obtuvieron resultados de BMDC, estimuladas o no con LPS (100 ng/mL). Asimismo, también se obtuvieron resultados co-cultivando las células B3Z con BMDM. ..	92
<b>FIGURA 49   Representación esquemática de la tinción con colorantes de viabilidad de unión a aminas</b> (Nordic BioSite, 2019). ....	96
<b>FIGURA 50   Esquema de la presentación cruzada antigénica empleando células B3Z.</b> .....	103

**FIGURA 51 | Principio de los ensayos de dilución de los colorantes empleados para la cuantificación de la proliferación celular.** Las células parentales se tiñen con CellTrace Yellow el día 0. Cuando las células se dividen, el colorante se va diluyendo en las células hijas. El análisis por citometría de flujo permite revelar la presencia de picos más tenues, que corresponderían a las diferentes generaciones de células generadas a partir de la célula parental. Imagen modificada de Sanquin, 2021. .... 103

**FIGURA 52 | Esquema de la placa de trabajo empleada en el experimento de presentación cruzada con células OT-I.** ..... 103

**FIGURA 53 | Viabilidad celular resultante del tratamiento de células BMDM procedentes de ratones C57BL/6 con los compuestos inductores e inhibidores de necroptosis, mediante alamarBlue.** Las células fueron tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M), GSK547 (5  $\mu$ M) y HS-1371 (5  $\mu$ M) durante 24 y 72 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0,1$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples..... 112

**FIGURA 54 | Viabilidad celular resultante del tratamiento de células BMDM con las combinaciones de compuestos inductores de necroptosis, mediante alamarBlue** tras (A, C) 24 h post-infección (24 hpi) y (B, D) 6 d post-infección (6 dpi) con *L. infantum*. Las células fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M), GSK547 (5  $\mu$ M) y HS-1371 (2,5  $\mu$ M) durante 1 h y, posteriormente, las células fueron tratadas con (A-B) 1 ng/mL de LPS y (C-D) 50 ng/mL de LPS durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0,1$ );  $\Delta\Delta$  ( $p < 0,01$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,001$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de viabilidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples..... 113

**FIGURA 55 | Viabilidad celular resultante del tratamiento de células BMDM con las combinaciones de compuestos inductores de necroptosis, mediante alamarBlue** tras (A) 24 h post-infección (24 hpi) y (B) 6 d post-infección (6 dpi) con *L. infantum*. Las células fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M), GSK547 (5  $\mu$ M) y HS-1371 (2,5  $\mu$ M) durante 1 h y, posteriormente con SM-164 (1  $\mu$ M) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta$  ( $p < 0,01$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de viabilidad de BMDM infectados o no, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 115

**FIGURA 56 | Viabilidad celular resultante del tratamiento de células BMDM con las combinaciones de compuestos inductores de necroptosis, mediante alamarBlue** tras (A, C) 24 h post-infección (24 hpi) y (B, D) 6 d post-infección (6 dpi) con *L. infantum*. (A-B) Las células fueron pre-tratadas con Q-VD-OPh (30  $\mu$ M), GSK547 (5  $\mu$ M) y HS-1371 (2,5  $\mu$ M) durante 1 h y, posteriormente, las células fueron tratadas con SM-164 (1  $\mu$ M) y ABT-263 (10  $\mu$ M) durante 24 h. (C-D) Las células fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M), GSK547 (5  $\mu$ M) y HS-1371 (2,5  $\mu$ M) durante 1 h y, posteriormente con SM-164 (1  $\mu$ M) y ABT-263 (10  $\mu$ M) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0,1$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de viabilidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 116

**FIGURA 57 | Citotoxicidad observada en cultivos BMDM mediante el ensayo LDH** tras el tratamiento con compuestos inductores de necroptosis, 24 h (A) y 72 h después (B) de la infección con amastigotes de *L. infantum*. Las células fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M) durante 3 h y, posteriormente, los BMDM fueron tratados con los inhibidores LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (250 nM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0,01$ );  $\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 118

**FIGURA 58 | Citotoxicidad observada en cultivos RAW 264.7 mediante el ensayo LDH tras el tratamiento con compuestos inductores de necroptosis**, 24 h después de la infección con amastigotes (PM) o amastigotes (BM) de *L. infantum*. Las células fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M) durante 3 h y, posteriormente, con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD-5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (250 nM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.01$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectadas o no con amastigotes (PM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\blacklozenge\blacklozenge$  ( $p < 0.001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectadas o no con amastigotes (BM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 119

**FIGURA 59 | Determinación de las actividades caspasa 8 (A), caspasa 9 (B) y caspasas 3/7 (C) tras el tratamiento de BMDM con inductores de necroptosis** tras 24 h de infección con *L. infantum*. Las células fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M) durante 3 h y, posteriormente, los BMDM fueron tratados con los inhibidores LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (TAK) (250 nM) durante 24 h. Como control positivo de apoptosis, se trató a las células durante 24 h con CHX (10  $\mu$ g/mL) tras 24 h post-infección con *L. infantum*. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar el incremento sobre el NT de Unidades Relativas de Fluorescencia ( $\Delta$ RFU) de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 120

**FIGURA 60 | Niveles de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes de los cultivos de células BMDM infectados o no con *Leishmania* durante 24 h con las combinaciones de inductores de necroptosis**. Los cultivos de BMDM fueron pretratados con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M) durante 3 h y, posteriormente con los inhibidores LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (250 nM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0.1$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.001$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 120

**FIGURA 61 | Viabilidad (% RFU) de amastigotes de *L. donovani* LV9 iRFP procedentes de explantes de bazo de ratones infectados**. Los esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos fueron pre-estimulados con un lisado de amastigotes de la cepa *L. donovani* LV9, P3C (500 ng/mL) y BMDM tratados con compuestos inductores de necroptosis. Los BMDM fueron pre-tratados con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M) durante 3 h y, posteriormente con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (TAK) (250 nM) durante 24 h. Los esplenocitos fueron co-cultivados con explantes infectados de ratones (A) C57BL/6 o (B) BALB/c. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. .... 122

**FIGURA 62 | Viabilidad (% RFU) de amastigotes de *L. donovani* LV9 iRFP procedentes de explantes de bazo de ratones infectados**. Los esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos fueron pre-estimulados con un lisado de amastigotes de la cepa *L. donovani* LV9, P3C (500 ng/mL) y células RAW 264.7 tratadas con compuestos inductores de necroptosis. Las células RAW 264.7 fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M) durante 3 h y, posteriormente con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (TAK) (250 nM) durante 24 h. Los esplenocitos fueron co-cultivados con explantes infectados de ratones (A) C57BL/6 o (B) BALB/c. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. .... 123

**FIGURA 63 | Citotoxicidad producida por el tratamiento de BMDM con CHX (10  $\mu$ g/mL) mediante el ensayo LDH**. Las células fueron tratadas durante 24 h, tras 0 y 24 h de infección con *L. infantum*. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados,

mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 125

**FIGURA 64 | Citotoxicidad producida por el tratamiento de RAW 264.7 con CHX (10 µg/mL) mediante el ensayo LDH.** Las células fueron tratadas durante 24 h tras 0 y 24 h de infección con amastigotes (PM) o amastigotes (BM) de *L. infantum*. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Se compararon los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectados y no infectados con amastigotes (PM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. Los símbolos ♦♦ ( $p < 0.01$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectadas y no infectadas con amastigotes (BM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 126

**FIGURA 65 | Citotoxicidad observada en cultivos BMDM mediante el ensayo LDH tras el tratamiento con compuestos inductores de apoptosis intrínseca, 24 h (A, C) y 72 h (B, D) después de la infección con amastigotes de *L. infantum*.** Las células fueron pre-tratadas durante 3 h con 50 ng/mL de LPS (A-B) o 500 ng/mL de P3C (C-D) y, posteriormente, los BMDM fueron tratados con el inhibidor ABT-263 (1 µM) en combinación con AZD-5991 (10 µM) o S63845 (10 µM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0.1$ );  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.01$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 128

**FIGURA 66 | Citotoxicidad observada en cultivos RAW 264.7 mediante el ensayo de LDH tras el tratamiento con compuestos inductores de apoptosis intrínseca, 24 h después de la infección con amastigotes (PM) o amastigotes (BM) de *L. infantum*.** Las células fueron pre-tratadas durante 3 h con 50 ng/mL de LPS (A) y 500 ng/mL de P3C (B) y, posteriormente tratadas con ABT-263 (1 µM) combinado con AZD-5991 (10 µM) o S63845 (10 µM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Se compararon los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectados o no, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. Los símbolos ♦ ( $p < 0.1$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectadas o no con amastigotes (BM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 129

**FIGURA 67 | Determinación de las actividades caspasa 8 (A, B), caspasa 9 (C, D) y caspasas 3/7 (E, F), tras el tratamiento de BMDM con las combinaciones de inductores de apoptosis intrínseca a las 24 h de infección con *L. infantum*.** Las células BMDM fueron pretratadas durante 3 h con 50 ng/mL LPS (A, C, E) y 500 ng/mL de P3C (B, D, F) y, posteriormente se añadió el inhibidor ABT-263 (1 µM) en combinación con AZD-5991 (10 µM) o S63845 (10 µM) durante 24 h. Como control positivo de apoptosis, se trataron las células con 10 µg/mL CHX durante 24 h a las 24 h post-infección con *L. infantum*. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0.1$ );  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.01$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.001$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar el incremento sobre el NT de Unidades Relativas de Fluorescencia ( $\Delta$ RFU) de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 130

**FIGURA 68 | Niveles de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes de cultivos BMDM, infectados o no con *Leishmania*, tras el tratamiento durante 24 h con las combinaciones de compuestos inductores de apoptosis intrínseca.** Las células BMDM fueron pretratadas durante 3 h con 50 ng/mL de LPS (A) y 500 ng/mL de P3C (B) y, posteriormente, se les añadió ABT-263 (1 µM) en combinación con AZD-5991 (10 µM) o S63845 (10 µM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0.1$ )  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 132

**FIGURA 69 | Viabilidad (% RFU) de amastigotes de *L. donovani* LV9 iRFP procedentes de explantes de bazo de ratones infectados.** Los esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos fueron pre-estimulados con un lisado de amastigotes de la cepa *L. donovani* LV9, P3C (500 ng/mL) y BMDM tratados con inductores de apoptosis intrínseca. Los BMDM fueron pre-tratados con LPS (50 ng/mL) o con P3C (500 ng/mL) durante 3 h y, posteriormente con ABT-263 (1  $\mu$ M) en combinación con AZD-5991 (10  $\mu$ M) o S63845 (10  $\mu$ M) durante 3 h y 24 h. Los esplenocitos fueron co-cultivados con explantes infectados de ratones **(A)** C57BL/6 o **(B)** BALB/c. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.01$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.001$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de viabilidad de BMDM tratadas durante 3 h y 24 h mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples..... 133

**FIGURA 70 | Viabilidad (% RFU) de amastigotes de *L. donovani* LV9 iRFP procedentes de explantes de bazo de ratones infectados.** Los esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos fueron pre-estimulados con un lisado de amastigotes de la cepa *L. donovani* LV9, P3C (500 ng/mL) y células RAW 264.7 tratadas con inductores de apoptosis intrínseca. Las células RAW 264.7 fueron pre-tratadas con LPS (50 ng/mL) o con P3C (500 ng/mL) durante 3 h y, posteriormente, con ABT-263 (1  $\mu$ M) en combinación con AZD-5991 (10  $\mu$ M) o S63845 (10  $\mu$ M) durante 24 h. Los esplenocitos fueron co-cultivados con explantes infectados de ratones **(A)** C57BL/6 o **(B)** BALB/c. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples..... 134

**FIGURA 71 | Citotoxicidad observada en cultivos BMDM mediante el ensayo LDH tras el tratamiento con compuestos inductores de apoptosis extrínseca, 24 h después de la infección con amastigotes **(A, C)** o 72 h **(B, D)** de infección con *L. infantum*.** Las células fueron pre-tratadas durante 3 h con 100 ng/mL de LPS **(A-B)** y 500 ng/mL de P3C **(C-D)** y, posteriormente, los BMDM fueron tratados con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (250 nM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD de los diferentes tratamientos. Los símbolos  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.01$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 137

**FIGURA 72 | Citotoxicidad observada en RAW 264.7 mediante el ensayo LDH tras el tratamiento con compuestos inductores de apoptosis extrínseca, 24 h después de la infección con amastigotes (PM) o amastigotes (BM) de *L. infantum*.** Las células fueron pre-tratadas durante 3 h con 100 ng/mL LPS **(A)** o con 500 ng/mL P3C **(B)**. A continuación, las células RAW 264.7 fueron tratadas con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (250 nM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectados y no infectados con amastigotes (PM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\blacklozenge$  ( $p < 0.01$ );  $\blacklozenge\blacklozenge$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectadas y no infectadas con amastigotes (BM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 138

**FIGURA 73 | Determinación de las actividades caspasa 8 **(A, B)**, caspasa 9 **(C, D)** y caspasas 3/7 **(E, F)**, tras el tratamiento de BMDM con las combinaciones de inductores de apoptosis extrínseca a las 24 h de infección con *L. infantum*.** Las células BMDM fueron pretratadas durante 3 h con 100 ng/mL de LPS **(A, C, E)** y 500 ng/mL de P3C **(B, D, F)** y, a continuación, con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (TAK) (250 nM) durante 24 h. Como control positivo de apoptosis, se trató a las células durante 24 h con 10  $\mu$ g/mL CHX tras 24 h post-infección (hpi) con *L. infantum*. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0,1$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta$  ( $p < 0,01$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,001$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar el incremento sobre el NT de Unidades Relativas de Fluorescencia ( $\Delta$ RFU) de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 139

**FIGURA 74 | Niveles de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes de cultivos BMDM, infectados o no con *Leishmania*, tras el tratamiento durante 24 h con las combinaciones de compuestos**

**inductores de apoptosis extrínseca.** Cultivos de BMDM fueron pretratados durante 3 h con 100 ng/mL de LPS (**A**) y 500 ng/mL de P3C (**B**) y, posteriormente, con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (250 nM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0.1$ );  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.01$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 140

**FIGURA 75 | Viabilidad (% RFU) de amastigotes de *L. donovani* LV9 iRFP procedentes de explantes de bazo de ratones infectados.** Los esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos fueron pre-estimulados con un lisado de amastigotes de *L. donovani* LV9, P3C (500 ng/mL) y BMDM tratados con inductores de la apoptosis extrínseca. Los BMDM fueron pre-tratados con LPS (100 ng/mL) o con P3C (500 ng/mL) durante 3 h y, posteriormente con LCL-161 (1  $\mu$ M), AZD-5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (TAK) (250 nM) durante 3 y 24 h. Los esplenocitos fueron co-cultivados con explantes infectados de ratones (**A**) C57BL/6 o (**B**) BALB/c. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.001$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de viabilidad de BMDM tratadas durante 3 h y 24 h mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. .... 142

**FIGURA 76 | Viabilidad (% RFU) de amastigotes de *L. donovani* LV9 iRFP procedentes de explantes de bazo de ratones infectados.** Los esplenocitos de ratones C57BL/6 sanos fueron pre-estimulados con un lisado de amastigotes de *L. donovani* LV9, P3C (500 ng/mL) y células RAW 264.7 tratadas con inductores de la apoptosis extrínseca. Las células RAW 264.7 fueron pre-tratadas con LPS (100 ng/mL) o con P3C (500 ng/mL) durante 3 h y, a continuación, con LCL-161 (1  $\mu$ M), AZD-5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (TAK) (250 nM) durante 24 h. Los esplenocitos fueron co-cultivados con explantes infectados de ratones (**A**) C57BL/6 o (**B**) BALB/c. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. .... 143

**FIGURA 77 | Generación del plásmido pLEXSY-hyg2.1 HASPB:OVA. A)** Vector plasmídico linealizado por la digestión con la enzima de restricción *SwaI* para la expresión de la proteína de fusión HASPB:OVA en *Leishmania*. **B)** Vector pLEXSY-hyg2.1 conteniendo la construcción HASPB:OVA tras el proceso de síntesis. **C)** Resultados de la electroforesis tras la digestión del plásmido pLEXSY-hyg2.1 con las enzimas de restricción *KpnI/BglII* (control de calidad enviado por GeneCust). Tamaño esperado: 1224/8600 bp. **D)** Secuencia del gen que codifica la proteína de fusión HASPB:OVA. Rojo: HASPB (18 aa); Azul: secuencias de los péptidos derivados de OVA reconocidos por MHC-I (SIINFEKL) y MHC-II (ISQAVHAAHAEINEAGR)..... 146

**FIGURA 78 | Curvas de crecimiento de promastigotes de *L. infantum* 2713 transfectados con el vector pLEXSY-hyg2.1 HASPB:OVA. A)** *L. infantum* 2713 HASPB:OVA. **B)** *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA. .... 147

**FIGURA 79 | Análisis por Western Blot de los lisados y sobrenadantes de promastigotes de las cepas de *L. infantum* 2713 transfectadas con el plásmido pLEXSY-hyg2.1 HASPB:OVA,** usando como control negativo las cepas *L. infantum* 2713 WT y *L. infantum* 2713 mCh. La proteína OVA purificada fue usada como control positivo (47 kDa)..... 148

**FIGURA 80 | Imágenes representativas de microscopía confocal de las distintas cepas de *Leishmania* transfectadas con el vector pLEXSY-hyg2.1 HASPB:OVA. A)** Promastigotes de *L. infantum* 2713 HASPB:OVA. **B)** BMDM de un ratón BALB/c infectados *in vitro* (MOI = 10:1) durante 72 h con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA. **C)** Promastigotes de *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA. **D)** BMDM de un ratón BALB/c infectados *in vitro* (MOI = 10:1) durante 72 h con *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss LSM800. Para el marcaje de OVA, se empleó el anticuerpo anti-OVA marcado con FITC (1:500); para el marcaje de los núcleos se empleó el colorante DAPI (1:1000). .... 148

**FIGURA 81 | Imágenes representativas de microscopía confocal de la diferenciación de promastigotes a amastigotes de *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA durante 7 d.** Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss LSM800. Para el marcaje de OVA, se empleó el anticuerpo anti-OVA marcado con FITC (1:500); para el marcaje de los núcleos se empleó el colorante DAPI (1:1000). .... 149

**FIGURA 82 | Análisis del efecto de la radiación UV en la apoptosis de macrófagos RAW 264.7.** **A)** Evaluación de la apoptosis por citometría de flujo mediante la tinción con Annexin V-FITC/IP. En la parte superior del panel se representan las gráficas (FSC/SSC) de las distintas poblaciones de células, tanto infectadas como no infectadas, y a los distintos tiempos de tratamiento. Debajo del FSC/SSC, se muestran las gráficas representativas tras la tinción con Annexin V-FITC/IP de macrófagos RAW 264.7, infectados o no infectados, cultivados durante 4 y 24 h tras el tratamiento con diferentes energías de irradiación ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ), incluyendo el porcentaje de células apoptóticas tardías (cuadrante superior derecho). **B)** Apoptosis tardía (Media  $\pm$  SD) obtenida en macrófagos RAW 264.7 infectados con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA tras 4 h post-tratamiento con energías crecientes de UV ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ). **C)** Apoptosis tardía (Media  $\pm$  SD) obtenidos en macrófagos RAW 264.7 no infectados, tras 4 y 24 h post-tratamiento con energías crecientes de radiación UV ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ). Como control positivo, se trató a las células con PFA al 3% durante 30 min en hielo. En la parte de abajo del panel, están representadas las gráficas de los dos valores de energía elegidos, 240 y 500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*,  $p < 0,1$  \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$ ,  $p < 0.1$ ;  $\Delta\Delta$ ,  $p < 0.01$  resultan de comparar los porcentajes de apoptosis de RAW 264.7 obtenidos tras 4 y 24 h post-UV mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test Sidak's para comparaciones múltiples. .... 151

**FIGURA 83 | Cuantificación del porcentaje de infección de las células RAW 264.7 tras la medición de la fluorescencia emitida por mCherry por citometría de flujo.** Las células RAW 264.7 fueron infectadas con la *L. infantum* 2713 mCherry HASPB:OVA e irradiadas con 500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . La fluorescencia emitida por mCherry fue cuantificada tras **(A y C)** 4 h post-UV y **(B y D)** 24 h post-UV. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto a su control No Infectado (No Inf) mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Tukey's para comparaciones múltiples. Los símbolos NS (No Significativo);  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de fluorescencia mCherry de RAW 264.7 irradiados o no, mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Tukey's para comparaciones múltiples. .... 153

**FIGURA 84 | Evaluación de la eficiencia de la presentación cruzada a través de la cuantificación de la absorbancia generada en la activación del hibridoma de células T B3Z** tras su co-cultivo con **(A, C, E, G)** BMDC y **(B, D, F)** BMDM. Las células fueron incubadas durante 16 h en presencia (+ LPS) o ausencia ( $\emptyset$  LPS) de 100 ng/mL de LPS y, posteriormente, fueron cultivadas con **(A, B)** bbOVA y **(C, D)** sOVA durante 4 h, con **(E, F)** SIINFEKL durante 30 min y con **(G)** células RAW 264.7 durante 24 h. Las células RAW 264.7 fueron irradiadas con 500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  de UV e infectadas con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0,1$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. .... 154

**FIGURA 85 | Estrategia de citometría de flujo seguida para cuantificar la expresión de las moléculas CD80, CD86 y MHC-II en BMDC tras el tratamiento con LPS.** Se seleccionó la población de células de interés mediante el FCS/SSC y, a continuación, se tomó la población viva (Zombie Yellow) positiva a CD11c y CD11b ( $\text{CD11c}^+/\text{CD11b}^+$ ) y positiva a cada uno de los marcadores de interés (CD80, CD86 y MHC-II). .... 156

**FIGURA 86 | Resultados de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y MHC-II en BMDC tras su estimulación con LPS.** **A)** Histogramas representativos obtenidos a partir de las BMDCs  $\text{CD11b}^+\text{CD11c}^+$  que muestran la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 (rojo), CD86 (azul) y MHC-II (rosa) en BMDC no estimuladas (gris) frente a las BMDC estimuladas con LPS (100 ng/mL) durante 8 h. **B)** Porcentaje de expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y MHC-II en BMDC no estimuladas ( $\emptyset$  LPS) y BMDC estimuladas con LPS (100 ng/mL) (+ LPS) durante 8 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\* ( $p < 0,01$ ) de los porcentajes de expresión de cada molécula coestimuladora tras la estimulación con LPS con respecto al control no estimulado, mediante un análisis estadístico t de Student para muestras independientes. .... 157

**FIGURA 87 | Estrategia seguida en citometría de flujo para cuantificar la proliferación de células T CD8.** Se seleccionó la población de células de interés mediante el FCS/SSC y, a continuación, se tomó la población viva (Zombie Yellow) negativa a CellTrace Yellow (células OT-I proliferadas). .... 158

**FIGURA 88 | Evaluación de la eficiencia de la presentación cruzada antigénica mediante la cuantificación de la proliferación de células T CD8 (OT-I) mediante citometría de flujo, empleando**

el ensayo de dilución del CellTrace Yellow. Células OT-I co-cultivadas durante 48 h con DCs que habían sido cebadas con distintos cargos: amastigotes irradiados de la cepa *L. infantum* 2713 HASPB:OVA; RAW 264.7 sin tratamiento; RAW 264.7 irradiadas con energías de 240 o 500 mJ/cm<sup>2</sup> de radiación UV; RAW 264.7 pretratadas con LPS y tratadas con ABT-263 (1 µM) + AZD-5991 (10 µM), o con LCL161 (1 µM). Como control negativo se emplearon células OT-I co-cultivadas con DCs sin cargo. Como controles positivos se emplearon los anticuerpos anti-CD3 (2 µg/mL) y anti-CD28 (0,5 µg/mL), y DCs cebadas con LPS (100 ng/mL) + SIINFEKL (2 µM). **A)** Histogramas representativos que muestran la dilución de CellTrace Yellow en células OT-I. **B)** Porcentajes de proliferación de células OT-I basados en la dilución del CellTrace Yellow. Cada barra del histograma representa la Media ± SD \*\* (p < 0,01); \*\*\* (p < 0,001) de los diferentes cargos con respecto al control No Estimulado, mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. .... 159

**FIGURA 89 | Estrategia seguida en citometría de flujo para el fenotipado de un bazo no infectado para la determinación de la proporción de las distintas subpoblaciones de DCs.** En el primer gráfico se muestra el FSC/SSC, seguido de la selección de las células individualizadas (*Single Cells*), enfrentando el área (FCS-A) y la altura (FSC-H) del FSC. A continuación, en el tercer gráfico se escoge la población viva (*Zombie Yellow*). A partir de las células vivas, se generan dos gráficos, uno marcado con la flecha roja y otro con la flecha verde. (→) Se enfrenta el MHC-II con el CD11c, los cuales son marcadores para cDCs (MHC-II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>), a partir de las cuales se generan dos subpoblaciones: cDC1 (XCR1<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>) y cDC2 (XCR1<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>). (→) Se enfrenta el Siglec-H con CD317 para seleccionar la población de pDC. .... 161

**FIGURA 90 | Estrategia seguida en citometría de flujo para el fenotipado de un bazo infectado con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA para obtener la proporción de las distintas subpoblaciones de DCs y su porcentaje de infección.** **A)** Obtención de la proporción de cDC1 y cDC2 a partir de las cDC totales en un bazo infectado, y sus porcentajes de infección correspondientes. **B)** Obtención de la frecuencia de las pDCs en un bazo infectado, y su porcentaje de infección. Los porcentajes de infección fueron obtenidos tras la detección de la fluorescencia del anticuerpo FITC OVA. Se realizó el control FMO (*Fluorescence Minus One*) para el anticuerpo FITC OVA para establecer el límite superior para la señal de fondo en el fluorocromo omitido. .... 162

**FIGURA 91 | A) Proporción de las poblaciones de cDCs y pDCs halladas en el bazo de ratones No Infectados (No Inf) y de ratones infectados** durante 3, 8 y 16 semanas (wpi – semanas post-infección) tras el análisis por citometría de flujo. **B) Proporción de las poblaciones cDC1 y cDC2 a partir de la población total de cDCs.** Cada barra del histograma representa la Media ± SD \*\* (p < 0,01); \*\*\* (p < 0,001); \*\*\*\* (p < 0,0001) de los diferentes porcentajes de células de los ratones infectados con respecto al ratón no infectado mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. .... 163

**FIGURA 92 | Porcentaje de infección de cada subtipo de DCs tras la detección de OVA por citometría de flujo.** Cada barra del histograma representa la Media ± SD de los diferentes porcentajes de células de los ratones infectados con respecto al ratón no infectado mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples... 163

**FIGURA 93 | A) Imágenes representativas de microscopía confocal de PanDCs purificadas del bazo de un ratón BALB/c infectado con la cepa *L. infantum* 2713 HASPB:OVA.** Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss LSM800. Para la identificación de OVA, se empleó el anticuerpo anti-OVA conjugado con Alexa Fluor 647 (4 µg/mL); para la identificación de los núcleos se empleó DAPI (1:1000). **B)** Ejemplo del recuento manual de PanDCs realizado sobre una imagen de microscopía confocal basado en el conteo de núcleos (rodeados en amarillo). **C)** Porcentajes de infección de PanDCs obtenidos tras el recuento manual aleatorio de células infectadas y no infectadas realizado en imágenes adquiridas por microscopía confocal. .... 164

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1   Tipos de TLRs y sus correspondientes ligandos.</b> ARN de doble cadena (ARNds); ARN de cadena simple (ARNss); ARN ribosómico (ARNr). Imagen modificada de Hutcheon et al., 2016. ....	28
<b>TABLA 2   Longitudes de onda espectrales para Caspasas 3/7, 8 y 9.</b> .....	67
<b>TABLA 3   Reactivos.</b> .....	70
<b>TABLA 4   Medios de cultivo.</b> .....	71
<b>TABLA 5   Reactivos.</b> .....	75
<b>TABLA 6   Medios de cultivo.</b> .....	75
<b>TABLA 7   Reactivos.</b> .....	82
<b>TABLA 8   Medios de cultivo.</b> .....	83
<b>TABLA 9   Reactivos.</b> .....	86
<b>TABLA 10   Medios de cultivo.</b> .....	86
<b>TABLA 11   Reactivos.</b> .....	88
<b>TABLA 12   Medios de cultivo.</b> .....	88
<b>TABLA 13   Concentraciones de OVA/BSA empleadas para la preparación de las bbOVA.</b> .....	92
<b>TABLA 14   Reactivos.</b> .....	93
<b>TABLA 15   Medios de cultivo.</b> .....	93
<b>TABLA 16   Anticuerpos empleados para la cuantificación del estado de activación de BMDC.</b> .....	96
<b>TABLA 17   Reactivos.</b> .....	96
<b>TABLA 18   Medios de cultivo.</b> .....	97
<b>TABLA 19   Reactivos.</b> .....	104
<b>TABLA 20   Medios de cultivo.</b> .....	105
<b>TABLA 21   Anticuerpos empleados para el fenotipado de bazo murino.</b> .....	108
<b>TABLA 22   Reactivos.</b> .....	108
<b>TABLA 23   Medios de cultivo.</b> .....	109

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>5Z-7-OZ</b>	5Z-7-Oxozeaenol
<b>aa</b>	Aminoácido
<b>ABC</b>	ATP Binding Cassette transporters
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNg</b>	ADN genómico
<b>AmB-D</b>	Anfotericina B desoxicolato
<b>ANXA1</b>	Anexina A1
<b>APAF-1</b>	Apoptosis Protease-Activating Factor-1
<b>APC</b>	Célula Presentadora de Antígeno
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNds</b>	ARN de doble cadena
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ARNr</b>	ARN ribosómico
<b>ARNss</b>	ARN de cadena simple
<b>ASC</b>	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
<b>BAK</b>	Bcl-2 Homologous Antagonist Killer
<b>BATF3</b>	Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 3
<b>BAX</b>	BCL-2 Associated X protein
<b>Bcl-2</b>	B Cell Lymphoma
<b>BID</b>	BH3 Interacting-Domain
<b>BMDC</b>	Bone Marrow Dendritic Cell
<b>BMDM</b>	Bone Marrow Derived Macrophage
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>BSA</b>	Albúmina Sérica Bovina
<b>CARD</b>	Caspase Activation and Recruitment Domains
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>cDC</b>	Célula Dendrítica Convencional
<b>cDC1</b>	Célula Dendrítica Convencional de Tipo 1
<b>cDC2</b>	Célula Dendrítica Convencional de Tipo 2
<b>c-FLIP</b>	FLICE-like inhibitory protein
<b>CHX</b>	Cicloheximida
<b>Clec9A</b>	C-Type Lectin Domain Containing 9A
<b>CLIP</b>	Péptido de Cadena Invariable Asociado a MHC-II
<b>CLR</b>	Receptor de Lectinas tipo-C
<b>CNX</b>	Calnexina
<b>CPRG</b>	Chlorophenol Red- $\beta$ -D-galactopyranoside
<b>CRT</b>	Calreticulina
<b>CTLA4</b>	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

<b>CYLD</b>	Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase
<b>DALYS</b>	Disability-Adjusted Life Years
<b>DAMP</b>	Patrones Moleculares Asociados a Daño
<b>DC</b>	Célula dendrítica
<b>DED</b>	Death Effector Domain
<b>DIC</b>	Coagulación Intravascular Diseminada
<b>DISC</b>	Death-Inducing Signaling Complex
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNDi</b>	Drugs for Neglected Diseases initiative
<b>dpi</b>	Días Post-Infección
<b>DR</b>	Receptor de Muerte
<b>ERAAP</b>	Aminopeptidasa de RE Asociada con el Procesamiento de Antígenos
<b>ERC</b>	Compartimento de Reciclaje Endocítico
<b>ERGIC</b>	Compartimento Intermedio entre el RE y el aparato de Golgi
<b>ERK</b>	Extracelular Regulated protein Kinase
<b>FADD</b>	Fas-Associated Death Domain
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Fit3L</b>	FMS-like tyrosine kinase 3 Ligand
<b>FSC</b>	Forward scatter
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GM-CSF</b>	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
<b>GMCSF-R</b>	Receptor de GM-CSF
<b>GSDM</b>	Gasdermina
<b>HASPB</b>	Proteínas de Superficie Aciladas e Hidrofílicas
<b>HCV</b>	Virus de la Hepatitis C
<b>HLH</b>	Linfocitosis Hemofagocítica
<b>HMGB1</b>	High Mobility Group-Box 1
<b>HO-1</b>	Hemo Oxidasa 1
<b>hpi</b>	Horas Post-Infección
<b>IAPs</b>	Inhibitors of Apoptosis Proteins
<b>ICD</b>	Muerte Celular Inmunogénica
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B quinasa
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IP</b>	Yoduro de Propidio
<b>IRAK</b>	Interleukin-1 Receptor Associated Kinase
<b>IRAP</b>	Aminopeptidasa Regulada por Insulina
<b>IRF8</b>	Interferon Regulatory Factor 8

<b>iRFP</b>	InfraRed Fluorescent Protein
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal Kinases
<b>KO</b>	Knock Out
<b>L.</b>	Leishmania
<b>LC</b>	Leishmaniasis Cutánea
<b>LDH</b>	Lactato Deshidrogenasa
<b>LMC</b>	Leishmaniasis Mucocutánea
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LRO</b>	Lysosomal Related Organelles
<b>LV</b>	Leishmaniasis Visceral
<b>M1</b>	Macrófago de Tipo 1 (pro-inflamatorio)
<b>M2</b>	Macrófago de Tipo 2 (anti-inflamatorio)
<b>MA</b>	Antimoniato de meglumina
<b>MCL-1</b>	Myeloid Cell Leukemia-1
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>MLKL</b>	Pseudokinase Mixed Lineage Kinase domain-Like
<b>MOI</b>	Multiplicity of infection
<b>MOMP</b>	Permeabilización de la Membrana Externa Mitocondrial
<b>mTOR</b>	Mammalian Target of Rapamycin
<b>MyD88</b>	Myeloid Differentiation primary response 88
<b>Nec-1</b>	Necrostatina-1
<b>NETs</b>	Neutrophil Extracellular Traps
<b>NF-κB</b>	Nucleo Factor-κB
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NLR</b>	NOD-Like Receptor
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NOSII</b>	Óxido Nítrico Sintasa 2
<b>NT</b>	No Tratado
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OVA</b>	Ovalbúmina
<b>P3C</b>	Pam3CSK4
<b>PAC</b>	Puromicina
<b>PAMP</b>	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>pDC</b>	Célula Dendrítica Plasmocitoide
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PKC</b>	Protein Kinasa C
<b>PKDL</b>	Leishmaniasis dérmica post Kala-azar
<b>PLC</b>	Precursor Linfoide Común
<b>PLC</b>	Complejo de Carga de Péptidos

<b>PMC</b>	Precursor Mieloide Común
<b>PRR</b>	Receptor de Reconocimiento de Patrones
<b>PTP</b>	Proteínas Tirocín-Fosfatasas
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RFP</b>	Red Fluorescent Protein
<b>RFU</b>	Unidades Relativas de Fluorescencia
<b>RIPK1</b>	Receptor Interacting serine/threonine Kinase 1
<b>RIPK3</b>	Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 3
<b>RNS</b>	Reactive Nitrogen Species
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>RT</b>	Temperatura Ambiente
<b>SbV</b>	Antimoniales pentavalentes
<b>SHP-1</b>	Src-Homology 2 domain containing Phosphatase-1
<b>Siglec-H</b>	Sialic acid binding Ig-like lectin H
<b>SIRP<math>\alpha</math></b>	Signal Regulatory Protein $\alpha$
<b>SMAC</b>	Second Mitochondrial Activator of Caspases Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein
<b>SNARE</b>	Receptor
<b>SOD-1</b>	Superóxido Dismutasa 1
<b>SSC</b>	Side scatter
<b>SSG</b>	Estibogluconato de sodio
<b>TAK1</b>	TGF- $\beta$ -Activated Kinase 1
<b>TCR</b>	T-Cell Receptor
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor- $\beta$
<b>Th</b>	T helper
<b>TLR</b>	Toll-Like Receptor
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TNFR</b>	Receptor de TNF
<b>TRADD</b>	TNF Receptor-Associated Death Domain
<b>TRAF</b>	TNF Receptor Associated Factor
<b>TRAIL</b>	TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand
<b>TRIF</b>	TIR-domain-containing adapter-Inducing interFeron- $\beta$
<b>UCP2</b>	Uncoupling Protein 2
<b>UGT1</b>	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VIH</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
<b>WR</b>	Working Reagent
<b>WT</b>	Wild Type (cepa salvaje)
<b>XCR1</b>	X-C Motif Chemokine Receptor 1
<b>ZBP1</b>	Z-DNA Binding Protein 1

## RESUMEN

La leishmaniasis incluye un grupo de enfermedades tropicales desatendidas causadas por protozoos del género *Leishmania*. Este parásito intracelular ha desarrollado la capacidad de sobrevivir en el interior de las células inmunes del hospedador, evitando así su exposición al sistema inmune. Los tratamientos farmacológicos actuales presentan numerosos efectos adversos y son proclives a generar resistencias, por lo que urge la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. En los últimos años, la muerte celular inmunogénica (ICD) ha surgido como una terapia prometedora frente a ciertas enfermedades, entre las que destaca el cáncer. Basándonos en esta hipótesis, hemos tratado de imitar el microambiente tumoral al microambiente generado por *Leishmania* en el interior de las células hospedadoras, con el fin de desarrollar un tratamiento novedoso que eliminara los parásitos intracelulares de *Leishmania* mediante la activación del sistema inmunitario.

La apoptosis es una ruta celular programada dependiente de caspasas que produce la formación de cuerpos apoptóticos que engloban el contenido celular, sin provocar una respuesta inmunológica. La necroptosis presenta características intermedias entre la necrosis y la apoptosis, ya que es una muerte celular programada inmunogénica que implica la ruptura de la membrana celular, pero es independiente de caspasas. Basándonos en esto, hemos inducido distintos tipos de ICD en macrófagos murinos infectados con *Leishmania infantum*, por irradiación UV o mediante inhibidores de proteínas involucradas en estos procesos. Nuestros resultados mostraron que la viabilidad de los macrófagos a los que se les había inducido ICD era mayor en los que se encontraban infectados con respecto a las células no infectadas. Los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) generados por macrófagos a los que se les había inducido ICD se emplearon como estimuladores de bazos sanos para que, tras su co-cultivo con bazos infectados, generaran una respuesta inmune frente a los amastigotes intracelulares. Se logró reducir la viabilidad de los amastigotes de los explantes infectados cuando las vías inducidas en macrófagos murinos eran la apoptosis intrínseca y la extrínseca. Sin embargo, el proceso necroptótico no generó ninguna respuesta frente a la infección.

El proceso de presentación cruzada ha surgido como un mecanismo para combatir inmunológicamente tumores y patógenos intracelulares, como virus o parásitos. Sin embargo, se han descrito diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte de *Leishmania*, entre los que destaca la alteración de la ruta de presentación cruzada antigénica. Con tal fin, se quiso evaluar el efecto de los DAMPs en la activación de las células dendríticas (DCs) involucradas en el proceso de presentación antigénica y en la proliferación de células T, mediante experimentos de presentación cruzada. Para ello, se crearon las cepas *L. infantum* 2713 HASPB:OVA y *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA,

las cuales expresan la proteína OVA anclada a la cara externa de su membrana plasmática. De esta forma, la estimulación de las DCs por parte de los DAMPs procedentes de células RAW 264.7 inducidas a ICD, junto con la presentación en moléculas MHC-I de antígenos de *Leishmania* procedentes de lisados de amastigotes de *L. infantum* 2713 HASPB:OVA, y su co-cultivo con células T específicas de OVA (el hibridoma B3Z o células OT-I), proporciona un método de evaluación de la presentación cruzada al cuantificar la proliferación de células T. Con ello, obtuvimos que los DAMPs generados tras el tratamiento de las células con radiación UV y compuestos que inhiben proteínas antiapoptóticas implicadas en la ruta extrínseca de apoptosis eran capaces de promover un proceso de presentación cruzada antigénica. Tras la realización del fenotipado de bazo infectados con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA, se comprobó que el parásito es capaz de infectar las distintas subpoblaciones de DCs y, además, modificar su frecuencia con respecto a bazo de ratones no infectados.

**Palabras clave:** *Leishmania*; necroptosis; apoptosis intrínseca; apoptosis extrínseca; piroptosis; muerte celular inmunogénica (ICD); presentación cruzada antigénica; células dendríticas.

# 1. INTRODUCCIÓN

# 1.1. LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida causada por un parásito protozoario intracelular perteneciente a más de veinte especies del género *Leishmania*. Estos parásitos son transmitidos al hospedador por la picadura de la hembra de la mosca de la arena perteneciente a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leishmaniasis es una de las siete enfermedades tropicales más importantes y representa un serio problema de salud mundial, ya que se la considera endémica en más de noventa países de Asia, África, América Central y del Sur, sin olvidar su presencia en los países de Europa del Sur. La leishmaniasis es una enfermedad grave con un amplio espectro de manifestaciones clínicas y diferentes grados de severidad que dependen de las especies de *Leishmania* implicadas y de la respuesta inmune del hospedador (Torres-Guerrero et al., 2017; World Health Organization, 2021; Mann et al., 2021).

## 1.1.1. EL GÉNERO *Leishmania*

Los parásitos del género *Leishmania* son protozoos que pertenecen a la clase *Kinetoplastea*, familia *Trypanosomatidae* (FIGURA 1), y se han llegado a caracterizar más de veinte especies dentro de este género.

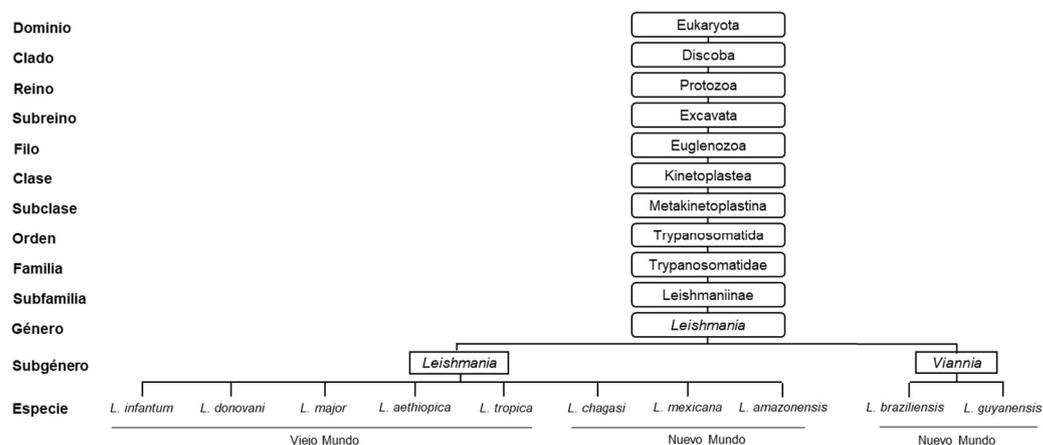
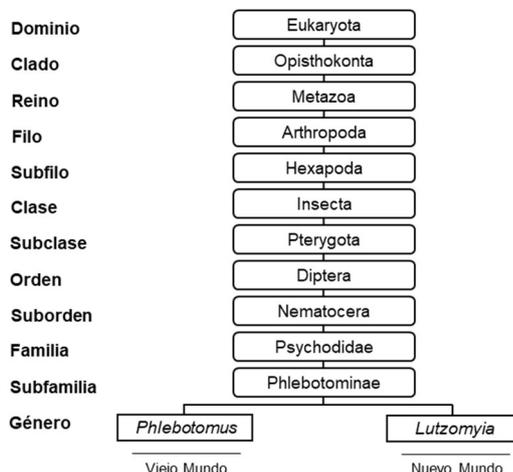


FIGURA 1 | Esquema de la clasificación taxonómica jerárquica del género *Leishmania*. Información obtenida de la base de datos de Schoch et al., 2020.

## 1.1.2. CICLO BIOLÓGICO DE *Leishmania*

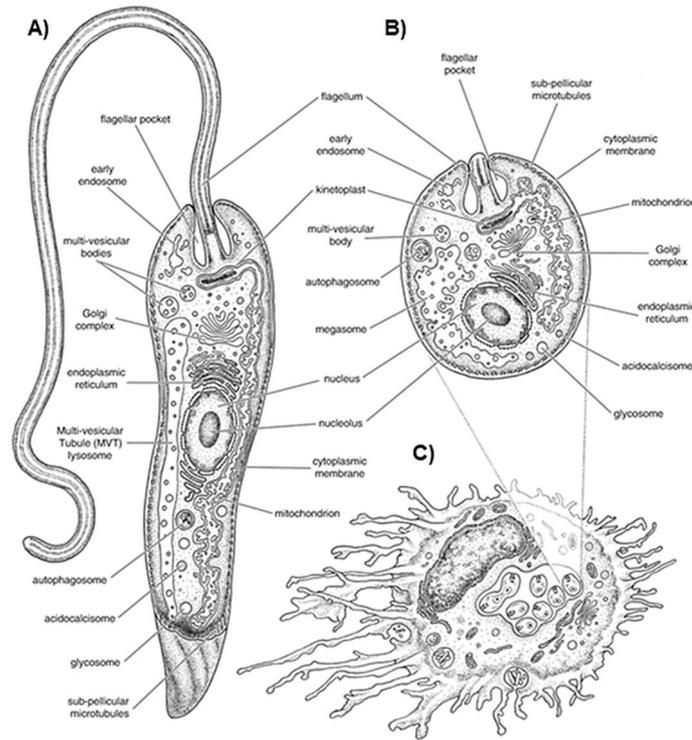
El ciclo biológico de *Leishmania* es digenético, empleando dos hospedadores: uno definitivo (un mamífero, humanos y cánidos, domésticos y silvestres) y un insecto vector (Sasidharan & Saudagar, 2021). Son parásitos intracelulares obligados que se transmiten a

través de, aproximadamente, setenta tipos diferentes de flebótomos pertenecientes a los géneros *Lutzomyia*, en el Nuevo Mundo (refiriéndose al hemisferio oeste, incluyendo México, América Central, América del Sur y Estados Unidos), y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (refiriéndose al hemisferio este, incluyendo Asia, Oriente Medio, África y Europa del Sur) (**FIGURA 2**) (Torres-Guerrero et al., 2017; Mann et al., 2021).

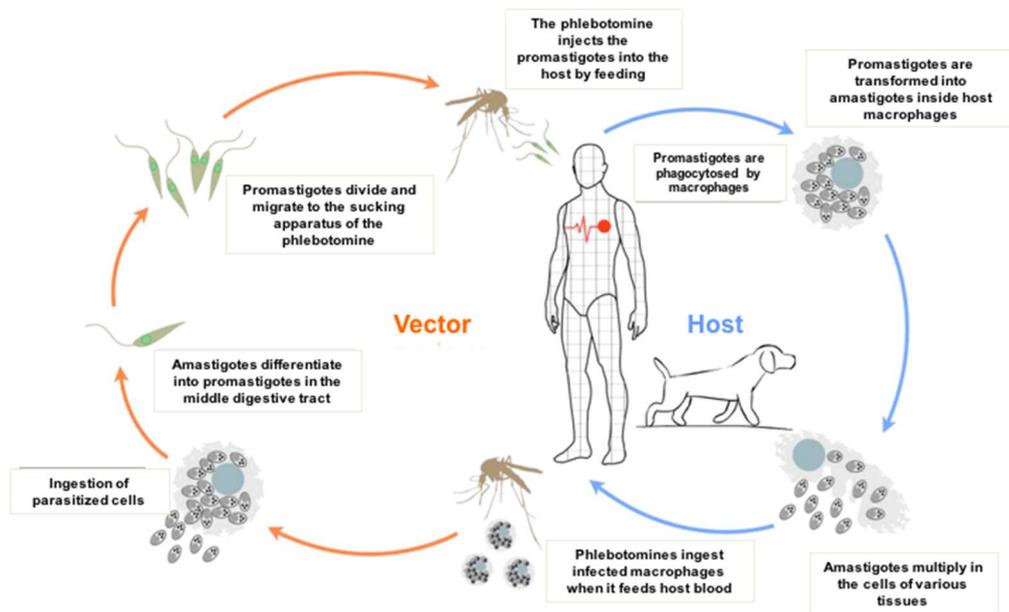


**FIGURA 2 | Esquema de la clasificación taxonómica jerárquica de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*.** Información obtenida de la base de datos de Schoch et al., 2020.

Inicialmente, cuando la hembra del insecto vector succiona sangre de un paciente con leishmaniasis, se infecta con **amastigotes** (forma unicelular redondeada y sin flagelo funcional) (**FIGURA 3B**). Una vez dentro de la mosca, estos amastigotes se diferencian en **promastigotes** procíclicos (formas unicelulares alargadas y móviles gracias a la existencia de un flagelo funcional) (**FIGURA 3A**). El flagelo no sólo da movilidad al parásito, sino que también le permite fijarse al intestino de la mosca. La forma procíclica se divide en el intestino medio abdominal del insecto, dando lugar a los promastigotes nectomonados, los cuales dejan de dividirse (**FIGURA 4**). Los nectomonas migran al intestino medio anterior del insecto transformándose en las formas leptomonadas. Finalmente, los leptomonas se transforman en promastigotes metacíclicos y se mueven desde el intestino hasta las glándulas salivares, donde son capaces de infectar a un nuevo hospedador definitivo. Este proceso se denomina metaciclogénesis y dura entre 7 y 11 d (Gossage et al., 2003). Con la picadura, los promastigotes metacíclicos entran en el torrente sanguíneo del mamífero, reclutan neutrófilos y son fagocitados por éstos o por otras células del sistema inmune, como células dendríticas dérmicas y macrófagos residentes, los cuales comienzan un proceso fagocítico. Dentro del fagolisosoma de los macrófagos, los promastigotes se diferencian a amastigotes, y comienzan a multiplicarse. Cuando el macrófago se rompe, los amastigotes maduros se liberan al exterior celular y están listos para infectar otras células del sistema inmunitario del hospedador, generando las manifestaciones clínicas iniciales de la enfermedad. El ciclo biológico se completa cuando otro flebótomo succiona sangre de la persona infectada (Lodge & Descoteaux, 2008; Beattie & Kaye, 2011; Sasidharan & Saudagar, 2021).



**FIGURA 3 | Representación esquemática de la arquitectura celular y subcelular de *Leishmania*. A) Promastigote. B) Amastigote intracelular. C) Amastigotes infectando la vacuola parasitófora dentro de un fagocito de mamífero (Aebischer & Mrva, 2016).**



**FIGURA 4 | Ciclo biológico de parásitos de *Leishmania*.** Cuando un flebótomo se encuentra infectado con promastigotes y pica a un hospedador mamífero, los promastigotes son liberados al torrente sanguíneo, donde son fagocitados por macrófagos. En el interior de estas células, los promastigotes se transforman en amastigotes, los cuales se multiplican hasta que el macrófago se rompe, son liberados de nuevo al torrente sanguíneo y pueden infectar otros macrófagos cercanos. Los amastigotes pueden ser tomados por otros flebótomos cuando se alimentan de la sangre del hospedador. En el intestino medio del vector, los amastigotes se diferencian a promastigotes, los cuales viajan a las glándulas salivares, ya listos para infectar un nuevo hospedador.

### 1.1.3. EPIDEMIOLOGÍA

La leishmaniasis es una enfermedad con una distribución mundial, encontrándose en todos los continentes, excepto en Oceanía, afectando a más de ochenta y ocho países en todo el mundo (Torres-Guerrero et al., 2017; Volpedo et al., 2021). Es endémica en Asia, África, América y en la región Mediterránea (Torres-Guerrero et al., 2017). Entre 12 y 25 millones de personas en el mundo están infectadas, 350 millones se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad al encontrarse en regiones endémicas de leishmaniasis, estimándose que cada año hay entre 700.000 y 1 millón de nuevos casos (Torres-Guerrero et al., 2017; WHO, 2021). Los factores de riesgo para la leishmaniasis incluyen la pobreza, la migración, la malnutrición, mala higiene y el estado inmunocomprometido del hospedador (WHO, 2021).

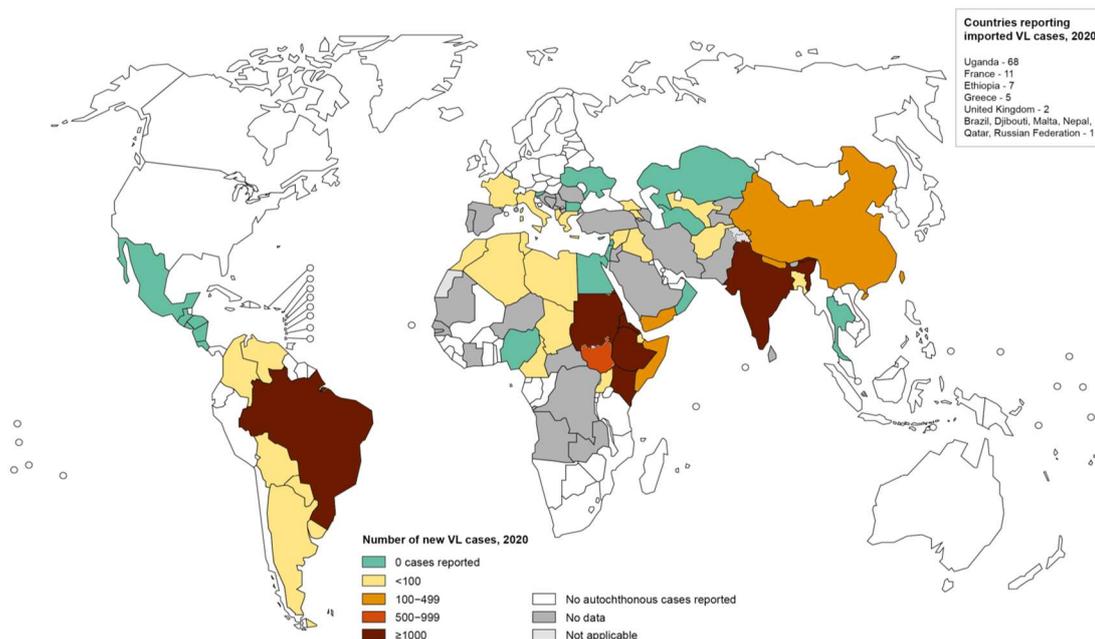
En humanos, existen tres manifestaciones de la enfermedad: leishmaniasis visceral, la cual corresponde a la forma más grave, ya que casi siempre es mortal si no se administra tratamiento; leishmaniasis cutánea, siendo ésta la más común, caracterizada por causar úlceras en la piel; y leishmaniasis mucocutánea, que afecta a boca, nariz y garganta (WHO, 2021).

#### 1.1.3.1. Leishmaniasis visceral (LV)

También conocida como Kala-azar o fiebre negra, es la forma más grave de leishmaniasis, donde los órganos internos, como el timo, bazo, hígado y la médula ósea, aparecen dañados y puede ser mortal si no es tratada correctamente (Gupta et al., 2022). Ocupa el segundo y séptimo puesto dentro del ranking de las enfermedades tropicales en cuanto a mortalidad y pérdida de años de vida por discapacidad (DALYs), respectivamente (Wang et al., 2016). Se estima una incidencia anual entre 50,000 y 90,000 casos (DNDi, 2021b), lo que supone una disminución significativa en comparación con estimaciones previas que estaban en torno a 400,000 casos (CDC, 2020). Más de 600,000 personas se encuentran en riesgo de adquirir esta enfermedad, la cual provocó 5,710 muertes en 2019 (DNDi, 2021b). Según la OMS, más de un 95% de los casos fueron reportados en Brasil, China, Etiopía, India, Kenia, Somalia y Sudán (**FIGURA 5**) (WHO, 2021). Los agentes causantes de la LV en el Viejo Mundo incluyen a *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum*, mientras que el principal agente causante en el Nuevo Mundo es *Leishmania chagasi* (Burza et al., 2018).

*L. donovani* afecta principalmente al Sudeste Asiático, en particular India, Bangladesh y Nepal, y África oriental, especialmente Sudán, Etiopía, Kenia y Somalia (Burza et al., 2018; van Griensven & Diro, 2019; Pacheco-Fernández et al., 2021). Para la supervivencia de *L. donovani*, el reservorio es el humano infectado, por lo que en la región asiática y africana la transmisión ocurre antroponóticamente (Pace, 2014; Safavi et al., 2021). Por su parte *L. infantum* causa LV en el área mediterránea, Oriente Medio, Afganistán, Irán, Pakistán y Brasil (Bern et al., 2008). Los reservorios de *L. infantum* son cánidos, silvestres y domésticos y, con

menos frecuencia, liebres y conejos, por lo que, en la zona mediterránea y latinoamericana. En este caso su transmisión es zoonótica (Molina et al., 2012; Jiménez et al., 2014).



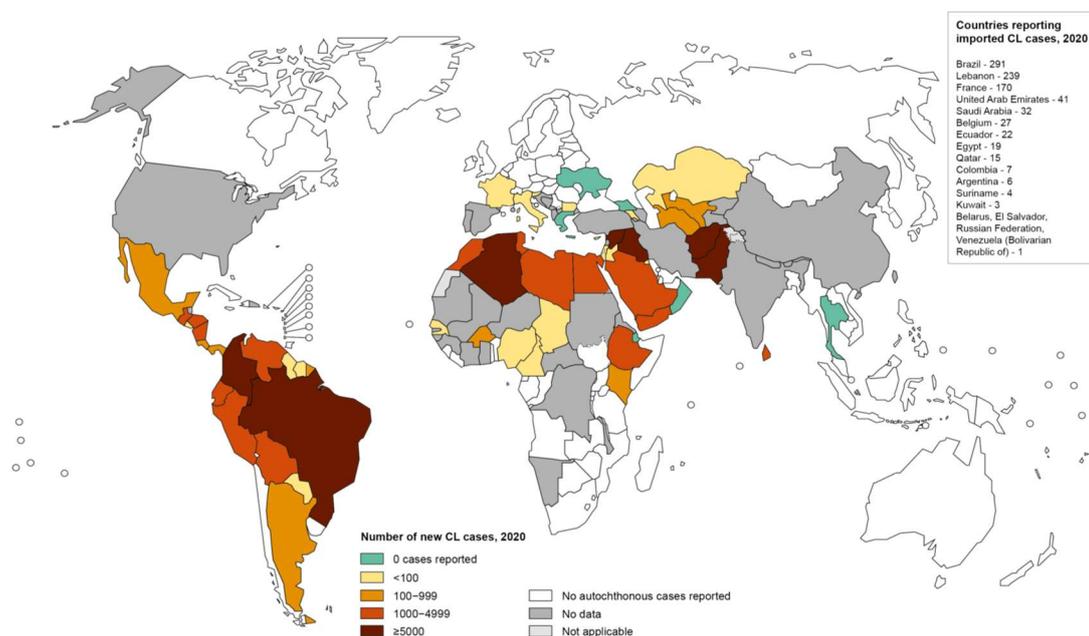
**FIGURA 5 | Situación endémica de LV a nivel mundial en 2020.** Imagen modificada de WHO, 2021.

Los síntomas clínicos de la LV incluyen fiebre, pérdida de peso, anemia, hiper-gammaglobulinemia, pancitopenia, elevación de las enzimas hepáticas, hipoalbuminemia y hepatoesplenomegalia, provocado por un proceso inflamatorio debido al aumento de la carga parasitaria (Bern et al., 2005; Aronson et al., 2017; Kimberlin et al., 2018; Gupta et al., 2022). Aunque la mayoría de los casos son asintomáticos en las fases iniciales de la infección, los síntomas se pueden desarrollar varios años después, debido al desarrollo de inmunodeficiencia de los pacientes (Ready, 2014; Aronson et al., 2017; Kimberlin et al., 2018). Los niños presentan un mayor riesgo de desarrollar LV debido a la inmadurez de su sistema inmunitario por la falta de exposición al patógeno (Kimberlin et al., 2018). Entre las complicaciones de la enfermedad, señalamos la coagulación intravascular diseminada (DIC) y la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH) (Mishra et al., 2004; Rajagopala et al., 2008; Varma & Naseem, 2010; Rosado & Kim, 2013; Levi & Sivapalaratnam, 2018; Skinner et al., 2019) que es una condición relacionada con la activación incontrolada de linfocitos T citotóxicos y células *natural killer* (NK) (Rajagopala et al., 2008; Daher et al., 2015). Asimismo, tras el tratamiento de pacientes que han sufrido LV por *L. donovani*, puede aparecer la leishmaniasis dérmica post Kala-azar (PKDL). La PKDL se caracteriza por máculas, maculopápulas y erupciones nodulares en pacientes recuperados de LV. Normalmente, estas erupciones surgen alrededor de la boca y se distribuyen gradualmente a otras partes del cuerpo, como hombros, tronco y extremidades (van Griensven & Diro, 2019; Das, 2020; Zijlstra et al., 2020). La conexión con el tratamiento parece deberse a una patogénesis inmunológica ya que, durante la LV, las células mononucleares de la sangre periférica no producen interferón

gamma (IFN $\gamma$ ), pero comienzan a liberarlo tras el tratamiento, causando una inflamación en la piel que resulta en las lesiones características (Zijlstra et al., 2020). Estudios recientes asocian PKDL con una respuesta inmune de tipo Th1, especialmente por la producción de IFN $\gamma$ , junto con IL-10 en la sangre periférica de pacientes recuperados de LV (Gupta et al., 2022). Otra de las consecuencias de la LV es la insuficiencia renal por una disfunción intersticial y glomerular (Libório et al., 2012; Duarte et al., 2020).

### 1.1.3.2. Leishmaniasis cutánea (LC)

Es la forma más común de leishmaniasis. A diferencia de la LV, es más leve y, por lo general, se cura por sí sola. Esta enfermedad es endémica en 90 países, presentando un rango de incidencia entre 600,000 a 1 millón de casos por año, aunque solo 200,000 casos son notificados (DNDi, 2021a). Cerca del 95% de los casos ocurren en América, la cuenca Mediterránea, Oriente Medio y Asia Central (**FIGURA 6**) (WHO, 2021), concretamente en Afganistán, Pakistán, Siria, Arabia Saudí, Argelia, Irán, Brasil y Perú (Desjeux, 2004; Torres-Guerrero et al., 2017). En este momento, solo el 50% de los tratamientos actuales son efectivos (DNDi, 2021a). En el Viejo Mundo, las principales especies causantes de LC son *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* y *Leishmania tropica*. En el Nuevo Mundo, los principales agentes son *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania mexicana* y *Leishmania amazonensis* (Burza et al., 2018; Gupta et al., 2022).



**FIGURA 6 | Situación endémica de LC a nivel mundial en 2021.** Imagen modificada de WHO 2021.

La LC puede ser tanto antroponótica (*L. tropica*) como zoonótica (*L. major*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana* y *L. amazonensis*). Viviendas de mala calidad,

animales peridomésticos, la proximidad a áreas boscosas son factores de riesgo para la transmisión de LC (Davies et al., 1995; Yadon et al., 2003; Negeira et al., 2008; Pedrosa & Ximenes, 2009; De Araujo et al., 2016).

La LC no pone en peligro la vida del paciente, pero puede conducir a una morbilidad cosmética, estigmatización social y efectos psicológicos (Yanik et al., 2004; Bennis et al., 2017). Las manifestaciones clínicas incluyen úlceras crónicas en el lugar de la picadura, dejando cicatrices de por vida. Esto es debido a que las pápulas aumentan de tamaño creando nódulos que se ulceran lentamente durante los siguientes meses de infección (Fikre et al., 2017). La gravedad de la enfermedad y la capacidad curativa dependerá de la especie de *Leishmania* que esté implicada en la infección (Burza et al., 2018).

### 1.1.3.3. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

Es una variante rara y grave de LC causada por *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. mexicana* en el Nuevo Mundo. Más del 90% de los casos se dan en Bolivia, Brasil, Etiopía y el Perú (WHO, 2021; Gupta et al., 2022). La LMC se caracteriza por lesiones ulcerosas en las mucosas, provocando una destrucción parcial o total de las mismas y del cartílago orofaríngeo, labios y paladar, afectando ocasionalmente a la laringe y provocando neumonía (Burza et al., 2018; Abadías-Granado et al., 2021). Aproximadamente el 90% de los casos de LMC muestran una cicatriz del episodio previo de LC, el cual pudo ocurrir hasta varios años atrás (Marsden, 1986; Bennis et al., 2017; Zijlstra et al., 2020). Estos síntomas se pueden atribuir a una fuerte respuesta inmunopatológica del hospedador, que produce la destrucción de sus propios tejidos (Cincurá et al., 2017; Gupta et al., 2022). El tratamiento es esencial para controlar la infección (Abadías-Granado et al., 2021).

## 1.2. TRATAMIENTOS FRENTE *Leishmania*

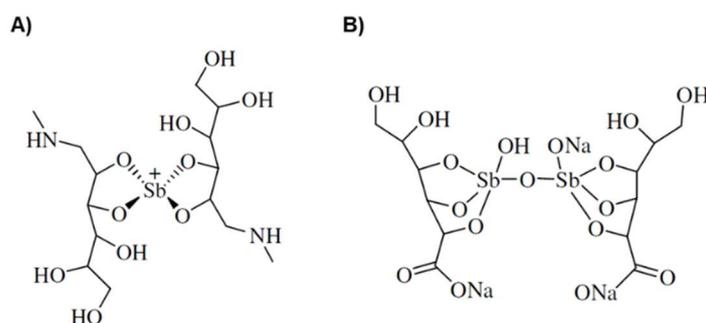
Actualmente, el tratamiento más efectivo contra la leishmaniasis se basa en fármacos antimoniales. Se ha observado un rechazo del tratamiento por parte de la población, debido a su alta toxicidad y efectos secundarios. Estos factores reducen la adherencia al tratamiento, generándose así cepas resistentes del parásito (Imbert et al., 2014; Rezvan et al., 2014; Roatt et al., 2020). La formulación de la anfotericina B desoxicolato en liposomas ha reducido estos efectos secundarios, sin embargo, su elevado coste y la falta de recursos en los países diana, reducen su uso (Obonaga et al., 2014; Vanaerschot et al., 2014; Baptista et al., 2015; van Griensven et al., 2016; Roatt et al., 2020). Otros fármacos, como la miltefosina, inducen rápidamente resistencias, y la respuesta a este tratamiento varía en función de la especie del parásito que genera la enfermedad. Es por ello por lo que urge el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento para la leishmaniasis (Roatt et al., 2020). La vacunación con

inmunidad duradera es el objetivo fundamental para el control de la leishmaniasis. Además, las infecciones naturales responsables de LC y LV causan una inmunidad robusta, por lo que justifica las investigaciones que tienen como objetivo desarrollar vacunas contra *Leishmania* (Moafi et al., 2019).

### 1.2.1. QUIMIOTERAPIA frente *Leishmania*

#### 1.2.1.1. Antimoniales pentavalentes ( $Sb^V$ )

Estos compuestos se han empleado durante casi siete décadas como el tratamiento de primera línea frente a la leishmaniasis. Las dos formulaciones principales son antimonio de meglumina (MA) y estibogluconato de sodio (SSG) (**FIGURA 7**). Los derivados del  $Sb^V$  se comportan como porfármacos que tienen que reducirse dentro del organismo a su forma activa ( $Sb^{III}$ ), la cual presenta una alta afinidad hacia ligandos que contienen nitrógeno y grupos sulfhidrilo (Frézard et al., 2009). Aunque son efectivos, el uso de estos compuestos está limitado por el requerimiento de una administración parenteral diaria, alta toxicidad y efectos secundarios. Para el tratamiento de la LC, los  $Sb^V$  se administran mediante infiltración intralesional. Los efectos secundarios incluyen irritación local, alteraciones hepáticas y cardíacas, anorexia, náuseas y vómitos (Sundar & Chakravarty, 2015). Con la aparición de resistencias, ha surgido una nueva estrategia de tratamiento que consiste en la combinación de fármacos. En el este de África, la combinación de SSG y paromomicina ha sido empleada como tratamiento de elección para la LV (Musa et al., 2012; Kimutai et al., 2017).



**FIGURA 7 | Estructura química de los derivados de  $Sb^V$  (A) antimonio de meglumina y (B) estibogluconato de sodio. Imagen modificada de Frézard et al., 2008.**

#### 1.2.1.2. Anfotericina B desoxicolato (AmB-D) y Anfotericina B liposomal

Este fármaco es un macrólido poliénico con actividad antifúngica de amplio espectro activo frente *Leishmania* spp. En India, debido a la pérdida de efectividad de los derivados del  $Sb^V$ , la AmB-D (**FIGURA 8**) ha sido elegida como tratamiento de primera línea para la LV. Este compuesto se une a los esteroides presentes en la membrana plasmática de los parásitos, más eficazmente al ergosterol, formando canales iónicos e incrementando su permeabilidad (Gray

et al., 2012). Los efectos secundarios se manifiestan como fiebre, hipokalemia, miocarditis y nefrotoxicidad, pero gracias a las formulaciones liposomales, estos efectos adversos se han visto minimizados. AmBisome® es la única formulación aprobada por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) (Sundar et al., 2007b).

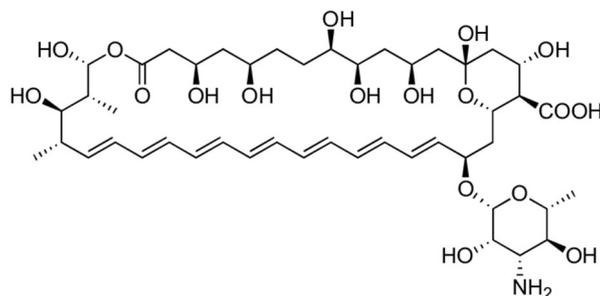


FIGURA 8 | Estructura química de la anfotericina B (Angiolella et al., 2017).

### 1.2.1.3. Miltefosina

Este fármaco ha sido empleado como antineoplásico, hasta que en la década de 1980 fue identificado como una nueva terapia frente la leishmaniasis, siendo el único tratamiento oral existente en la actualidad (Croft et al., 1987; Sundar & Chakravarty, 2015). La miltefosina (**FIGURA 9**) es efectiva tanto *in vitro* como *in vivo*, y su mecanismo de acción consiste en alterar las rutas de señalización células y la síntesis de la membrana celular, provocando un proceso apoptótico (Verma & Dey, 2004). Sin embargo, tras una década de uso, comenzaron a surgir resistencias por lo que, en ciertas regiones, solo se recomienda su uso en combinación con otros fármacos (Srivastava et al., 2017; van Griensven & Diro, 2019). Asimismo, presenta efectos secundarios, entre los que destacan las alteraciones gastrointestinales, hepatotoxicidad y teratogenicidad (Sundar & Chakravarty, 2015).

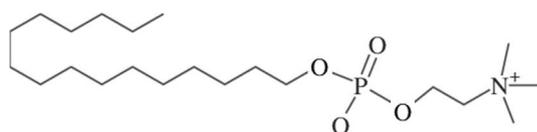


FIGURA 9 | Estructura química de la Miltefosina (Saint-Pierre-Chazalet et al., 2009).

### 1.2.1.4. Paromomicina

Es un antibiótico aminoglicósido que interfiere en la síntesis proteica e inhibe la respiración mitocondrial, pero además se ha demostrado que es un agente leishmanicida efectivo. La paromomicina (**FIGURA 10**) es administrado de manera tópica y sistémica, dependiendo de las especies etiológicas o las características de la lesión (Sundar & Chakravarty, 2008; Jhingran et al., 2009). La paromomicina ha mostrado una baja efectividad como monoterapia, por lo que se suele emplear en combinación con otros fármacos (Hailu et

al., 2010; Musa et al., 2012). Presenta efectos secundarios, entre los que se incluyen dolor y quemazón en la zona de aplicación, hepatotoxicidad y ototoxicidad (Sundar et al., 2007a).

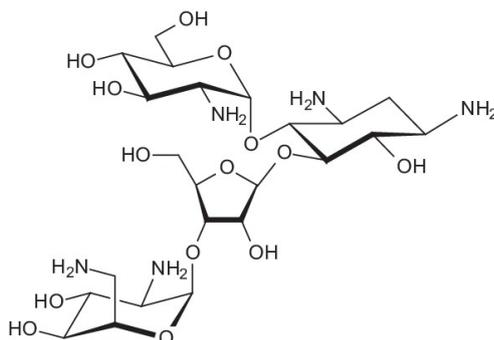


FIGURA 10 | Estructura química de la Paromomicina (Carneiro et al., 2010).

### 1.2.2. VACUNAS frente *Leishmania*

El estado de la quimioterapia frente *Leishmania* está fuertemente comprometido por la aparición de fenotipos resistentes a los fármacos. Por ello, otra de las estrategias de tratamiento de la leishmaniasis se basa en el desarrollo de vacunas (FIGURA 11).

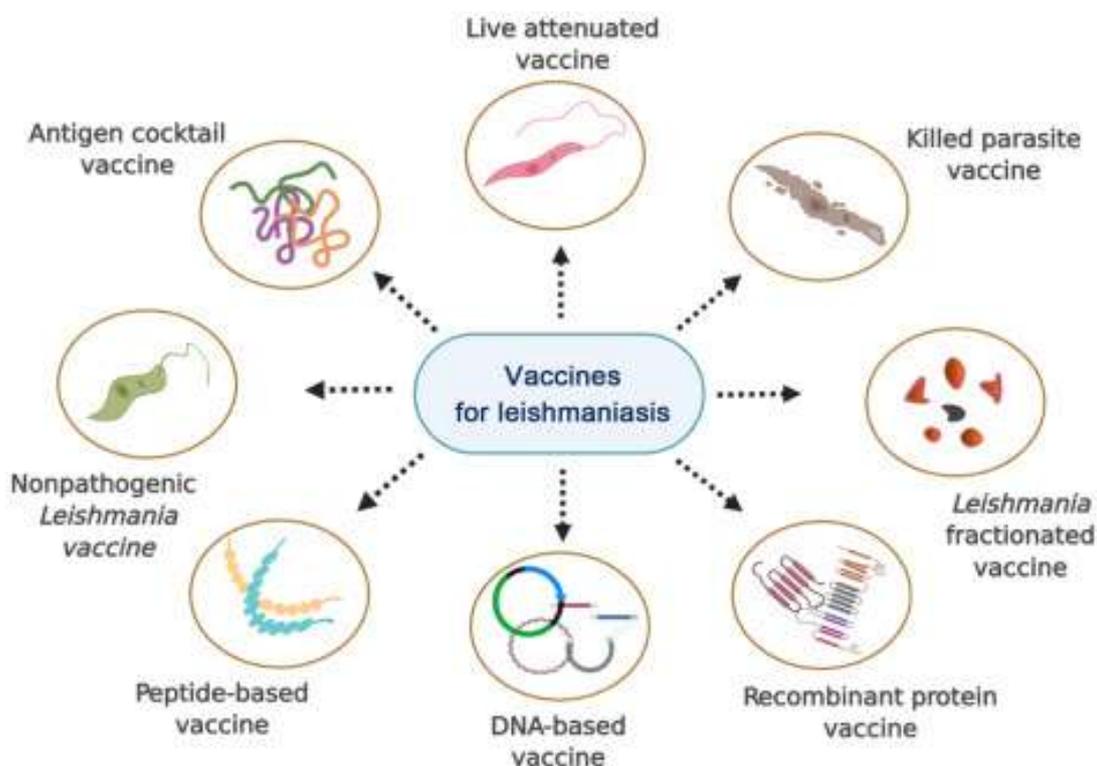


FIGURA 11 | Estrategias de vacunación frente la leishmaniasis (Keerti & Kumar, 2021).

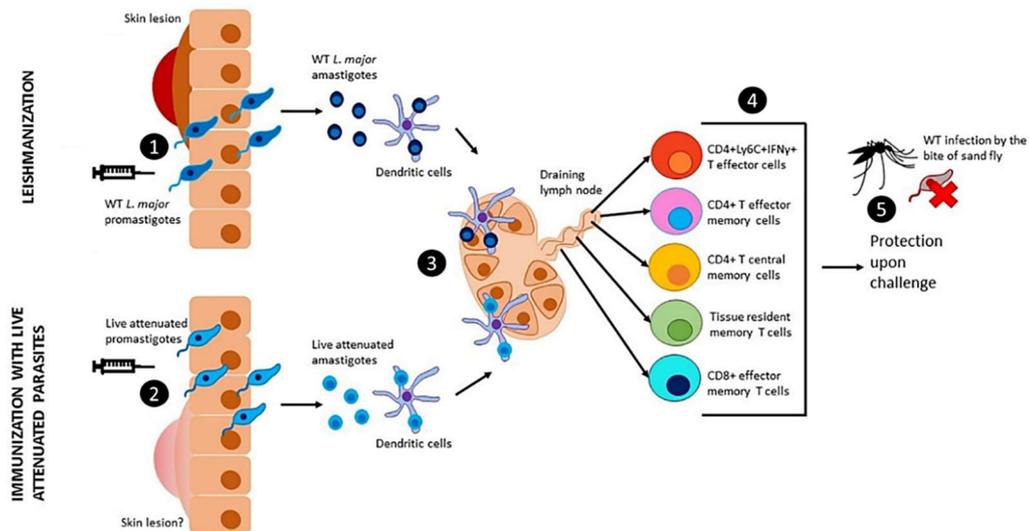
A pesar de la alta morbilidad y mortalidad de la leishmaniasis, no existen actualmente vacunas disponibles en medicina humana. Durante varias décadas, se han intentado desarrollar vacunas preventivas contra la leishmaniasis empleando parásitos muertos o vivos

atenuados, proteínas recombinantes o vacunas de ADN, con el objetivo de generar una respuesta inmune, sin causar patologías (Srivastava et al., 2016; Volpedo et al., 2021).

### 1.2.2.1. Vacunas de primera generación

Utilizan antígenos procedentes de *Leishmania*, tanto en forma de parásitos muertos o vivos atenuados (Volpedo et al., 2021). Este tipo de vacunas son las únicas vacunas candidatas que han progresado para la evaluación en un ensayo clínico de Fase III (Vélez et al., 2000). En 1939, se desarrolló una vacuna que consistía en parásitos completos muertos de *Leishmania*, pero no proporcionaba la suficiente protección frente al parásito, suponiendo que no era una buena vacuna candidata (Noazin et al., 2008). La leishmanización (**FIGURA 12**), que consiste en la inoculación de parásitos virulentos de *L. major* a sujetos sanos para prevenir la enfermedad, fue el primer intento de crear una vacuna frente a la leishmaniasis. Hoy en día, es el único sistema vacunal eficiente que se ha utilizado en humanos y, aunque no es del todo seguro (Nadim et al., 1983; Khamesipour et al., 2005; Mutiso et al., 2013), fue empleado ampliamente durante décadas en Oriente Medio (Khamesipour et al., 2005). La leishmanización sugiere que una amplia variedad de antígenos de *Leishmania*, así como la persistencia de bajos niveles de parásitos, podría ser necesaria para proporcionar una inmunidad de larga duración y una alta efectividad de la vacuna (Saljoughian et al., 2014; Mendonça, 2016).

El siguiente paso fue generar vacunas con parásitos vivos atenuados (**FIGURA 12**), con el fin de crear inmunidad a largo plazo, pero con menos efectos secundarios. Éstos son capaces de inducir una respuesta inmune, como si se tratase de una infección natural, pero sin el riesgo de producir la enfermedad, ya que el parásito es liberado y procesado de la misma manera que en la ruta de infección natural, y todos los antígenos del parásito se expresan para su presentación antigénica al sistema inmune del hospedador. Esto supone el desarrollo de células efectoras específicas de antígeno y una inmunidad protectora a largo plazo contra la reinfección (Pandey et al., 2020). Los primeros procesos se fundaban en la atenuación del parásito mediante cultivos prolongados *in vitro* (Mitchell et al., 1984), cultivos sometidos a presión farmacológica (Daneshvar et al., 2003), radiaciones gamma (Rivier et al., 1993), temperaturas extremas (Gorczynski, 1985) o mutagénesis química (Kimsey et al., 1993). Estos parásitos atenuados, a pesar de ser menos virulentos, no eran lo suficientemente seguros ya que cabía la posibilidad de que los parásitos revirtieran a una forma virulenta (Coutinho De Oliveira et al., 2020).



**FIGURA 12 | Estrategias de vacunación.** 1) Leishmanización. Promastigotes vivos causan lesiones en la piel. 2) Parásitos vivos atenuados son inyectados intradérmicamente a través de la piel, sin generar riesgo de infección ni lesiones en la piel. 3) Los promastigotes se transforman en amastigotes y son internalizados por células dendríticas (DCs), las cuales viajan a los ganglios linfáticos para realizar la presentación antigénica a las células T. 4) Diferentes poblaciones de células T efectoras y de memoria generadas tras la presentación antigénica. 5) Debido a la baja parasitemia, estas poblaciones de células T persisten en el cuerpo, proporcionando protección a largo plazo contra la picadura del vector que contiene parásitos de *Leishmania* virulentos. Imagen modificada de (Pacheco-Fernandez et al., 2021).

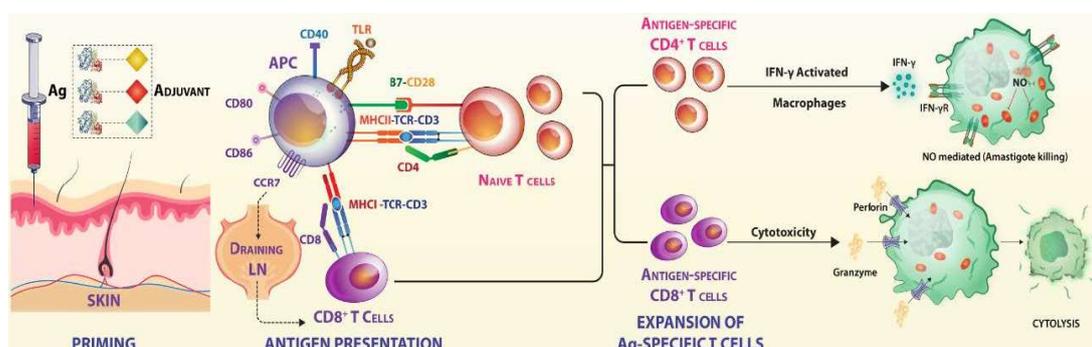
### 1.2.2.2. Vacunas de segunda generación

Se basan en la atenuación genética de los parásitos, eliminando la presencia de factores de virulencia o proteínas esenciales para su supervivencia (Titus et al., 1995; Dey et al., 2013; Fiuza et al., 2013). Otro de los métodos son las llamadas vacunas vectorizadas, basadas en el empleo de parásitos vivos avirulentos, como *L. tarentolae* (Breton et al., 2005), suponiendo una opción más segura, pudiendo albergar en su genoma antígenos candidatos mediante manipulación genética, y creando un gran potencial para controlar a *Leishmania* como parásito intracelular (Mizbani et al., 2009; Saljoughian et al., 2013). Las vacunas de segunda generación también se centran en los antígenos del patógeno, incluyendo fracciones de proteínas purificadas, proteínas recombinantes o sintéticas, o virus y bacterias recombinantes que contienen la información genética del antígeno (Nagill & Kaur, 2011). Varias vacunas de segunda generación han inducido protección en un proceso de reinfección, siendo más eficaces que sus predecesoras procedentes de parásitos muertos. LEISH-F1 fue la primera vacuna que progresó a ensayos clínicos, donde mostró seguridad e inmunogenicidad frente *L. major* y *L. infantum* (Gillespie et al., 2016). Sin embargo, las vacunas basadas en proteínas puras producían una respuesta inmune celular débil, por lo que se requería el uso de adyuvantes y dosis múltiples para mejorar su eficacia (Raman et al., 2012). Sin embargo, presentaban la ventaja de no contener parásitos vivos, por lo que no suponían riesgo de infección y eran adecuados para individuos inmunocomprometidos (Volpedo et al., 2021).

### 1.2.2.3. Vacunas de tercera generación

Son aquellas basadas en la administración de ADN o ARNm, que codifique para ciertas proteínas de interés de *Leishmania* y generar así una respuesta inmune frente a ellas (Domínguez-Bernal et al., 2015). La primera vacuna de tercera generación desarrollada consistía en un gen que codificaba para la proteína gp63 capaz de inducir una respuesta inmune de tipo Th1 y proteger frente la infección de *L. major* (Xu et al., 1995; Xu & Liew, 1995; Walker et al., 1998). Las vacunas de ADN presentan varias ventajas, entre las que destacan la facilidad de producción, su estabilidad y su seguridad, así como la posibilidad de fusionar múltiples genes de antígenos en un solo plásmido. La expresión del antígeno codificado ocurre después de varios días, permitiendo la inducción de una respuesta inmune celular y humoral que proporciona una inmunidad a largo plazo. Asimismo, se ha visto que son capaces de inducir una respuesta inmune fuerte del tipo Th1 (Cui, 2005). En general, las vacunas de ADN han sido exitosas en modelos animales, sin embargo, en humanos generan una pobre inmunogenicidad, siendo incapaces de generar grandes beneficios en clínica (Hobernik & Bros, 2018).

En los últimos años, ciertos estudios se han centrado en las vacunas basadas en células dendríticas (DCs). Éstas poseen un fuerte potencial como tratamiento frente a patógenos, e incluso cáncer, ya que dirigir los antígenos de la vacuna a las DCs ha demostrado ser una forma eficaz de inducir linfocitos T citotóxicos y respuestas de anticuerpos (**FIGURA 13**) (Shortman & Heath, 2010; Bagirova et al., 2016). Esto es debido al importante papel que tienen las DCs en la respuesta inmune frente *Leishmania*, siendo capaces de captar y procesar sus antígenos para presentárselos a las células T e inducir una respuesta inmune. De esta forma, las DCs pueden estimular la producción de altas cantidades de citoquinas proinflamatorias, como IL-12 e IFN- $\gamma$ , con el fin de desarrollar una respuesta inflamatoria del tipo Th1, la cual tiene un efecto preventivo en la progresión de la infección por *Leishmania* (Bagirova et al., 2016). Asimismo, existe una urgente necesidad de explotar la ruta de presentación antigénica exclusiva presente en DCs, conocida como presentación cruzada, como mecanismo de desarrollar vacunas de células T contra enfermedades infecciosas y cáncer (Fehres et al., 2014).



**FIGURA 13 | Dogma central de la vacunación.** Las células T protectoras del huésped generadas en el proceso de inmunización crean un estado de protección del hospedador frente al desarrollo de enfermedades tras la exposición al patógeno (Zutshi et al., 2019).

En los últimos años, la muerte celular inmunogénica (ICD) se ha empleado como una terapia potencial frente al cáncer, debido a su capacidad para activar el sistema inmunológico basada en la presentación antigénica. La participación esencial de las DCs en las respuestas inmunitarias desencadenadas cuando las células cancerosas se someten a ICD se ha descrito en diferentes estudios (Tesniere et al., 2008; Ghiringhelli et al., 2009; Cirone et al., 2012; Ma et al., 2013), lo que sugiere que la capacidad de los inductores de ICD para estimular una respuesta de células T antitumorales eficiente depende de la presencia y susceptibilidad a la activación de las DCs en el microambiente tumoral (Lamberti et al., 2020). Apoyándonos en estos estudios que se basan en el empleo de la ICD como terapia inmunogénica, hemos querido provocar distintas rutas de muerte celular que puedan causar ICD, pudiendo servir éstas como un mecanismo de activación de DCs contra el parásito de *Leishmania*, asemejando el microambiente tumoral al microambiente producido por *Leishmania* en las células del sistema inmune.

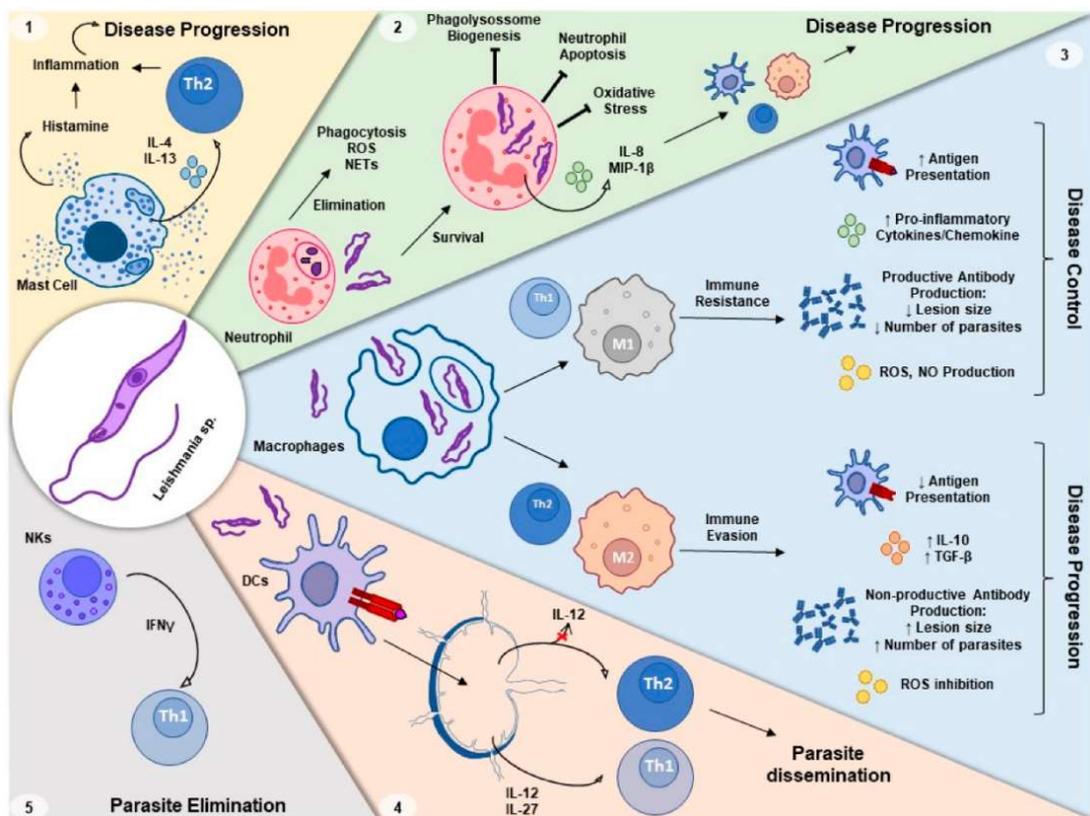
### 1.3. RESPUESTA INMUNE FRENTE *Leishmania*

Durante el transcurso natural de la infección, y tras la inoculación de los promastigotes por parte del vector, los parásitos comienzan inmediatamente su batalla para sobrevivir frente a las defensas del hospedador por medio de su interacción con los componentes del sistema inmune innato. Los parásitos de *Leishmania* entran en contacto con un amplio rango de poblaciones de células fagocíticas, entre las que se incluyen neutrófilos, DCs, y monocitos. Las primeras células fagocíticas reclutadas en el sitio de la infección son neutrófilos y macrófagos (Courret et al., 2002), sin embargo, la célula hospedadora de elección por parte de *Leishmania* es el macrófago. Estas células fagocitan los promastigotes liberados por el vector y facilitan su diferenciación en amastigotes, así como su replicación dentro de los fagolisosomas (Real et al., 2014). Los parásitos son capaces de sobrevivir y replicarse en el interior de los macrófagos al manipular su actividad antimicrobiana (Arango Duque & Descoteaux, 2015). Asimismo, bloquean la apoptosis de la célula infectada para permitir la dispersión de amastigotes a células nuevas a través de extrusiones en la membrana, las cuales atraen y son internalizadas por macrófagos cercanos no infectados (Real et al., 2014). Esta colonización de los macrófagos ocurre más fuertemente en médula ósea, bazo, hígado y ganglios linfáticos en el caso de la LV, en la piel en el caso de la LC y en las mucosas en la LMC (Rodrigues et al., 2016; Gurel et al., 2020).

La eliminación de parásitos por parte de los macrófagos depende de la activación de una respuesta inmunitaria adecuada, que suele ser iniciada por las DCs. Las células innatas también pueden modular la respuesta inmunitaria adaptativa a través de la liberación de quimiocinas y citocinas necesarias para activar las células T. Gracias a la presentación de antígenos por parte de los macrófagos infectados, las células T CD4<sup>+</sup> se diferencian hacia un

perfil Th1, liberando IFN- $\gamma$ , el cual activa a los macrófagos para que produzcan especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) y aumenten la fusión de los fagolisosomas, para llevar a cabo los mecanismos de defensa contra el parásito (Muller et al., 1989; Qadoumi et al., 2002; Glennie et al., 2017; Elmahallawy et al., 2021). Por el contrario, la respuesta inmune Th2 está caracterizada por la liberación de IL-4, IL-13 y la producción de anticuerpos, pudiendo ser contraproducente para la eliminación de los parásitos responsables de la LC (Gabriel et al., 2019; Bhor et al., 2021). Sin embargo, la producción de IL-4 puede ser requerida en la eliminación de la infección por *L. donovani* en la LV (Alexander et al., 2000; Goto & Lindoso, 2004). Cabe destacar que la respuesta humoral no juega un papel central en la eliminación de los parásitos, ya que *Leishmania* se esconde en el interior de los fagolisosomas, protegiéndose así de los efectos destructivos del sistema inmune del hospedador (Vannier-Santos et al., 2005).

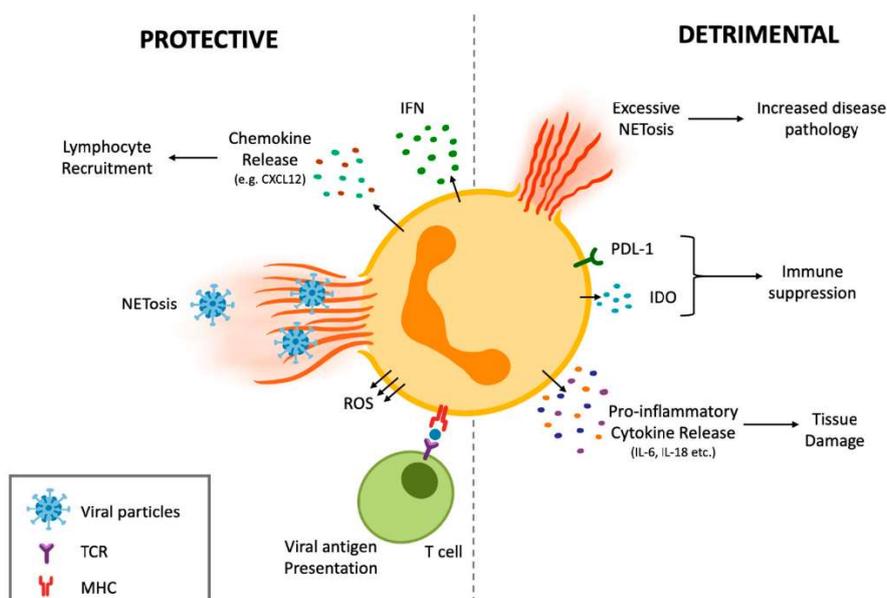
El reconocimiento de *Leishmania* por parte de las células inmunes mieloides del hospedador es la clave para desencadenar una respuesta inmune efectiva frente al parásito (Muller et al., 1989). Sin embargo, *Leishmania* ha desarrollado ciertos mecanismos de defensa que alteran su respuesta, como manipular las células del sistema inmune, asegurando su supervivencia y transmisión (**FIGURA 14**).



**FIGURA 14 | Impacto de la infección por *Leishmania* en las células del sistema inmune** (Costa-Da-silva et al., 2022).

### 1.3.1. Neutrófilos

Los neutrófilos son las primeras células inmunitarias reclutadas en el lugar de la infección ya que pueden contribuir a la eliminación de los parásitos gracias a un estallido oxidativo y a la secreción de gránulos citotóxicos (Ribeiro-Gomes & Sacks, 2012, Kolaczowska & Kubes, 2013). Por otro lado, los neutrófilos se encargan de producir ciertas citoquinas y quimiocinas, la liberación de defensinas, la activación de diferentes tipos de células del sistema inmune, como las DCs, la regulación de la proliferación de las células T, el cambio de clase de las células B, la producción de anticuerpos o el desarrollo de la inmunidad dependiente de células T (**FIGURA 15**) (Scapini et al., 2000; Bennouna et al., 2003; Tecchio et al., 2014).



**FIGURA 15 | Actividad pro- o anti-inflamatoria de los neutrófilos.** Entre sus funciones destacan: la liberación de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas, NETs, liberación de ROS, presentación de antígenos y supresión de la respuesta inmune. Imagen modificada de Chan et al., 2022.

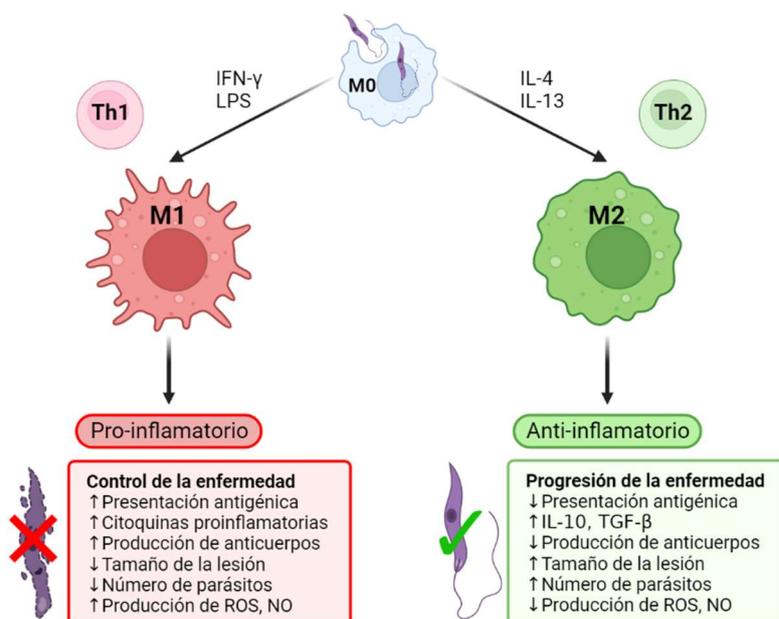
Sin embargo, aunque los neutrófilos puedan servir para la eliminación de los parásitos pueden también ayudar a su dispersión y replicación (Regli et al., 2017). La liberación de la quimiocina CCL3 por parte de los neutrófilos permite reclutar otras células del sistema inmune, las cuales servirán como nuevas células hospedadoras de los parásitos, facilitándose su dispersión (Charmoy et al., 2010). Los neutrófilos pueden influir en el desarrollo de una respuesta protectora del tipo Th1 frente *Leishmania* mediante la liberación de IL-12 (Charmoy et al., 2007; Hurrell et al., 2016), que es la principal citoquina encargada de la polarización de las células T CD4 hacia un perfil Th1, generándose así IFN- $\gamma$  (Heinzel et al., 1989). Sin embargo, el vector puede liberar PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) en el momento de la inoculación de los promastigotes, e incluso liberar moléculas (existe un papel importante de la saliva del flebótomo) que puedan tener efectos inmunomoduladores en la defensa del hospedador (Oliveira et al., 2013).

Otro de los mecanismos de los neutrófilos para acabar con los parásitos es la liberación de NETs (del inglés, *Neutrophil Extracellular Traps*) que consisten en una mezcla de proteínas y cromatina responsables de la formación de unas fibras extracelulares capaces de matar al parásito. Sin embargo, *L. donovani* es capaz de neutralizar su acción mediante el LPG (lipofosfoglicano) de la superficie del promastigote, o mediante la liberación de exonucleasas (Gabriel et al., 2010). *Leishmania* también es capaz de inhibir el estallido oxidativo llevado a cabo por los neutrófilos una vez que han sido fagocitados. Esto es debido a que el LPG inhibe la maduración de los fagosomas (Gueirard et al., 2008). Otro de los mecanismos llevados a cabo por *Leishmania* para promover su infección es el aumento de la vida media de los neutrófilos, aumentando la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2 (Sarkar et al., 2013).

### 1.3.2. Macrófagos

Los macrófagos son las principales células hospedadoras de *Leishmania* y las principales células efectoras para su eliminación. Hay dos fenotipos de macrófagos: el **fenotipo M1** que es un subtipo pro-inflamatorio con propiedades antimicrobianas, y el **fenotipo M2**, asociado con la reparación de tejidos y la resolución de la inflamación. La diferenciación hacia el perfil M1 está mediado por los productos procedentes de las células Th1 y NK, mientras que la diferenciación hacia M2 depende de las citoquinas liberadas por las células Th2 (**FIGURA 16**). Los macrófagos M1 frenan la progresión de la enfermedad provocada por *Leishmania*, mientras que la polarización hacia M2 revierte los mecanismos microbicidas y la respuesta inmune, contribuyendo a la proliferación del parásito (Sarantis & Grinstein, 2012; Tomiotto-Pellissier et al., 2018; Loría-Cervera & Andrade-Narvaez, 2020). El equilibrio entre un fenotipo M1 o M2 en las primeras etapas de la infección es clave para el desarrollo de la enfermedad (Mills, 2015; Tomiotto-Pellissier et al., 2018).

La **vía clásica** que conduce hacia la activación de los macrófagos **M1** implica al IFN- $\gamma$  y otras citoquinas inflamatorias, como IL-1 (Interleucina-1), TNF- $\alpha$  (del inglés, *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), IFN- $\alpha$  (Interferón- $\alpha$ ) e INF- $\beta$ . Estas moléculas se encargan de estimular a los macrófagos para que produzcan ROS y RNS (del inglés, *Reactive Nitrogen Species*), como NO, a partir de arginina. Sin embargo, el parásito presenta una serie de moléculas, como el LPG y la metaloproteasa GP63, que interfieren en los efectos microbicidas del hospedador (Liew et al., 1990; Bronte & Zanovello, 2005; Olivier et al., 2012; Rossi & Fasel, 2018; Rosazza et al., 2021). Por el contrario, los macrófagos se diferencian hacia un perfil **M2** gracias a las citoquinas liberadas por las células Th2, como IL-4 e IL-13 (Gordon, 2003), promoviendo la biosíntesis de poliaminas, las cuales favorecen la supervivencia de los parásitos en el interior de los macrófagos al aumentar la expresión de la arginasa (Kropf et al., 2005; Balaña-Fouce et al., 2012; Pessenda & da Silva, 2020).



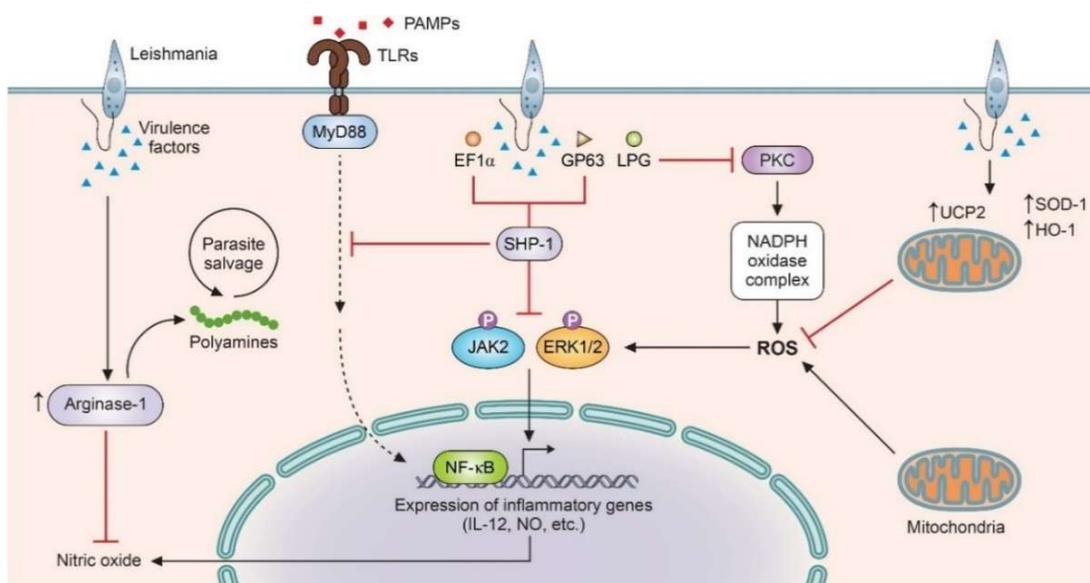
**FIGURA 16 | Polarización de los macrófagos hacia el perfil M1 y M2 en la infección por *Leishmania*** y su implicación en la patogénesis de la enfermedad. La vía clásica de polarización de los macrófagos se produce en presencia de IFN- $\gamma$ , generándose macrófagos con fenotipo M1, los cuales son capaces de producir citoquinas pro-inflamatorias, ROS y RNS que promueven la eliminación de *Leishmania*. La vía alternativa de polarización de los macrófagos se produce en presencia de IL-4 e IL-13, generándose macrófagos con fenotipo M2 anti-inflamatorio, los cuales permiten la supervivencia de los amastigotes (Zutshi et al., 2019).

Los macrófagos se infectan directamente con parásitos liberados del interior de los neutrófilos o por fagocitar a neutrófilos apoptóticos infectados (Peters et al., 2008). Estos neutrófilos apoptóticos también podrían estar actuando como “caballos de Troya” para transferir los parásitos a los macrófagos, promoviendo la producción de TGF- $\beta$  (del inglés, *Transforming Growth Factor- $\beta$* ) e IL-10, ayudando a establecerse la infección (Laskay et al., 2003; van Zandbergen et al., 2004; Gueirard et al., 2008). La exposición de fosfolípidos análogos a la fosfatidilserina, una de las clásicas señales “cómeme” empleadas por células apoptóticas, es otro de los mecanismos llevados a cabo por *Leishmania* para favorecer su dispersión, siendo fagocitados de una manera “silenciosa” (Weingärtner et al., 2012). Una vez en el interior de los macrófagos, los amastigotes se multiplican y son capaces de interferir en el proceso de maduración de los fagosomas, y neutralizar la acción de ROS y enzimas lisosómicas del ambiente ácido del interior de los fagolisosomas (Wilson et al., 2005; De Menezes et al., 2016). De esta manera, *Leishmania* impide que los macrófagos actúen como células presentadoras de antígeno, alterando la respuesta inmune adaptativa (De Menezes et al., 2016).

*Leishmania* también es capaz de suprimir la generación de **ROS mitocondriales** (FIGURA 17), aumentando la expresión de UCP2 (del inglés, *Uncoupling Protein 2*), encargada de regular negativamente la formación de ROS mitocondriales (Basu Ball et al., 2011; Toda & Diano, 2014). Asimismo, *Leishmania* aumenta la expresión de genes

antioxidantes del hospedador, como los que codifican las enzimas hemo oxidasa 1 (HO-1) y superóxido dismutasa 1 (SOD-1) (Khoury et al., 2009). Para suprimir la producción de NO, el parásito utiliza las proteínas tirosín-fosfatasa (PTP) del hospedador, como SHP-1 (del inglés, *Src-Homology 2 domain containing Phosphatase-1*), por medio de los factores de virulencia EF-1 $\alpha$  y GP63. Gracias a la sobreexpresión de SHP-1, se bloquea la activación de JNK (del inglés, *c-Jun N-terminal Kinases*) y ERK (del inglés, *Extracellular Regulated protein Kinase*), implicadas en la producción de NO (Khouili et al., 2020). SHP-1 también es capaz de bloquear la ruta de MyD88, inhibiendo así la expresión de genes inflamatorios a través de NF- $\kappa$ B (del inglés, *Nucleo Factor- $\kappa$ B*), como IL-12 (Gupta et al., 2022).

Conviene recordar que *Leishmania* necesita de las **poliaminas** derivadas del metabolismo de la arginina para proliferar en el interior de los fagosomas. Este parásito es capaz de aumentar la actividad arginasa del hospedador (**FIGURA 17**), favoreciendo así la síntesis de poliaminas y disminuyendo la producción de NO, el cual se produce también a partir de la arginina mediante la enzima óxido nítrico sintasa 2 (NOSII) (Rogers et al., 2009; Pessenda & da Silva, 2020). Otra manera de evasión es la producción de antioxidantes, como el tripanotión, que neutraliza ROS, permitiendo a los amastigotes sobrevivir dentro de los fagolisosomas (Colotti & Ilari, 2011).



**FIGURA 17 | *Leishmania* inhibe la generación de ROS y RNS y promueve la síntesis de poliaminas para su correcta supervivencia en el interior del hospedador (Gupta et al., 2022).**

Para una correcta eliminación de *Leishmania*, se requiere de **células efectoras productoras de INF- $\gamma$** , que elaboren una respuesta inmune proinflamatoria de tipo Th1 (Bajénoff et al., 2006). Asimismo, la citoquina inflamatoria TNF- $\alpha$  también podría activar los macrófagos infectados de una manera autocrina, produciendo NO (Bronte & Zanovello, 2005). Sin embargo, se ha observado que *Leishmania* podría actuar promoviendo la diferenciación de los macrófagos hacia un perfil anti-inflamatorio (Ruhland & Kima, 2009). La infección de

los macrófagos por *Leishmania* aumenta la producción de citoquinas inmunorreguladoras, como IL-10 y TFG- $\beta$ , las cuales desactivan las funciones de los macrófagos (von der Weid et al., 1996; Kane & Mosser, 2000; Pessenda & da Silva, 2020). *Leishmania* inhibe la liberación de IL-12 por parte de los macrófagos inflamatorios (Von Stebut et al., 1998), e impide la activación de los linfocitos T CD4 vírgenes y la estimulación de los linfocitos T CD4 específicos de antígeno (Kima et al., 1996). Esto puede ser debido a que *Leishmania* puede interferir en la señalización por TLRs (del inglés, *Toll-Like Receptors*), impidiendo la liberación de IL-12 e incrementando la producción de IL-10 (Chandra & Naik, 2008; Faria et al., 2012). Por otra parte, GP63 puede inhibir la respuesta inflamatoria de los macrófagos bloqueando la ruta de señalización mTOR, la cual regula el eje IL-12/IL-10 (Jaramillo et al., 2011; Cheekatla et al., 2012).

Además, *Leishmania* es capaz de **aumentar la supervivencia** de la célula hospedadora. *L. donovani* previene la ruta intrínseca de la apoptosis, aumentando la expresión de la proteína antiapoptótica MCL-1 e impidiendo la homodimerización de BAK y la liberación de citocromo c al citoplasma (Giri et al., 2016). Otro estudio reciente observó que el aumento de la expresión de BCL-2 inducido por *L. donovani* favorecía la supervivencia del parásito ya que, cuando BCL-2 se encontraba inhibida, se generaba un aumento de la eliminación de los parásitos mediado por NO (Pandey et al., 2016). Finalmente, se ha relacionado a GP63 en la degradación del complejo inflamasoma NLRP3, el cual es clave para destruir la carga parasitaria intracelular de amastigotes. De esta manera *Leishmania* previene la activación de IL-1 $\beta$ , tanto en infecciones humanas como en murinas (Guo et al., 2015; Shio et al., 2015).

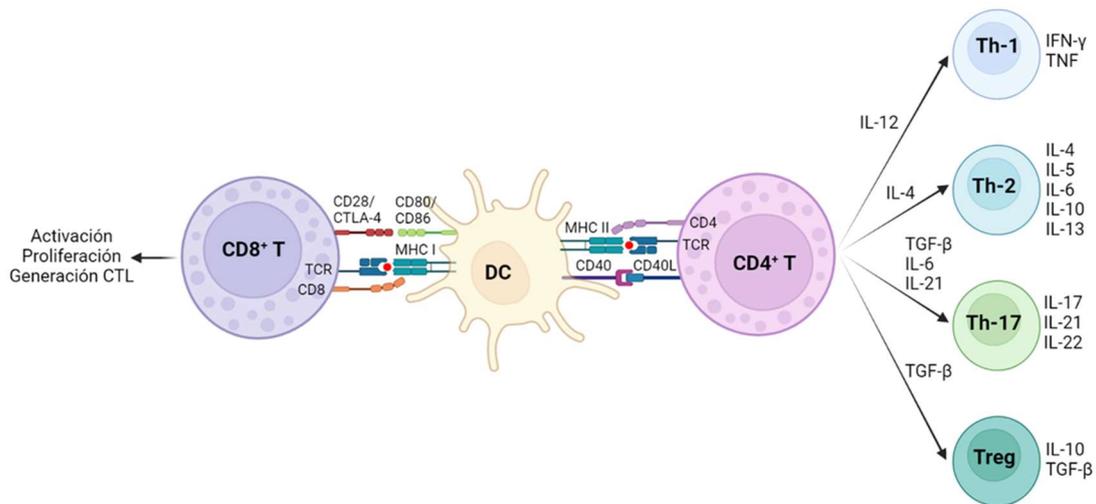
### 1.3.3. Células dendríticas (DCs)

Las DCs son una familia de células presentadoras de antígeno (APC) que residen en todos los tejidos periféricos en un **estado inmaduro**, capaces de captar antígenos y procesarlos. Tras el contacto con microorganismos, o sustancias asociadas con infección o inflamación, las DCs comienzan un **proceso de maduración** y migración hacia las áreas de células T existentes en los órganos linfoides. El proceso de maduración consiste en el aumento de la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo II (MHC-II), y de **moléculas coestimuladoras**, como CD40, CD80, CD86 y CD54; disminuir la capacidad de fagocitar antígenos; aumentar la secreción de citoquinas; y generar diferentes patrones de producción de citoquinas y de expresión de sus receptores (Moll, 2003; Sundquist et al., 2004). En los órganos y ganglios linfoides, las DCs realizan una **presentación antigénica** a células T vírgenes y modulan sus respuestas mediante la secreción de **citoquinas** (Reis E Sousa, 2004; Bajénoff et al., 2006). Asimismo, las DCs activadas que llegan a los ganglios linfáticos, interactúan con neutrófilos residentes y éstos, a su vez, desencadenan una activación de las células NK, que generan citotoxicidad celular y producen IFN- $\gamma$  (Bajénoff et al., 2006).

Dada la importancia de este tipo celular en esta tesis doctoral, esta sección será desarrollada en el apartado 1.4.

### 1.3.4. Linfocitos T

Los linfocitos o células T son células inmunitarias efectoras responsables de inducir la muerte celular de células malignas o infectadas, tras un proceso de diferenciación altamente coordinado. Las células T expresan receptores de superficie exclusivos, denominados TCR (del inglés, *T-Cell Receptor*), que reconocen los antígenos cargados en las moléculas MHC presentes en la superficie de las APCs (**FIGURA 18**) (Jawed et al., 2019).



**FIGURA 18 | Interacción entre DCs y células T.** Las DCs proporcionan tres señales clave para activar las células T vírgenes e iniciar la respuesta inmune adaptativa. Primeramente, los complejos MHC cargados con el antígeno son reconocidos por los TCRs de las células T. Una segunda señal coestimuladora ocurre entre las moléculas CD80/CD86 de la DC con la molécula CD28 presente en la célula T. Si CD80/CD86 interacciona con la molécula CTLA-4, se transmite una señal inhibitoria para la activación de la célula T. Finalmente, una tercera señal que depende de las citoquinas liberadas por parte de las DCs, que inducirán el desarrollo hacia un fenotipo concreto de células T efectora. Imagen modificada de Filley & Dey, 2017.

Las **células T vírgenes** comienzan a generar una red de vías de señalización aguas abajo, a través del complejo formado por el TCR y el CD3, moléculas adaptadoras asociadas y moléculas coestimuladoras expresadas constitutivamente (Verdon et al., 2020), que finalmente conduce a la proliferación y diferenciación de células vírgenes en células efectoras específicas. La principal molécula coestimuladora presente en las células T es CD28, el cual se expresa en todas las células vírgenes. Los ligandos de CD28 son el CD80 y CD86, los cuales se localizan en las DCs y aumentan su expresión tras la activación de las DCs (Sansom, 2000; Greenwald et al., 2005; Luckheeram et al., 2012). Las moléculas CD80/CD86 también pueden unirse a otra proteína presente en los linfocitos T, la proteína CTLA4, inhibiendo sus funciones efectoras (Filley & Dey, 2017). Esta estimulación inicial se ve

aumentada por la liberación de citoquinas paracrinas por parte de las APCs, como IL-12 o IFN de tipo I, y la señalización paracrina y autocrina de IL-2 (Díaz-Montero et al., 2008; Henry et al., 2008; Ramos et al., 2009; Redeker et al., 2015), permitiendo que las células T inicien un programa de diferenciación y división (Gett & Hodgkin, 2000).

Las células T activadas se someten a una remodelación epigenética para permitir la transcripción de genes implicados en funciones efectoras que previamente se encontraban silenciados (Denton et al., 2011). En el caso de los **linfocitos T CD8+**, estos genes codifican proteínas del interior de los gránulos citotóxicos, la proteína formadora de poros o perforina y las proteasas denominadas granzimas, junto con citoquinas efectoras como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Brehm et al., 2005; Matsushita et al., 2015). TNF- $\alpha$  promueve la supervivencia y la proliferación de células T (Tam et al., 2019). IFN- $\gamma$  presenta muchas funciones, entre las que se incluyen la inducción de IL-12 por las APCs, la mejora del proceso fagocítico y el reconocimiento de células T mediante la regulación positiva de MHC-I y II (Castro et al., 2018). Las células T efectoras tienen la capacidad de migrar desde órganos linfoides secundarios a áreas de inflamación, matar células diana, reprogramar células mieloides residentes en tejidos locales y producir mediadores quimiotácticos que reclutan más células T en un área de infección o de tumor (Verdon et al., 2020).

La secreción de citoquinas en el entorno proporciona un ambiente adecuado para dirigir la respuesta de las células T y generar linfocitos ayudantes T CD4 de memoria. Las **células T CD4** que proliferan pueden diferenciarse hacia un perfil de Tipo I (Th1) o de Tipo II (Th2) (**FIGURA 14**) (Zhu & Paul, 2008; Luckheeram et al., 2012; Jawed et al., 2019). La diferenciación específica del linaje depende de las citoquinas del microambiente, así como de la concentración de antígenos, el tipo de APC y las moléculas coestimuladoras (Tao et al., 1997). Las **células Th1** son, por lo general, efectoras contra microorganismos intracelulares, por lo que destruyen los amastigotes intracelulares de *Leishmania* por la activación de los macrófagos infectados, impidiendo el desarrollo de la infección (Sharma & Singh, 2009; Nylen & Gautam, 2010). Las células efectoras principales de la inmunidad Th1 son los macrófagos, células T CD8, células B productoras de IgG B y células T CD4 productoras de IFN- $\gamma$  (Zhu & Paul, 2008; Sharma & Singh, 2009; Nylen & Gautam, 2010; Luckheeram et al., 2012). La diferenciación hacia la subpoblación de células Th1 se ve potenciada por la secreción de IL-12 e IL-2, y se caracteriza por la liberación de citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Novais & Scott, 2015). Posteriormente, las células Th1 activan a los macrófagos infectados liberando TNF- $\alpha$ , para destruir a los amastigotes intracelulares (Zhu & Paul, 2008; Sharma & Singh, 2009; Nylen & Gautam, 2010; Luckheeram et al., 2012).

Por el contrario, las **células Th2** se relacionan con la destrucción de parásitos extracelulares y secretan citoquinas antiinflamatorias, como IL-4, que se relacionan con la producción de anticuerpos y la curación de heridas provocadas por la infección (**FIGURA 14**) (Nylen & Gautam, 2010; Hurdal & Brombacher, 2014; Jawed et al., 2019). Las células Th2 se desarrollan tras la presencia de IL-4 y se caracterizan por liberar citoquinas efectoras como

IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-10 (Sharma & Singh, 2009; Nylen & Gautam, 2010; Hurdoyal & Brombacher, 2014). Las células efectoras de la respuesta Th2 son eosinófilos, basófilos, mastocitos, células B y células T CD4 secretoras de IL-4/IL-5 (Swihart et al., 1995; Louis et al., 1998; Sommer et al., 1998; Radwanska et al., 2007; Zhu & Paul, 2008; Luckheeram et al., 2012). Las células Th2, con un fenotipo anti-inflamatorio, antagonizan con la respuesta Th1 y favorecen la progresión de la infección por *Leishmania* (Belkaid et al., 2002a; Kropf et al., 2005).

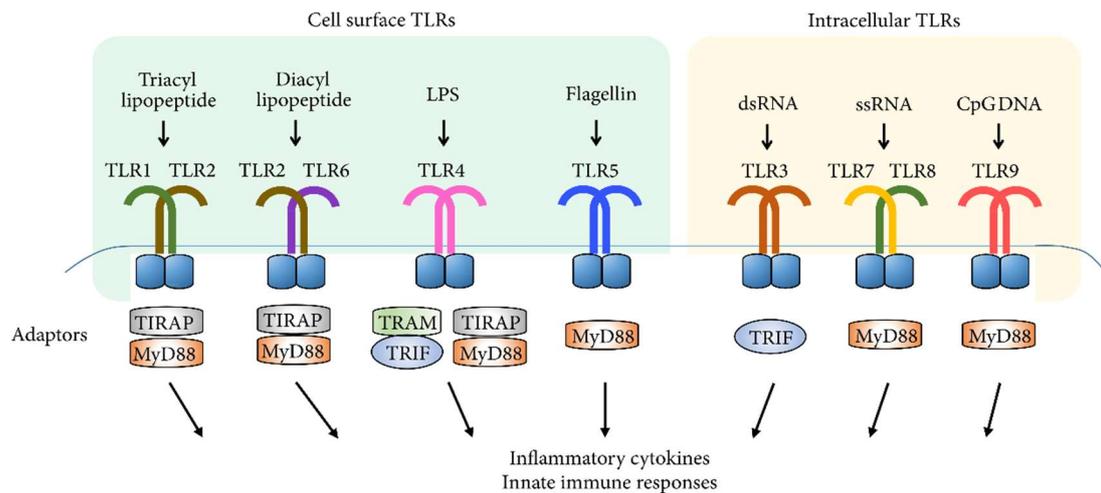
En las últimas décadas se ha descubierto que existen otros fenotipos, como Th17, implicado en la defensa frente a virus, bacterias y hongos; Th9, que es capaz de interactuar con células B; Th folicular, implicado en la inmunidad mediada por células B; y Tregs (células T reguladoras), que se encargan de la tolerancia de antígenos propios (Pennock et al., 2013).

Las células T CD8+ tienen un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad y las manifestaciones clínicas causadas por *Leishmania* (Stäger & Rafati, 2012). El papel de las células T CD8 va a depender de la especie de *Leishmania* responsable de la infección, por lo que en algunos casos tendrán un papel protector, ayudando a la eliminación de los parásitos a través de la producción de IFN- $\gamma$  (Stäger & Rafati, 2012; Kaushal et al., 2014), y en otros casos ayudarán a la diseminación de la infección, por la liberación de IL-10 (Joshi et al., 2009; Rossi & Fasel, 2018). En resumen, las células inmunes adaptativas juegan un papel doble durante la infección de *Leishmania*, pudiendo generar una respuesta inmune frente al parásito, ayudando a su eliminación, o pueden favorecer la progresión de la infección, participando en algunos casos en la patogénesis de la enfermedad.

### 1.3.5. TLRs

Las APCs son capaces de tomar antígenos a través de diferentes familias de receptores, como los receptores Fc, los receptores de lectinas tipo-C (CLRs) o los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), entre los que destacan los TLRs (del inglés, *Toll Like Receptors*) (Geijtenbeek et al., 2004). La interacción entre el ligando y su receptor permite a las APCs reconocer un amplio rango de estímulos microbianos (Takeda & Akira, 2004).

Los TLRs pertenecen a la familia de PRRs y son capaces de reconocer PAMPs (Brubaker et al., 2015). Existen 12 familias de TLRs en ratón (TLR1-TLR9, TLR11 y TLR13) (**TABLA 1**) (Kawasaki & Kawai, 2014). Estos receptores se expresan, principalmente, en la membrana plasmática o en las membranas internas de APCs (**FIGURA 19**) (Liu & Uzonna, 2012; Ashour, 2015) y poseen repeticiones ricas en leucina, que sirven como sitios para interactuar con los ligandos.



**FIGURA 19 | Tipos de TLRs y sus correspondientes ligandos.** Los diferentes TLRs se clasifican en TLRs de superficie celular (TLR1, 2, 4, 5 y 6), y TLRs localizados de endosomas (TLR3, 7, 8 y 9). Estos receptores forman homodímeros o heterodímeros y tienen sus respectivos ligandos para ser activados. Después de la unión del ligando a los TLRs, los TLR se dimerizan y experimentan un cambio conformacional para reclutar proteínas adaptadoras aguas abajo para mediar en las vías de señalización celular. Imagen tomada de Noh et al., 2020.

Cuando el ligando se une, los TLRs sufren un proceso de dimerización que activa una serie de rutas celulares que finalizan con la transcripción de ciertos genes inflamatorios. Esto es gracias a la localización nuclear de NF- $\kappa$ B, que promueve la producción de citoquinas proinflamatorias e IFN de tipo I en macrófagos y DCs (Blasius & Beutler, 2010; Chauhan et al., 2017). NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que induce la expresión de varios genes proinflamatorios, incluyendo citoquinas y quimiocinas. Asimismo, NF- $\kappa$ B es un factor clave para regular la supervivencia, activación y diferenciación de las células inmunes innatas y las células T inflamatorias (**TABLA 1**) (Liu et al., 2017).

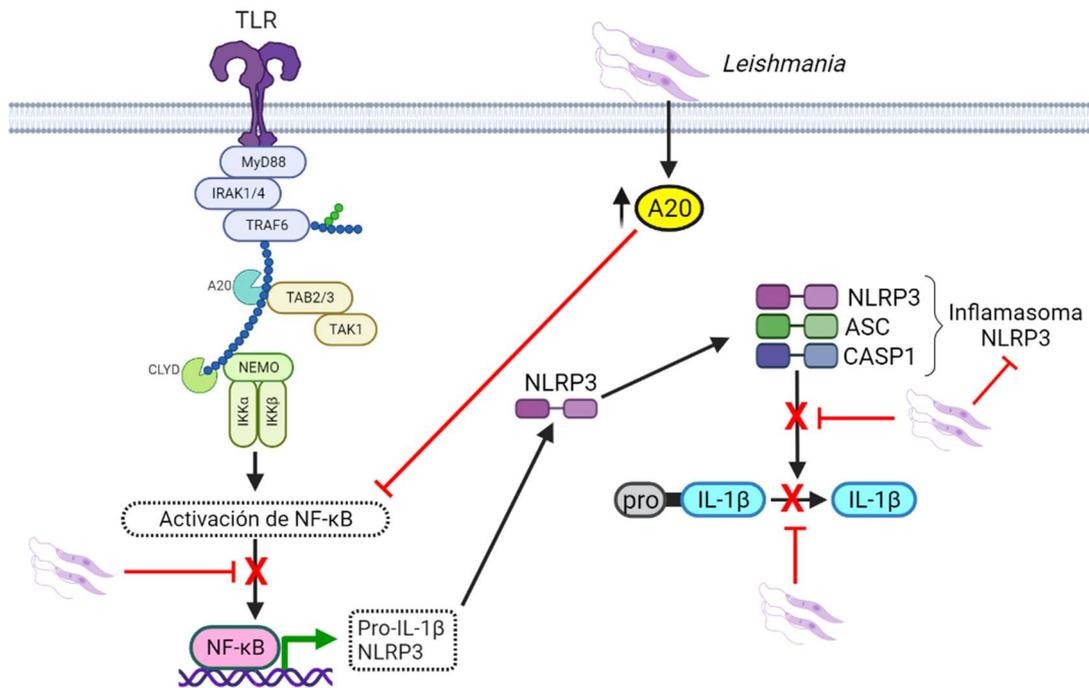
Los TLRs tienen un papel importante como puente entre la inmunidad innata y la adaptativa durante la infección con *Leishmania* (Brubaker et al., 2015; Sacramento et al., 2017). Varios estudios sugieren la implicación de varias moléculas de *Leishmania* en la activación de los TLRs, específicamente TLR2, TLR4 y TLR9 (Komai-Koma et al., 2014). El TLR2 es capaz de reconocer al LPG presente en la superficie del parásito (Becker et al., 2003). La activación del TLR2 y del TLR9 parece contribuir a un estado de respuesta inmune de tipo Th1 ya que aumenta la expresión de MHC-II y CD86 en DCs, así como la secreción de IL-12 e IFN- $\gamma$  por parte de las células NK (Flandin et al., 2006; Liese et al., 2007; Schleicher et al., 2009; Sacramento et al., 2015; Argueta-Donohué et al., 2016). Sin embargo, también se ha observado que el LPG de *Leishmania* interactúa con el TLR2 para disminuir la expresión de TLR9 para favorecer su propia supervivencia (Srivastava et al., 2013; Weinkopff et al., 2013). Sin embargo, la respuesta frente al parásito depende de la especie de *Leishmania* implicada. En el caso de *L. major*, *L. mexicana* y *L. aethiopica*, la señalización por medio de TLR2 aumenta la producción de ROS y NO, por lo que se genera una respuesta inmune

protectora frente al parásito (Becker et al., 2003; de Veer et al., 2003; Bhattacharya et al., 2010). En cambio, la activación del TLR2 favorece la persistencia de la infección de *L. amazonensis* y *L. braziliensis* (Kavoosi et al., 2009; Rossi & Fasel, 2018). El papel del TLR2 en la LV supone un aumento de NO y citoquinas proinflamatorias, por lo que desencadena una fuerte respuesta Th1, ayudando en el proceso de disminuir la carga parasitaria (Bhattacharya et al., 2010). También se ha visto que TLR2 puede ayudar a la activación de DCs, macrófagos, neutrófilos y células T CD8, favoreciendo la respuesta inmune del hospedador frente a la infección (Ruiz & Becker, 2007).

**TABLA 1 | Tipos de TLRs y sus correspondientes ligandos.** ARN de doble cadena (ARNds); ARN de cadena simple (ARNss); ARN ribosómico (ARNr). Imagen modificada de Hutcheon et al., 2016.

TLR	LIGANDO	RESPUESTA
TLR1/TLR2	Pam3CSK4	Citoquinas inflamatorias
TLR2/TLR6	Diacil lipopéptidos	Citoquinas inflamatorias
	Ácido lipoteicoico	
	Zymosan Glicolípidos	IFN de tipo I
TLR3	ARNds sintético	IFN de tipo I
	ARNds viral	IFN de tipo III
TLR4	LPS	Citoquinas inflamatorias
	Mamanos	IFN de tipo I
TLR5	Flagelina	Citoquinas inflamatorias
TLR7	ARNss	Citoquinas inflamatorias
		IFN de tipo I
TLR8	ARNss	-
TLR9	CpG ADN	Citoquinas inflamatorias
		IFN de tipo I
TLR10 (humana)	Desconocido	Activación NF-κB
TLR11	Profilina de <i>T. gondii</i>	Activación NF-κB, IL-12
	<i>E. coli</i> uropatogénica	
	Flagelina de <i>Salmonella</i>	
TLR12	Profilina de <i>T. gondii</i>	Activación NF-κB, IL-12
TLR13	ARNr 23S bacteriano	Activación NF-κB

Por otro lado, TLR4 también es capaz de detectar el LPG del parásito y estimular una señalización intracelular inflamatoria, promoviendo su eliminación (Karmakar et al., 2012). La activación de TLR4 provoca la activación de una cascada de señales que incluye al complejo del señalosoma, constituido por MyD88, TRAF6, IRAK1/4 y ubiquitina-ligasas que, finalmente, culmina en la activación de la ruta del NF-κB (Wesche et al., 1997; Suzuki et al., 2002). Sin embargo, *Leishmania* es capaz de interrumpir el ensamblaje del señalosoma (Gupta et al., 2014), y de inhibir la ruta del NF-κB mediante el aumento de expresión de la **desubiquitinasa A20 (FIGURA 20)**, la cual desubiquitina a TRAF6 y dificulta su asociación con TAK1, bloqueando así la activación de NF-κB (Gupta et al., 2017; Srivastav et al., 2012).



**FIGURA 20 | Inhibición de la ruta de señalización de NF-κB debido al aumento de la expresión de A20 provocada por *Leishmania***, disminuyendo el proceso inflamatorio y la producción de IL-1β. Imagen modificada de Gupta et al., 2017.

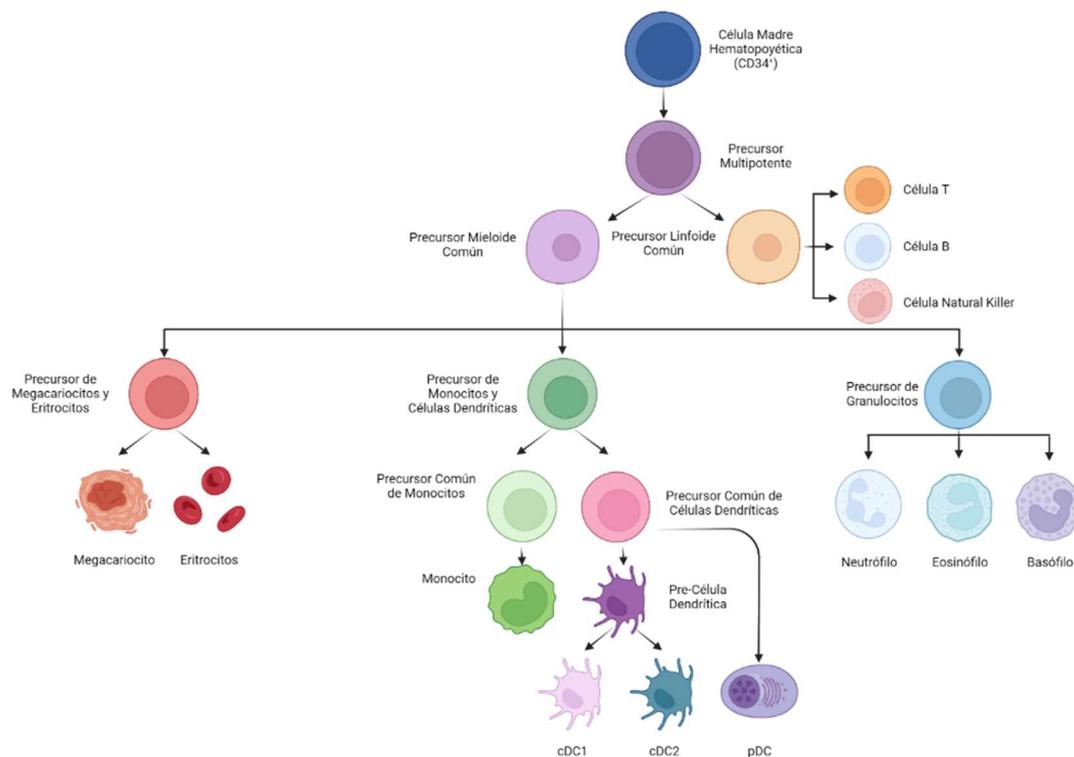
Tras el reconocimiento de los ligandos de NLRs (del inglés, *NOD-Like Receptor*) y CLR, la activación del inflamasoma, y la consiguiente producción de IL-1β, proporciona protección frente a la infección provocada por *L. amazonensis* y *L. braziliensis* (Lima-Junior et al., 2013). No obstante, *L. donovani* es capaz de suprimir la formación del inflamasoma NLRP3 al aumentar la expresión de A20, la cual inhibe la vía del NF-κB y la producción de ROS, una de las señales clave para iniciar el ensamblaje del inflamasoma (Gupta et al., 2017).

## 1.4. CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las DCs son APCs profesionales, de las cuales depende la iniciación y la regulación de la respuesta inmune, actuando como puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Entre sus funciones destacan: capturar antígenos, procesarlos y presentarlos a las células efectoras e iniciar la respuesta inmune. Son las únicas células capaces de educar a linfocitos T y B vírgenes, así como de regular la respuesta inmune adaptativa de una manera dependiente de antígeno. Su heterogeneidad supone una especialización funcional crítica para proteger al organismo de gran variedad de patógenos, proporcionando también tolerancia hacia los antígenos propios (Balan et al., 2019).

### 1.4.1. Desarrollo de las DCs:

Las DCs son una población heterogénea de leucocitos que se diferencia a partir de células madre hematopoyéticas (CD34+) (**FIGURA 21**). Inicialmente, se le dio gran importancia a la citoquina **GM-CSF** (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos), ya que era un elemento clave para la supervivencia y el correcto funcionamiento de las DCs. Se demostró que ratones deficientes en el receptor del GM-CSF (GMCSF-R) presentaban una reducción de hasta tres veces de DCs quiescentes, y la sobreexpresión de GM-CSF aumentaba su frecuencia en órganos linfoides (Vremec et al., 1997). El descubrimiento del efecto que tenía el GM-CSF sobre las DCs supuso una ayuda clave para el estudio de las DCs por su desarrollo *in vitro* a partir de células de médula ósea (Witmer-Pack et al., 1987).

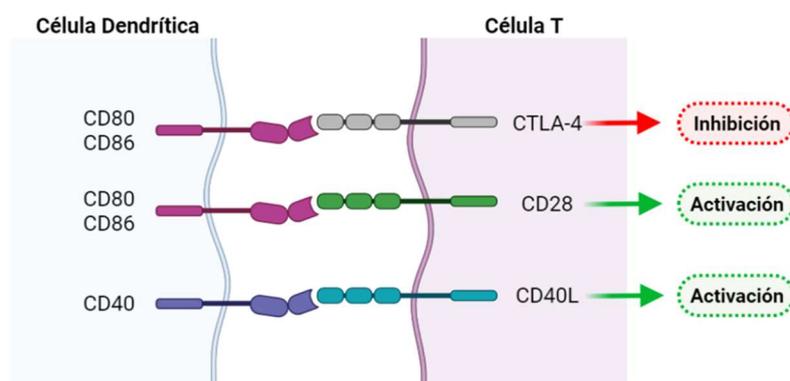


**FIGURA 21 | Esquema de la diferenciación de DCs** a partir de células madre hematopoyéticas de médula ósea y un precursor mieloide común. A partir de células madre hematopoyéticas (CD34+), se generan dos tipos de precursores comunes: el mieloide (PMC) y el linfóide (PLC). A partir del PMC, se desarrollan los megacariocitos, los eritrocitos, los monocitos, las DCs y los granulocitos. A partir del PLC, se diferencian las células T, B y NK. Imagen modificada de Wildes et al., 2021.

Años más tarde, se descubrió que la diferenciación de las DCs dependía, principalmente, de la citoquina **Flt3L** (del inglés, *FMS-like tyrosine kinase 3 Ligand*). Tanto es así, que ratones KO (del inglés, *knock out*) en el gen Flt3L (McKenna et al., 2000), o deficientes en el receptor Flt3R (Waskow et al., 2008), mostraban ausencia de poblaciones de ciertos subtipos de DCs. De forma similar, la administración de Flt3L exógeno a ratones,

aumentaba la frecuencia y la diversidad de las distintas subpoblaciones de DCs (Maraskovsky et al., 1996).

Las DCs se identifican por expresar altos niveles del MHC-II (Steinman & Witmer, 1978) y de la integrina de superficie celular CD11c (Metlay et al., 1990), y por no expresar los marcadores clásicos de células T, B, NK, granulocitos o monocitos (Collin & Bigley, 2018). Las DCs también se caracterizan por expresar moléculas coestimuladoras (**FIGURA 22**). Entre ellas destacan el CD80 y el CD86, los cuales pertenecen a la familia B7 de moléculas inmunorreguladoras (Sansom, 2000). Otra molécula coestimuladora es CD40 que, cuando interactúa con su ligando (CD40L) presente en células T, activa la expresión de CD80 y CD86, produciendo un fenotipo maduro en las DCs que comienza a expresar la glicoproteína CD83, siendo ésta el marcador por excelencia de la maduración de las DCs (Li et al., 2019). Esto desencadena la liberación de citoquinas por parte de las DCs, provocando que las células T vírgenes se diferencien hacia un perfil efector u otro (Lechmann et al., 2002; O'Sullivan & Thomas, 2003).



**FIGURA 22 | Moléculas coestimuladoras y sus ligandos.** La modulación de la activación de las células T está mediada por una interacción de diferentes moléculas coestimuladoras expresadas en DCs que tienen función inmunogénica o tolerogénica. La imagen muestra una descripción general de los receptores expresados en DC y sus ligandos de unión en las células T. Imagen modificada de Hubo et al., 2013.

### 1.4.2. Tipos de DCs:

Las DCs se clasificaron inicialmente en dos subgrupos basados en la expresión de los marcadores clásicos CD4 y CD8 de células T (Vremec et al., 2000; Shortman & Heath, 2010). Posteriormente, se encontró una tercera subpoblación conocida como DCs plasmocitoides (pDCs) (Grouard et al., 1997), conocida también como células productoras de IFN natural (Macri et al., 2018).

Actualmente, las DCs se clasifican en tres grupos: las DCs quiescentes, las DCs inflamatorias y células de Langerhans. Dentro de las DCs quiescentes, encontramos a las DCs convencionales (cDCs), las cuales se subdividen en cDC1 y cDC2, y las DCs plasmocitoides (pDCs). Las DCs inflamatorias participan en respuestas inflamatorias. Las

células de Lagerhans son una subpoblación con funciones y fenotipo de DCs, pero con un origen embrionario y presentan la capacidad de proliferar por sí mismas, sin necesidad de estímulos externos (Merad et al., 2013; Sathe et al., 2013). Por su relevancia en esta Memoria, nos centraremos en las DCs quiescentes.

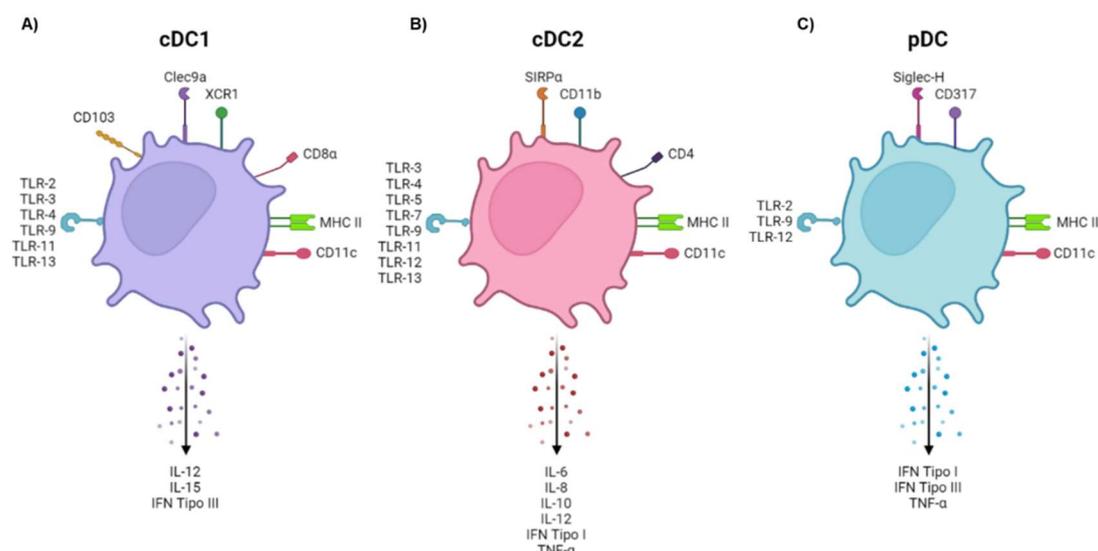
#### 1.4.2.1. DCs convencionales (cDCs):

Los subtipos de cDCs han sido clasificados basándose en su localización corporal, su fenotipo de superficie celular y sus funciones. Por ello, las cDCs están diferenciadas en dos subpoblaciones: cDC1 y cDC2.

##### A. cDC1: CD11c+MHCII+CD8α+CD103+

Estas células se las conoce como DC CD8+ residentes en órganos linfoides y representan un 20% de las DCs totales de bazo (Shortman & Heath, 2010). cDC1s tienen un papel importante en la inducción de respuestas inmunes frente infecciones por patógenos, concretamente bacterias, como *Listeria* (Edelson, 2012), virus, como el de la hepatitis C (HCV) (Yoshio et al., 2013), y protozoos, como *Toxoplasma gondii* (Mashayekhi et al., 2011).

Las cDC1 se caracterizan por expresar el receptor de lectina de tipo C único, Clec9a (**FIGURA 23A**), y el receptor de quimiocinas XCR1, el cual reconoce al ligando XCL-1 producido por las células T CD8+, facilitando de esta manera la interacción entre cDC1 y células T CD8+ (Dorner et al., 2009; Crozat et al., 2010). Asimismo, expresan MHC II, CD11c, CD8α, CD103, CD36, CD24 y CADM1, pero no expresan CD11b ni SIRPα. La expresión de **CD11c** puede variar entre los diferentes tejidos y órganos (Guilliams et al., 2016). **CD8α** generalmente se expresa en DCs linfoides residentes, las cuales se localizan en bazo u otros órganos linfoides (Shortman & Heath, 2010). Sin embargo, las cDC1 que expresan **CD103** suelen hallarse en la piel o en otros tejidos no linfoides, migrando continuamente a los ganglios linfáticos, ya que este receptor se considera un marcador de DCs migratorias (Sung et al., 2006; Ginhoux et al., 2009; Edelson et al., 2010). cDC1s se caracterizan por producir **BAFT3** (del inglés, *Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 3*), **IRF8** (del inglés, *Interferon Regulatory Factor 8*) (Tibúrcio et al., 2019a), e IL-15, la principal citoquina necesaria para la activación de las células NK (Balan et al., 2019).



**FIGURA 23 | Esquema de los subtipos de DCs con sus marcadores de superficie y TLRs más característicos. A) cDC1. B) cDC2. C) pDC.**

**La principal función de cDC1 es combatir microorganismos y tumores.** Las cDC1 se encargan de reconocer PAMPs a través de los TLRs, generando un perfil inflamatorio característico de citoquinas. Concretamente, las cDC1 de bazo expresan TLR-2, 3, 4, 9, 11, 12 y 13 (Edwards et al., 2003). En respuesta a la estimulación de los TLRs 9, 11 o 13, las cDC1 son las principales productoras de IL-12p70, citoquina responsable de la generación de una respuesta Th1 (Hochrein et al., 2001). Al expresar TLR4, pueden producir citoquinas inflamatorias en respuesta a su activación LPS (Merad et al., 2013). Las cDC1 también son capaces de detectar moléculas procedentes de protozoos a través del TLR11 y producir altos niveles de IL-12, sirviendo como un paso crítico en el proceso de infección (Yarovinsky et al., 2005). Las cDC1 expresan altos niveles de TLR3, produciendo IFN de tipo III (IFN- $\lambda$ ) tras su estimulación con el ligando sintético Poly I:C, o por la estimulación con su ligando natural, el ARN de doble cadena de origen vírico (Lauterbach et al., 2010). La liberación de IFN- $\lambda$  es capaz de activar a pDCs, ya que son las células inmunes que presentan mayores niveles del receptor para IFN- $\lambda$ , convirtiéndose así en las principales encargadas en combatir infecciones víricas (Megjugorac et al., 2009; Yin et al., 2017).

Las cDC1 son capaces de internalizar antígenos exógenos y procesarlos para presentarlos en las moléculas MHC-II y, consecuentemente, activar a las células T CD4; pero este proceso no lo hacen con tanta eficiencia como lo hacen las cDC2, ya que faltan señales de supervivencia emitidas por parte de las cDC1 (Rizzitelli et al., 2006). Sin embargo, las cDC1 son conocidas por hacer **presentación cruzada**, presentando antígenos exógenos en moléculas MHC-I a células T CD8, tal y como veremos más adelante en el *apartado 1.5.3*. Esto es debido a que presentan una capacidad superior de toma de antígenos procedentes, principalmente, de células en camino de la muerte, y generar una respuesta inmune antitumoral. Esto es llevado a cabo por el sensor de células muertas Clec9A y el receptor

CD36, el cual actúa como receptor que une células muertas (Albert et al., 1998; Sancho et al., 2008, 2009; Cancel et al., 2019). En 2002, se estableció por primera vez que las cDC1 presentaban esta vía única del MHC-I (Schulz & Reis E Sousa, 2002). Las cDC1 poseen una maquinaria específica que les permite hacer este tipo de presentación antigénica, llevando a cabo un correcto procesamiento de los antígenos y su correcta presentación a las células T CD8 (Delamarre et al., 2005). Esta maquinaria consiste, entre otras cosas, en un pH endosomal favorable que evita una proteólisis lisosomal excesiva de los antígenos, y altos niveles de proteínas Rab, implicadas en el tráfico de vesículas en los endosomas (Nair-Gupta et al., 2014). También se ha visto que este subtipo de DCs es capaz de inducir una respuesta adaptativa fuerte, mediante la activación tanto de linfocitos T CD8 como linfocitos T CD4, así como de producir una respuesta humoral fuerte, participando en el proceso de cambio de clase de las IgGs en células B, indicando el papel tan relevante de estas células en la respuesta inmune (Balan et al., 2019).

Las cDC1 tónicas están implicadas en procesos de tolerancia central (Ardouin et al., 2016). Sin embargo, las cDC1 esplénicas se encargan de la tolerancia periférica de células T, generando células Treg (Yamazaki et al., 2008).

#### **B. cDC2: CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup>Sirpα<sup>+</sup>**

Las cDC2 representan un 80% de las DCs esplénicas (Shortman & Heath, 2010). Estas células se caracterizan por expresar altos niveles de MHC II, CD11c, CD11b y SIRPα (**FIGURA 23B**). En ocasiones pueden expresar marcadores adicionales como CD26, CD4, CD103 y CADM3, aunque la expresión de estos dos últimos es dependiente de tejido, expresándose en intestino y bazo, respectivamente (Lewis et al., 2011; Balan et al., 2019). SIRPα es el marcador más característico, encontrándose involucrado en la activación y la migración de las DCs (Liu et al., 2016a; Balan et al., 2019). La diferenciación de cDC2 depende del receptor Notch 2 (Balan et al., 2019).

Las cDC2 expresan una variedad de sensores citosólicos de ácidos nucleicos (RIG-I, MDA-5) y receptores de tipo Nod (NOD1, NLRX1), que les permiten detectar ácidos nucleicos en el citoplasma y desencadenar una respuesta inflamatoria (Macri et al., 2018). Las cDC2 tienen un perfil específico de expresión de TLRs dependiendo de las localizaciones anatómicas. Cabe destacar que las cDC2 son el único subtipo de DC que expresa TLR7 (Edwards et al., 2003; Schlitzer et al., 2013). Concretamente, en bazo, expresan altos niveles de TLR3 y TLR12 (Macri et al., 2018).

Entre las funciones de las cDC2s destaca la capacidad de responder a una gran variedad de señales de peligro gracias al alto repertorio de TLRs del que disponen. Son capaces de secretar altos niveles de citoquinas inflamatorias, como IL-6, IL-8 y, en menor medida, IL-12, así como IFN de tipo I, particularmente IFN-α, y TNF-α (Luber et al., 2010; Balan et al., 2019). Las cDC2 juegan también un papel importante en reacciones de anafilaxia (Choi et al., 2018)

y quimioatracción (Proietto et al., 2004). También son inductoras de la respuesta inmune mediada por Th17, así como de la regulación de la inducción de las células T (Balan et al., 2019). Las cDC2 del timo contribuyen a la delección de las células T CD4 autorreactivas (Proietto et al., 2008).

Las cDC2 son capaces de presentar antígenos a células T CD4 y promover su activación. Son eficientes en la presentación de antígenos solubles y péptidos largos, pero son menos eficientes en la presentación de antígenos derivados de células (Dudziak et al., 2007; Balan et al., 2019).

#### 1.4.2.2. DCs plasmocitoides (pDCs): CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD317<sup>+</sup>Siglec-H<sup>+</sup>

Las pDC representan un porcentaje muy bajo de la población total de DCs. Se caracterizan por tener una morfología de célula secretora, ya que disponen de altos niveles de retículo endoplásmico rugoso, y no presentan la forma estrellada característica del resto de DCs. Se diferencian en dos grupos en función de su expresión de CD4, donde las pDC maduras son positivas a este marcador (O’Keeffe et al., 2002). Expresan bajos niveles de CD8, pero sus niveles aumentan de forma dependiente a la activación de TLRs (O’Keeffe et al., 2002). Las pDC expresan altas cantidades de moléculas MHC II, CD11c, Siglec-H (del inglés, *Sialic acid binding Ig-like lectin H*) y CD317 (también conocido como Bst-2 y PDCA-1) (**FIGURA 23C**). Siglec-H es un receptor de superficie que se ha visto implicado en la regulación de la producción de IFN de tipo I (Blasius et al., 2006). CD317 es una proteína integral de membrana que ha sido asociada con respuestas mediadas por IFN contra infecciones víricas (Douglas et al., 2010). La expresión de Siglec-H se reduce a medida que las pDC maduran (O’Keeffe et al., 2002).

Se ha observado que existe heterogeneidad entre las poblaciones de pDC, ya que pueden expresar CD4 o CD8. Concretamente, se ha visto que en bazo la expresión de CD8 disminuye (O’Keeffe et al., 2002). Pueden presentar un fenotipo productor de IFN o un fenotipo de célula presentadora de antígenos, el cual le permite interactuar con células T CD8 (Balan et al., 2019).

Su papel es clave en las primeras etapas de la infección vírica, pero lo es también en las últimas fases de la inmunidad adaptativa, donde tienen un importante papel controlando la infección (Swiecki & Colonna, 2015). Esto es gracias a que son las únicas células capaces de producir altas cantidades de IFN de tipo I, tanto IFN- $\alpha$  como IFN- $\beta$ , y de tipo III (IFN- $\lambda$ ). Debido a esto, poseen un papel importante en la respuesta inmune frente a virus y frente a la presencia de ADN metilado, gracias a la alta expresión de TLR-9. También expresan altos niveles de TLR-2 y TLR-12, pero responden muy pobremente frente al ligando del TLR-2 (Schmid et al., 2010; Balan et al., 2019). Asimismo, se ha visto su capacidad de producir otras citoquinas, como TNF- $\alpha$  (Reizis, 2019), y quimiocinas que atraen a otras células inmunes al sitio de la infección (Bauer et al., 2016).

Las pDC no son especialistas en realizar presentación antigénica a células T, pero se encargan de la tolerancia periférica, liberando antígenos en los ganglios linfáticos, generando células Treg, produciendo IL-10 y TGF- $\beta$ , o induciendo la delección o anergia de las células T (Fallarino et al., 2004; Ochando et al., 2006; Pallotta et al., 2011; Kohli et al., 2016).

Se ha observado que las pDC, aparte de tener un origen mieloide, también podrían tener un origen linfoide (Sathe et al., 2013; Reizis, 2019). Su diferenciación, al igual que el resto de las subpoblaciones de DCs, es dependiente de Flt3L, y se ha observado que el IFN de tipo I aumenta la expresión de Flt3R en los progenitores linfoides comunes, ayudando a la diferenciación hacia pDC (Chen et al., 2013).

### 1.4.3. *Leishmania* y su interacción con las DCs

Aunque los macrófagos y los neutrófilos sean las primeras células hospedadoras para *Leishmania*, las DCs son un elemento clave en la interacción temprana con el patógeno, ya que las complejas interacciones que ocurren entre éstos pueden ser decisivas para el establecimiento de la infección o la generación de una respuesta inmune frente al parásito (Liu & Uzonna, 2012).

Entre los mecanismos provocados por *Leishmania*, dirigidos a la evasión del sistema inmune del hospedador, se incluyen la manipulación de diferentes receptores y vías de señalización presentes en DCs. Por otro lado, *Leishmania* es capaz de inhibir la **activación** de las DCs y su **maduración** (De Trez et al., 2004; Hermida et al., 2014), aunque esto depende de la especie de *Leishmania* y de su fase de desarrollo (Von Stebut et al., 1998). Estudios recientes indican que la alteración de la **activación** de las DCs está asociada directamente con el aumento de la supervivencia de los parásitos y la persistencia en el hospedador (Tibúrcio et al., 2019b). Estudios recientes confirman una **disminución** en la expresión de las moléculas coestimuladoras **CD80, CD86 y CD40** en DCs infectados con *Leishmania* (Von Stebut et al., 1998; Muraille et al., 2003; Figueiredo et al., 2012; Resende et al., 2013; Feijó et al., 2016). De hecho, se ha visto que CD40, y su ligando (CD40L), son importantes para el desarrollo de la resistencia frente a *Leishmania* (Campbell et al., 1996; Kamanaka et al., 1996). Asimismo, *Leishmania* puede inducir una reducción en la tasa de migración de las DCs a ganglios linfáticos, al disminuir la expresión de receptores de quimiocinas o moléculas de adhesión, como CCR7 y JAM-C, respectivamente (Ato et al., 2006; Ballet et al., 2014).

El principal papel de las DCs como APC en la infección por *Leishmania* es la producción de TNF- $\alpha$ , que podría tener un papel protector frente al parásito (Von Stebut & Udey, 2004; Ritter et al., 2008; Ashok & Acha-Orbea, 2014; Tibúrcio et al., 2019b). En estudios *in vivo*, se ha observado que las cDCs son capaces de endocitar promastigotes de manera eficiente y de producir IL-12 (Schleicher et al., 2007), iniciándose así una respuesta Th1 que promueve la protección inmunitaria frente al parásito (Liese et al., 2007; Schleicher et al.,

2007; Rivera-Fernández et al., 2019; Rossi & Fasel, 2018). Sin embargo, en ratones infectados por *Leishmania*, se ha observado una disminución de los niveles de IL-12 y un aumento de IL-4 (Qi et al., 2001). De forma similar, las DCs infectadas con *L. infantum* producían altas cantidades de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Resende et al., 2013).

Gracias a la variedad de subtipos de DCs existentes, se ha visto que pueden coordinarse entre ellos para eliminar al parásito. Por ejemplo, las cDC1 son claves para controlar la infección de *L. major*, ya que son capaces de seguir llevando a cabo el proceso de presentación antigénica aun en presencia de los parásitos (Ashok et al., 2014; Martínez-López et al., 2015). Las pDCs pueden ser detectadas en la piel infectada, aunque no presentan una alta capacidad de endocitosis de los parásitos. Sin embargo, las pDCs sí pueden activarse por la liberación de ADN genómico de *Leishmania*, produciendo altas cantidades de IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IL-12 de una manera dependiente de TLR9 (Schleicher et al., 2007).

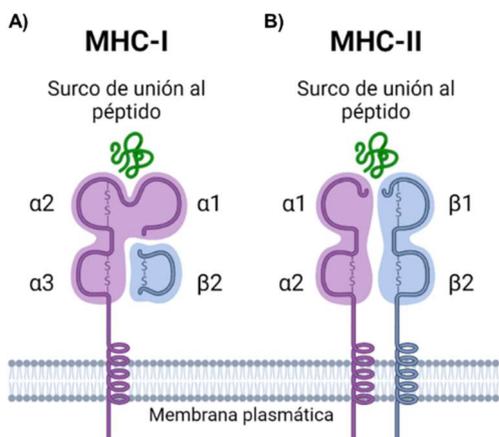
## 1.5. PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA

La presentación antigénica es un proceso que consiste en la expresión de antígenos en la superficie de las APCs. Las APCs son un grupo heterogéneo de células del sistema inmunitario del hospedador que median en la respuesta inmune celular mediante el procesamiento y la presentación de antígenos, para su posterior reconocimiento por parte de las células T, promoviendo el inicio de la respuesta inmune celular adaptativa. Las APCs clásicas incluyen DCs, macrófagos, células de Lagerhans y células B (Shimoda et al., 2022).

La presentación de antígenos se lleva a cabo a través de las moléculas de los MHC-I y MHC-II (Blum et al., 2013). Los linfocitos T CD8 reconocen péptidos derivados de proteínas asociados con moléculas del MHC-I, mientras que los linfocitos T CD4 reconocen péptidos unidos a moléculas del MHC-II. Todos los vertebrados poseen una región multigénica que codifica las moléculas del MHC. En ratones, dependiendo de la cepa, hay de dos a tres genes que codifican moléculas del MHC-I, llamadas H2-D, H2-K y H2-L, y la mayoría de las cepas tienen dos moléculas del MHC-II, llamadas IA e IE (Blum et al., 2013).

Las moléculas del MHC-I son glicoproteínas polimórficas expresadas en la superficie celular de todas las células nucleadas. Su función es unir péptidos cortos de ocho a diez aminoácidos y presentarlos a las células T CD8, que presentan TCRs con especificidad para el péptido presentado (Bjorkman, 1997). Una molécula del MHC I consta de una cadena ligera constante, llamada  $\beta$ 2-microglobulina, que se encuentra unida no covalentemente a una cadena  $\alpha$  (cadena pesada) compuesta por tres dominios:  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 (**FIGURA 24A**) (Blum et al., 2013). Los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 constituyen el surco de unión al péptido (Bjorkman et al., 1987b, 1987a). Por su parte, las moléculas del MHC-II son heterodímeros compuestos de una

cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  que, normalmente, unen péptidos de doce a veinticinco aminoácidos en su surco de unión, formado por los dominios distales de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\alpha 1$  y  $\beta 1$ ) (**FIGURA 24B**) (Schafer et al., 1995; Wu et al., 2021).



**FIGURA 24 | Estructura de las moléculas MHC (A) de tipo I (MHC-I) y (B) de tipo II (MHC-II).**

Existen **dos sistemas proteolíticos principales** que operan dentro de la célula y se encargan de llevar a cabo el procesamiento de las proteínas para generar péptidos. En el citosol, la mayor parte de la proteólisis está mediada por el **proteasoma**, un complejo en forma de barril que consta de cuatro anillos apilados de siete subunidades cada uno. Posee un núcleo 20S, y dos subunidades 19S en los extremos, que reconocen las proteínas que se encuentran ubiquitinadas destinadas a la degradación. El componente 19S presenta actividad desubiquitinasa y es capaz de desplegar las proteínas, permitiendo que las proteínas diana pasen al interior de la subunidad central y la proteólisis sea llevada a cabo (Maupin-Furlow, 2012). El segundo sistema de proteólisis se encuentra en los **lisosomas**. En este caso, las proteínas diana son aquellas que han sido internalizadas desde el exterior celular por un proceso de endocitosis. Las proteínas internalizadas por este proceso entran en una ruta vesicular que consiste en compartimentos que, progresivamente, se van volviendo más ácidos y más activos proteolíticamente, denominados como endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas (Huotari & Helenius, 2011). Existe otro proceso de internalización mediante fagocitosis, donde las partículas internalizadas terminan en fagolisosomas, que se forman por la fusión de fagosomas y lisosomas. Los lisosomas y fagolisosomas tienen un pH de 4-4,5, y contienen una serie de proteasas denominadas catepsinas, las cuales tienen un pH óptimo ácido (Watts, 2004). Estas proteasas realizan un proceso de proteólisis que resulta en la formación de péptidos que serán cargados en moléculas del MHC-II (Blum et al., 2013).

Por lo general, las moléculas del MHC-I se unen a péptidos generados en el citosol por proteólisis proteasómica. Las moléculas del MHC-II generalmente se unen a péptidos que proceden de la proteólisis lisosomal tras haber sido internalizados por endocitosis o fagocitados. Sin embargo, tanto MHC-I como MHC-II pueden llegar a unir péptidos derivados

de proteínas exógenas. Este proceso en el que MHC-I une péptidos exógenos internalizados por endocitosis o fagocitosis se denomina presentación cruzada. Ciertos tipos de DCs, concretamente cDC1, presentan una ruta MHC-I única especializada en mediar este mecanismo, el cual es clave para la iniciación de la respuesta primaria de células T CD8 vírgenes en un proceso denominado cebado-cruzado (Bachem et al., 2010; Blum et al., 2013). Fue en el año 2002 cuando se estableció el papel de las cDC1 en la presentación cruzada de antígenos dependiente de células (Schulz & Reis E Sousa, 2002).

### 1.5.1. Vía clásica de presentación del MHC-I

Los péptidos generados en el citosol, bien derivados de la proteólisis llevada a cabo por el proteasoma o derivados de proteínas víricas, son translocados al RE por el **transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP)**, un miembro de la familia de transportadores ABC (del inglés, *ATP Binding Cassette transporters*) (Oancea et al., 2009) (**FIGURA 25**). TAP es un heterodímero formado por dos subunidades (TAP1 y TAP2) que se asocia con otras proteínas para formar el **complejo de carga de péptidos (PLC)**. La **tapasina** es el primer integrante del PLC y actúa como puente reclutando dímeros de MHC-I- $\beta$ 2microglobulina y **calreticulina (CRT)** (Sadasivan et al., 1996). La tapasina se vuelve estable tras unirse mediante un puente disulfuro a la segunda molécula integrante del PLC, **ERp57** (Dong et al., 2009). ERp57 se une a la CRT y a una segunda chaperona del RE llamada **calnexina (CNX)**, clave para el correcto ensamblaje del MHC-I (Blum et al., 2013). Estas chaperonas únicamente se unen al MHC-I si el glucano presente en esta molécula se encuentra en forma monoglucosilada, proceso llevado a cabo por la enzima UGT1 (del inglés, *UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase*) (Caramelo et al., 2004).

El MHC-I tiene una interacción directa con la tapasina, pero en el momento en el que el péptido se une, esta interacción pierde afinidad por un cambio conformacional de la cadena pesada del MHC-I. El MHC-I se disocia de la tapasina y la afinidad del glucano con la CRT disminuye, por lo que la glucosidasa II actúa eliminando el residuo de glucosa. Si la afinidad del péptido es lo suficientemente alta, la molécula del MHC-I se transportará desde el RE al aparato de Golgi y, finalmente, a la superficie celular. En el caso de que la afinidad del péptido sea baja, el péptido se disocia y la molécula del MHC-I quedará transitoriamente vacía hasta que se le vuelva a agregar el residuo de glucosa por medio de la UGT1, lo que hará que la CRT vuelva a tener afinidad por él y la molécula del MHC-I volverá a formar parte del PLC, donde será sujeto a más rondas de unión a péptidos (Ruddock & Molinari, 2006). Otra proteína clave en el lumen del RE para la correcta formación de los complejos péptido-MHC-I es la **aminopeptidasa de RE asociada con el procesamiento de antígenos (ERAAP)**. Esta proteína se encarga de recortar los péptidos hasta un tamaño de ocho a diez aminoácidos para que puedan ser cargados correctamente en la molécula del MHC-I (Nguyen et al., 2011; Blander, 2018). Una vez que las moléculas del MHC-I se encuentran cargadas correctamente

con el péptido, se liberan y se exportan a la membrana plasmática para que sean reconocidas por las células T CD8 (Blander, 2018).

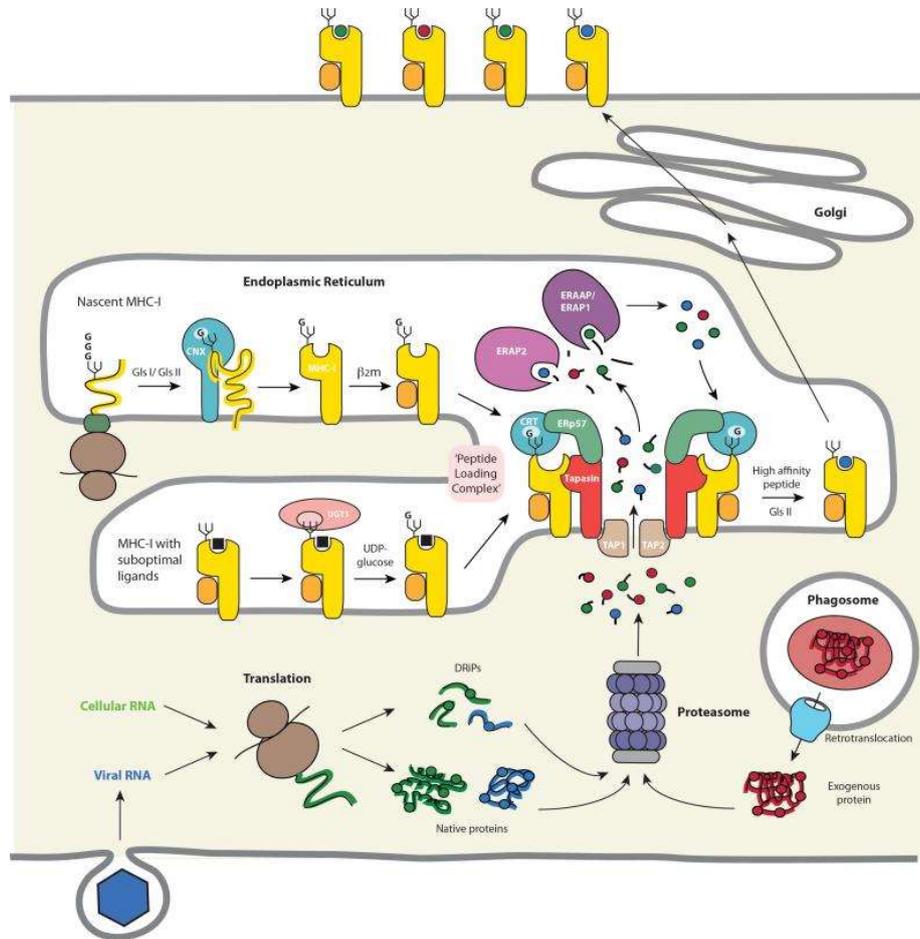


FIGURA 25 | Vía clásica de presentación antigénica en moléculas del MHC-I (Blum et al., 2013).

### 1.5.2. Vía de presentación del MHC II

Las moléculas del MHC-II se ensamblan en el interior del RE (**FIGURA 26**), seguidas de una maduración funcional en endosomas ricos en péptidos antigénicos. Tras la translocación en el RE, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del MHC-II se asocian en un proceso facilitado por una chaperona denominada **cadena invariable**. La cadena invariable se encarga de proteger el surco de unión al péptido del MHC-II y dirige las moléculas del MHC-II hacia los endosomas tardíos para la captura del ligando, gracias a los motivos de di-leucina presentes en la cadena invariable (Landsverk et al., 2009; Blum et al., 2013). Una vez en los endosomas ácidos, se produce la proteólisis de la cadena invariable, quedando un péptido de unos veinte aminoácidos denominado **CLIP (péptido de cadena invariable asociado a MHC-II)**, que se encuentra asociado al surco de unión del MHC-II (Sette et al., 1992). La liberación de CLIP del MHC-II es llevada a cabo por una proteína heterodimérica, **DM**, la cual genera un cambio conformacional en la molécula del MHC-II, permitiendo la disociación de CLIP y la unión

eficiente de los péptidos. Finalmente, los complejos péptido-MHC-II son transportados a la superficie celular para el reconocimiento por parte de las células T CD4 (Blum et al., 2013).

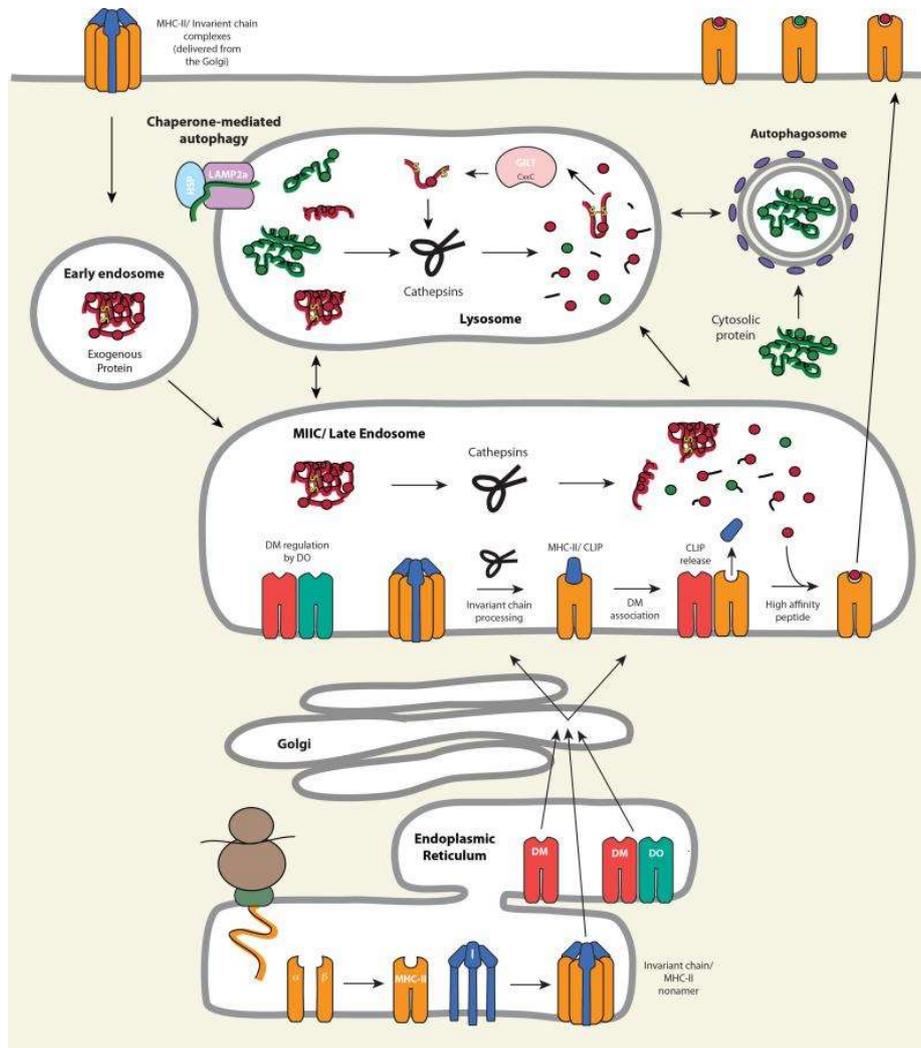


FIGURA 26 | Vía de presentación antigénica en moléculas MHC-II (Blum et al., 2013).

### 1.5.3. Presentación cruzada

La presentación cruzada se refiere a la presentación de péptidos derivados desde una fuente extracelular de proteínas, la cual puede incluir derivados de proteínas internalizadas, microorganismos o células en camino de la muerte (Blander, 2018). La presentación cruzada es llevada a cabo, entre otras, por las cDC1 (Segura & Villadangos, 2009). Durante la presentación cruzada, las proteínas extracelulares acceden al interior celular por procesos de macropinocitosis, endocitosis o fagocitosis. Estos procesos llevan implicados receptores de superficie celular que, dependiendo del tipo de receptor involucrado durante la internalización del antígeno, pueden potenciar la presentación cruzada (Burgdorf & Kurts, 2008). Ciertos estudios revelaron que la presentación cruzada se favorece cuando los receptores endocíticos dirigen el antígeno a endosomas tempranos o tardíos y no a lisosomas degradativos. El antígeno ovalbúmina (OVA) ha servido para identificar al receptor para

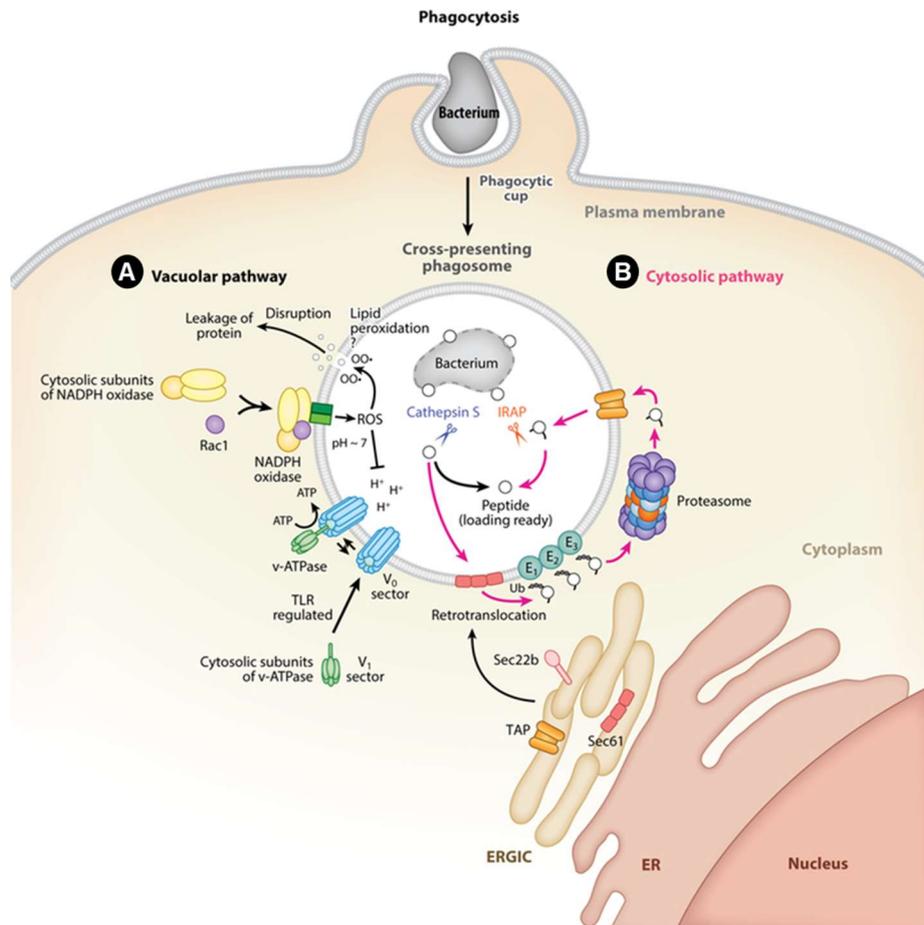
proteínas manosiladas, que es dirigido específicamente a un endosoma temprano, facilitando así el cebado cruzado de células T CD8 específicas de antígeno (Burgdorf et al., 2006, 2007; Rauen et al., 2014). Varios estudios han demostrado que, además de inducir la expresión superficial de moléculas coestimuladoras de células T, las señales procedentes de TLRs pueden controlar múltiples facetas del ensamblaje y la distribución en superficie de complejos péptido-MHC-I presentados de forma cruzada. Asimismo, la internalización de antígenos microbianos por parte de las DCs involucra la señalización por TLRs, aumentando la presentación cruzada de antígenos (Mantegazza et al., 2013; Nair-Gupta & Blander, 2013).

Una vez internalizados, los antígenos se encuentran en el interior de endosomas o fagosomas, encontrándose así en un compartimento diferente del RE, donde reside el PLC, pieza clave para el ensamblaje de los péptidos con MHC-I (Blander, 2018). Es por ello por lo que la presentación cruzada puede ser llevada a cabo a través de dos vías principales de procesamiento de antígenos: la vacuolar y la citosólica (**FIGURA 27**).

**La vía vacuolar (FIGURA 27A)** ocurre cuando las proteínas internalizadas por endocitosis o fagocitosis son degradadas por enzimas endosómicas o fagosomales, respectivamente, y los péptidos resultantes se cargan en moléculas del MHC-I, independientemente de la proteólisis proteasómica y la proteína TAP (Rock & Shen, 2005). Entre estas enzimas destaca la **catepsina S** por su funcionalidad a un pH ligeramente más alcalino que el resto de proteasas vacuolares (Blander, 2018). En las DCs se mantiene un pH intravacuolar de 7-7,3, favoreciendo la presentación cruzada, ya que se previene la degradación excesiva de las proteínas por parte de las proteasas lisosomales hasta el momento en que las DCs encuentran células T específicas de antígeno en los ganglios linfáticos (Delamarre et al., 2005). Este pH se mantiene gracias a las ROS fagosomales generadas por la actividad **NADPH oxidasa**. Las ROS resultantes son capaces de neutralizar el pH ácido de los fagosomas neutralizando los protones (H<sup>+</sup>) generados a través de otra enzima denominada **v-ATPasa**, que se ensambla en la membrana de los fagosomas mediante el reclutamiento de su subunidad citosólica V1, responsable de su actividad ATPasa, y su subunidad integral de membrana V0, el canal de protones (Cotter et al., 2015; Blander, 2018).

**La vía citosólica (FIGURA 27B)** implica que las proteínas internalizadas en endosomas o fagosomas se translocan al citoplasma mediante el retrotraslocón **Sec61** para su ubiquitinación por las ligasas E1, E2 y E3 y su degradación proteasomal. Los péptidos generados tras la proteólisis se importan nuevamente mediante **TAP** a los endosomas o fagosomas para ser cargados en las moléculas del MHC-I. La presencia de TAP y Sec61 en los fagosomas se produce gracias a la **vía de tráfico vesicular ERGIC** (Compartimento Intermedio entre el RE y el aparato de Golgi) (**FIGURA 28A**). El reclutamiento de estas dos proteínas desde ERGIC se lleva a cabo mediante el emparejamiento de **Sec22b** (un tipo de SNARE, del inglés, *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*), presente en ERGIC, con **sintaxina 4**, presente en fagosomas (Blander, 2018). La maquinaria

de la N-glucosilación del RE también es reclutada por los fagosomas (Guernonprez et al., 2003). En las DCs, los péptidos presentados de forma cruzada se recortan por una aminopeptidasa regulada por insulina (**IRAP**), la cual actúa en las vacuolas de una manera similar a como lo hace ERAP1 en el RE (Saveanu et al., 2009; Weimershaus et al., 2013).

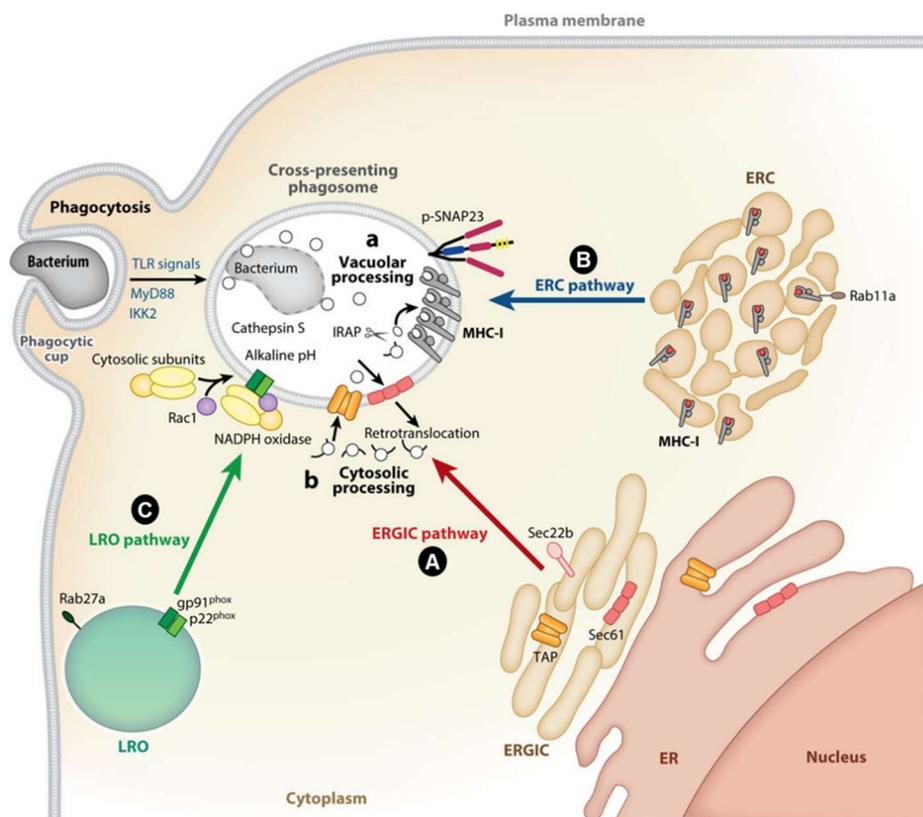


**FIGURA 27 | Vía de presentación cruzada antigénica. A) Vía vacuolar. B) Vía citosólica (Blander, 2018).**

Como proceso final, común a ambas vías, el PLC MHC-I se entrega a los fagosomas o endosomas mediante el tráfico vesicular desde el ERGIC mediante Sec22b-sintaxina 4 (McNew et al., 2000; Cebrian et al., 2011). Asimismo, existe la **vía de tráfico vesicular ERC (Compartimento de Reciclaje Endocítico) (FIGURA 28B)**, la cual actúa como reservorio de moléculas del MHC-I recicladas, procedentes principalmente de la membrana plasmática. En lugar de ensamblar nuevas moléculas del MHC-I en el RE, el ERC contiene moléculas del MHC-I preensambladas que pueden reclutarse fácilmente por fagosomas que contengan carga microbiana, bajo la guía de señales TLR. De esta forma, las moléculas del MHC-I procedentes de ERC se transportan más eficientemente hacia fagosomas que contienen TLRs unidos a su ligando (Nair-Gupta et al., 2014; Blander, 2018). Este proceso ocurre en dos pasos. Primeramente, las señales **MyD88** generadas por los ligandos de los TLRs presentes en los fagosomas, fosforilan y activan la subunidad 2 del inhibidor **IKK2** de la

quinasa **NF- $\kappa$ B**, una subunidad de **I $\kappa$ B** quinasa (**IKK**). Seguidamente, IKK2 fosforila a **SNAP23** fagosomal, creando un sitio de reclutamiento en la membrana fagosomal de SNAREs procedentes de ERC. Cuando SNAP23 está fosforilado (**p-SNAP23**) estabiliza la unión con los SNAREs, produciendo la fusión de membranas (Wickner & Schekman, 2008; Nair-Gupta et al., 2014; Kretzer et al., 2016). Concretamente, este transporte es llevado a cabo por **Rab11a** y los SNAREs **VAMP3** y **VAMP8** presentes en ERC (Husebye et al., 2010). Otra ruta de transporte del MHC-I a los endolisosomas es mediante la formación de un complejo con la cadena invariante (también llamada **CD74**), participante en la ruta del MHC-II, en un compartimento pre-Golgi (Greenfield & High, 1999; Basha et al., 2012).

Una última **vía de transporte vesicular** es la denominada **LRO (del inglés Lysosomal Related Organelles) (FIGURA 28C)**, la cual administra a los fagosomas las subunidades integrales de membrana de la NADPH oxidasa, gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup>. Esta ruta depende de la GTPasa **Rab27a** y de la formación de un complejo SNARE estable que comprende **VAMP8**, **SNAP23** y **sintaxina-7** (Blander, 2018).



**FIGURA 28 | Vías de transporte vesicular. A) Vía ERGIC. B) Vía ERC. C) Vía LRO.** Imagen modificada de Blander, 2018.

Se ha descrito una vía similar de transporte retrógrado en la que un antígeno exógeno soluble y no particulado puede acceder al RE específicamente durante la presentación cruzada en DCs (Ackerman et al., 2005). Estas vías podrían utilizar la misma maquinaria que utilizan las proteínas, los lípidos, ciertos virus y las toxinas bacterianas en el transporte

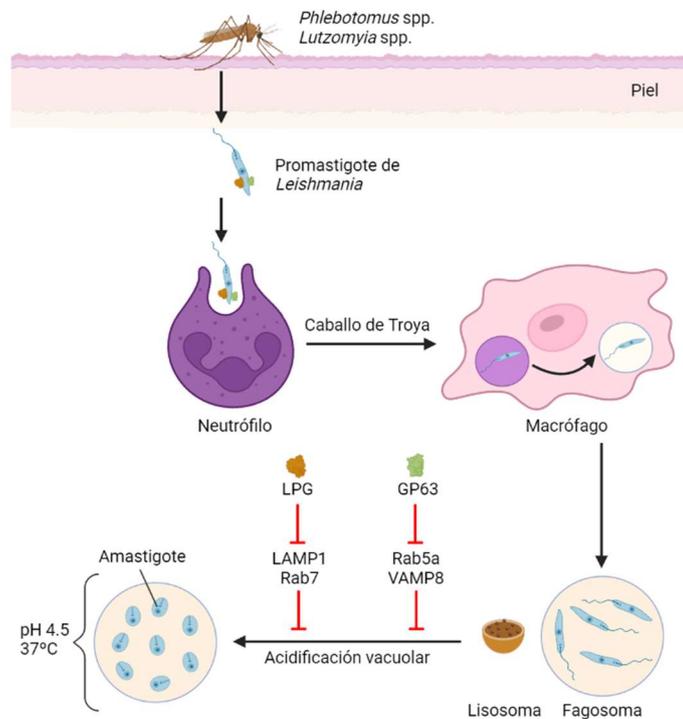
retrógrado desde los endosomas hasta los compartimentos secretores, como el aparato de Golgi y el RE (Johannes & Popoff, 2008). En un estudio, se vio que el péptido SIINFEKL derivado de OVA puede ingresar a los fagosomas a través de un segundo paso independiente de TAP y dependiente de ATP que actualmente no está definido (Lawand et al., 2016).

#### 1.5.4. *Leishmania* y la presentación cruzada antigénica

La presentación cruzada es la base de la sensibilización y la expansión de las células T CD8 frente a antígenos derivados de patógenos intracelulares, como *Leishmania*, que residen en compartimentos citosólicos diferentes de los fagosomas. Se ha demostrado que existe una respuesta protectora de las células T CD8 frente a los antígenos de *Leishmania* cuando son presentados de forma cruzada (Belkaid et al., 2002b). Aun así, *Leishmania* es capaz de inhibir la presentación cruzada para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador al generar un procesamiento antigénico y una presentación en el MHC-I limitados (Antoine et al., 2004; Ghosh & Bandyopadhyay, 2004; Ribeiro-Gomes et al., 2012, 2015; Khouili et al., 2020).

El procesamiento de los antígenos de *Leishmania* ocurre por la ruta intrafagosomal independiente de TAP, que es menos eficiente y requiere una mayor cantidad de antígenos segregados, en comparación con la ruta dependiente de TAP que ocurre en el RE (Bertholet et al., 2006; Diotallevi et al., 2018). Uno de los mecanismos importantes llevado a cabo por *Leishmania* para alterar la presentación cruzada consiste en interferir en la **formación y maduración de los fagosomas**. Gracias a la capa de **LPG** presente en su membrana, se impide la fusión de la vacuola parasitófora y los lisosomas (Desjardins & Descoteaux, 1997; Lodge & Descoteaux, 2005). Además, el LPG impide la expresión de marcadores de endosomas tardíos, como **Rab7** y **LAMP-1**, como ocurre con *L. donovani* (**FIGURA 29**) (Scianimanico et al., 1999; Séguin & Descoteaux, 2016). Otra de las proteínas que participan en este proceso es su metaloproteasa de superficie GP63, que es capaz de escindir e inactivar ciertas proteínas implicadas en la presentación antigénica, como **Rab5a** y **VAMP8** (Matheoud et al., 2013; Verma et al., 2017), la cual se encarga de la fusión entre fagosomas y otros orgánulos intracelulares, como los lisosomas (Stow et al., 2006). La inactivación de VAMP8 previene el ensamblaje de **NADPH oxidasa**, enzima clave en la acidificación de los compartimentos implicados en la presentación cruzada (Matheoud et al., 2013). Otra de las acciones del LPG de *L. donovani* y *L. major* es inhibir la activación de la **Proteín Kinasa C (PKC)**, impidiendo el ensamblaje del complejo **NADPH oxidasa**, provocando un bloqueo de la producción de ROS, y excluyendo la ATPasa dependiente de gradiente de protones del fagosoma (Desjardins & Descoteaux, 1997; Dermine et al., 2000; Lodge et al., 2006; Vinet et al., 2009). De esta manera, se inhibe la presentación de antígenos de *Leishmania* en la molécula del MHC-I y se generan células **T CD8** disfuncionales, que terminan muriendo durante el proceso de infección (Joshi et al., 2009; Matheoud et al., 2013).

Otro de los mecanismos llevados a cabo por *Leishmania* es la alteración de las moléculas del MHC, reduciendo la expresión de las moléculas de los MHC I y II en macrófagos (Reiner et al., 1987). Asimismo, *Leishmania* también interfiere en la interacción entre el complejo formado por la molécula del MHC cargada con el péptido y el TCR (Meier et al., 2003), probablemente por una alteración del contenido lipídico de la membrana, alterando los niveles de colesterol (Roy et al., 2016; Semini et al., 2017).



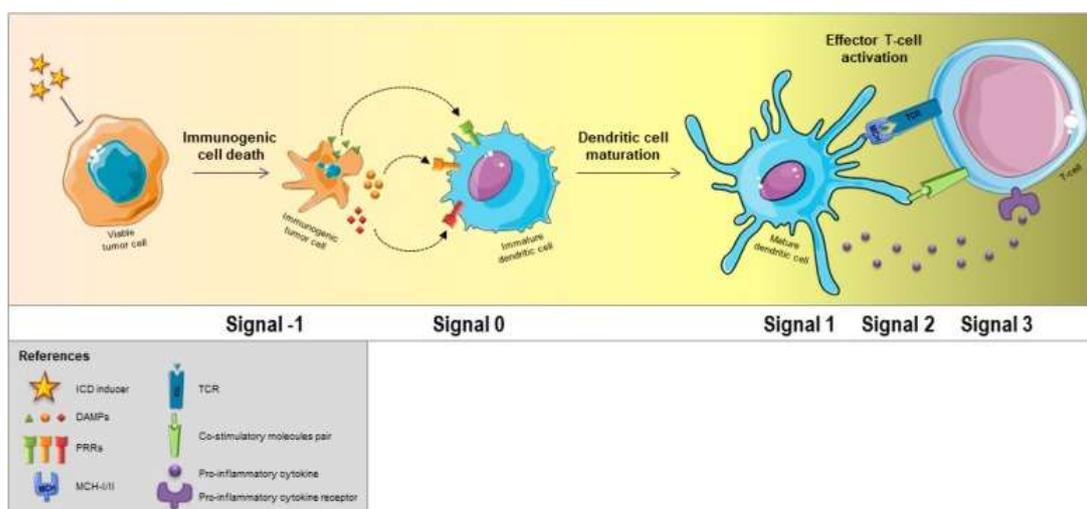
**FIGURA 29 | Papel de los factores de virulencia de *Leishmania* en la entrada al hospedador y su diferenciación desde promastigotes a amastigotes.** Imagen modificada de Gupta et al., 2022.

## 1.6. RUTAS DE MUERTE CELULAR

La **muerte celular inmunogénica (ICD)** se refiere a una forma de muerte celular regulada que activa la inmunidad adaptativa, formando una memoria inmunológica a largo plazo (Lin et al., 2021). La ICD representa un patrón de respuesta que comprende la inducción de estrés organelar y celular, y culmina con la muerte celular acompañada por la exposición, secreción activa o liberación pasiva de numerosos **DAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Daño)** (Fucikova et al., 2020). Los DAMPs se generan a partir de células que sufren una ICD, las cuales tienen un papel importante en el inicio de la inmunidad mediada por células T CD8. Los DAMPs generados en el transcurso de la ICD incluyen chaperonas del RE, como la calreticulina y proteínas de choque térmico, que se encuentran expuestas en la superficie celular, HMGB1 (del inglés, *High Mobility Group-Box 1*), la proteína citoplasmática ANXA1 (anexina A1), ATP, que es liberado al espacio extracelular desde las células

moribundas, e IFN de tipo I (Krysko et al., 2012; Di Virgilio et al., 2018; Rosenzweig et al., 2019).

La liberación definida de DAMPs durante el transcurso de la ICD, y su unión a PRRs expresados en DCs, inicia una cascada celular que, finalmente, resulta en la activación de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa (**FIGURA 30**) (Paludan et al., 2019; Gong et al., 2020). La presentación cruzada de antígenos derivados de células moribundas permite que las DCs presenten proteínas exógenas en moléculas del MHC-I. Asimismo, las células en camino de la muerte, además de antígenos, también proporcionan señales inflamatorias e inmunogénicas que determinan la eficiencia del cebado cruzado de las células T CD8 (Yatim et al., 2017).



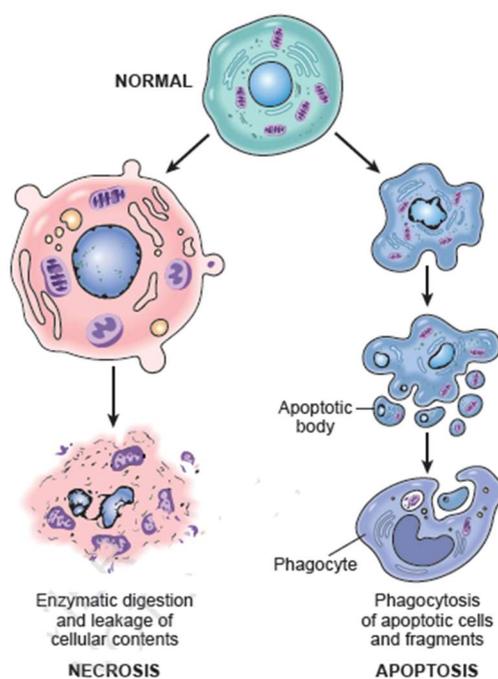
**FIGURA 30 | Secuencia de eventos para una correcta respuesta inmune mediada por linfocitos T a partir de células que sufren ICD (Lamberti et al., 2020).**

En los últimos años, la ICD se ha empleado como una terapia potencial frente al cáncer. La participación esencial de las DCs en las respuestas inmunitarias desencadenadas cuando las células cancerosas se someten a ICD se ha descrito en diferentes estudios (Tesniere et al., 2008; Ghiringhelli et al., 2009; Cirone et al., 2012; Ma et al., 2013; Tesniere et al., 2008). Esto sugiere que la capacidad de los inductores de ICD para estimular una respuesta de células T antitumorales eficiente, depende de la presencia y susceptibilidad a la activación de las DCs en el microambiente tumoral (Lamberti et al., 2020).

### 1.6.1. NECROSIS

La necrosis es una forma de muerte celular no programada que se induce por un daño externo, como hipoxia o inflamación (Elmore, 2007). En ocasiones, este proceso puede implicar la sobreexpresión de ciertas proteínas y moléculas pro-inflamatorias, como el NF-κB, resultando en la ruptura de la membrana celular y la liberación del contenido celular a las

zonas subyacentes, desencadenando una cascada de inflamación y daño tisular (D'Arcy, 2019). En general, se considera que la necrosis es un proceso pasivo que no requiere la síntesis de nuevas proteínas, solo tiene requisitos mínimos de energía y no está regulada por ningún mecanismo homeostático. La muerte celular necrótica ocurre generalmente en respuesta a cambios severos en las condiciones fisiológicas, incluyendo hipoxia, radiación, cambios extremos de temperatura, privación de nutrientes o exposición a tóxicos (Walker et al., 1988; Nicotera et al., 1999; Fink & Cookson, 2005). La célula normalmente responde con un proceso de hinchazón conocido como oncosis, ya que es incapaz de mantener la homeostasis con su entorno (D'Arcy, 2019). También se produce la hinchazón de varios orgánulos celulares, la agregación y degradación aleatoria de ADN nuclear, ruptura extensa de la membrana plasmática y degradación del contenido celular (**FIGURA 31**) (Ferri & Kroemer, 2001).



**FIGURA 31 | Esquema de la ruta necrótica frente a la apoptótica (Naruka, 2023).**

La necrosis se observa normalmente como una situación finalista (“endpoint”) en los cultivos celulares por la presencia de fragmentos celulares en el medio. A menudo, estos fragmentos celulares son simplemente restos de células apoptóticas tardías, cuyos cuerpos apoptóticos han perdido su integridad. *In vivo*, estos cuerpos apoptóticos serían fagocitados por las células fagocíticas del sistema inmune; sin embargo, en cultivos celulares, esto no ocurre, lo que puede confundir el diagnóstico del mecanismo exacto de muerte celular (D'Arcy, 2019). Por lo tanto, la ausencia de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos puede desencadenar en una necrosis secundaria (Majno & Joris, 1995).

## 1.6.2. APOPTOSIS

La **apoptosis** es un mecanismo de muerte altamente conservado y controlado genéticamente por los organismos multicelulares. Durante la apoptosis, la célula cesa su crecimiento y su división, entrando en un proceso que, en última instancia, resulta en su muerte controlada, sin derramar su contenido intracelular al medio que la rodea (Lockshin & Zakeri, 2004; Elmore, 2007). Se la define como un tipo de muerte celular programada cuyo inicio depende de la activación de una serie de cisteín-aspártico proteasas, conocidas como **caspasas**, encargadas de la degradación de la célula desde su interior. Según su papel en el proceso apoptótico, existen dos categorías de caspasas, las iniciadoras y las ejecutoras (Elmore, 2007). Una vez detectado el daño celular, las **caspasas iniciadoras (caspasas 8 y 9)** son activadas desde sus correspondientes procaspasas inactivas que, a su vez, activarán a las **caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7)**. La activación de las caspasas ejecutoras inicia una cascada de eventos que incluye la fragmentación del ADN por la activación de endonucleasas, la destrucción de proteínas nucleares y del citoesqueleto, expresión de ligandos destinados al reconocimiento por células fagocíticas y la formación de cuerpos apoptóticos (Martinvalet et al., 2005; Poon et al., 2014). Los cuerpos apoptóticos que contienen los restos de la célula muerta pueden ser fagocitados por las células del entorno, como macrófagos (D'Arcy, 2019).

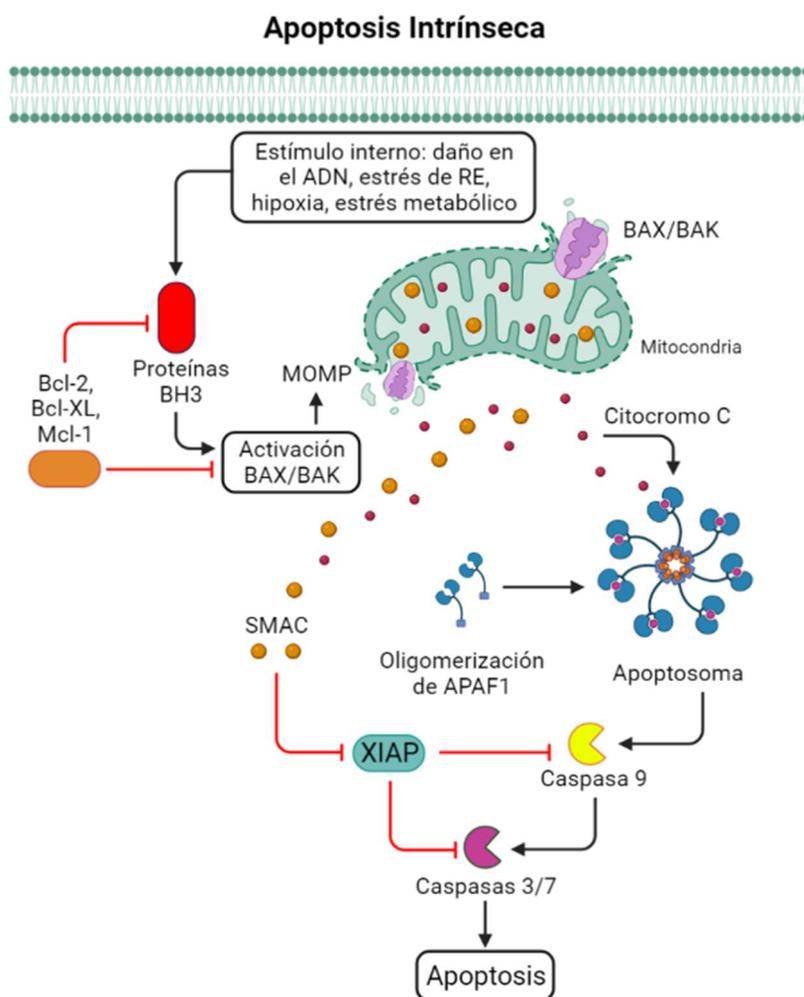
La apoptosis puede ser iniciada cuando la propia célula detecta daño mediante sensores intracelulares; este mecanismo es conocido como **ruta intrínseca**. Alternativamente, puede surgir a partir de la interacción entre una célula del sistema inmune y una célula dañada, lo que es conocido como **ruta extrínseca** (Sica et al., 1990; Oppenheim et al., 2001). Tanto la ruta intrínseca como la extrínseca, trabajan sinérgicamente para mantener la celularidad de los organismos sanos y facilitar que las células defectuosas sean eliminadas del cuerpo.

### 1.6.2.1. Apoptosis Intrínseca

La **ruta intrínseca** de la apoptosis, también conocida como la ruta apoptótica mitocondrial (Igney & Krammer, 2002), incluye una variedad de estímulos que actúan sobre múltiples dianas dentro de la célula. Este tipo de apoptosis es dependiente de ciertos factores liberados desde la mitocondria, y puede iniciarse por la presencia de señales negativas o positivas. Señales negativas como la ausencia de citoquinas, hormonas y factores de crecimiento en el entorno de la célula, promueven la activación de moléculas pro-apoptóticas dentro de la célula, iniciando la apoptosis. Las señales positivas que pueden desencadenar esta ruta apoptótica son la hipoxia, toxinas, radiación, ROS, virus y una gran variedad de agentes tóxicos (Brenner & Mak, 2009).

La caspasa iniciadora que controla la ruta intrínseca es la **caspasa 9 (FIGURA 32)**, la cual es capaz de unirse a la proteína **APAF-1** (del inglés, *Apoptosis Protease-Activating Factor-1*) después de la exposición de su dominio **CARD** (del inglés, *Caspase Activation and*

*Recruitment Domains*). En una célula sana no apoptótica, APAF-1 y la procaspasa 9 presentan su dominio CARD bloqueado y son incapaces de unirse entre sí. Cuando la apoptosis es inducida por ciertos estímulos, se producen cambios en la **permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP)** llevados a cabo por miembros de la familia de proteínas **BCL-2** (del inglés, *B-Cell Lymphoma-2*) pro-apoptóticas (Cain et al., 2002; Tait et al., 2010; Kalkavan & Green, 2018; Riley et al., 2018). Los miembros pro-apoptóticos de la familia BCL-2, **BAX** (del inglés, *BCL-2 Associated X protein*) y **BAK** (del inglés, *BCL-2 homologous Antagonist Killer*), forman poros en la membrana mitocondrial externa, permitiendo la liberación al citoplasma de señales de peligro mitocondriales, como el **citocromo c** y **SMAC** (del inglés, *Second Mitochondrial Activator of Caspases*) (Cain et al., 2002; Kalkavan & Green, 2018). Por el contrario, esta actividad pro-apoptótica es contrarrestada por las proteínas antiapoptóticas BCL-2, por lo que el equilibrio entre los efectores de la familia BCL-2 pro- y anti-apoptóticos dicta el umbral de muerte celular (Kalkavan & Green, 2018). Existen fármacos contra el cáncer, como el ABT-263 (Tse et al., 2008), que se dirigen a las proteínas anti-apoptóticas al imitar a sus antagonistas naturales, como los miméticos de las proteínas BH3 homólogas a BCL-2 (Cory et al., 2016).



**FIGURA 32 | Esquema de la ruta intrínseca de apoptosis.** Imagen modificada de Ichim & Tait, 2016.

El **citocromo c** induce la apoptosis intrínseca (**FIGURA 32**) uniéndose a un dominio presente en los monómeros de **APAF-1**, lo que resulta en un cambio conformacional de APAF-1, exponiéndose su dominio de unión a nucleótidos, siendo capaz de unir dATP (desoxi-ATP). Esta unión induce un cambio conformacional adicional en APAF-1, exponiendo tanto su dominio CARD como el de oligomerización, permitiendo el ensamblaje de varias moléculas de APAF1 en un complejo heptamérico conocido como **apoptosoma** (Acehan et al., 2002). El apoptosoma contiene en su centro varios dominios CARD expuestos, los cuales permiten reclutar y activar varias moléculas de procaspasa 9 a caspasa 9 activa, siendo capaz de transformar la procaspasa 3 en caspasa 3 activa, ejecutora final del proceso de apoptosis (Cain et al., 2002). **SMAC** puede contribuir en el inicio de la apoptosis intrínseca inhibiendo a las **IAPs** (del inglés, *Inhibitors of Apoptosis Proteins*), pero es imprescindible la liberación de citocromo c para iniciar la apoptosis (Ekert & Vaux, 2005). Sin embargo, si la actividad de la caspasa se bloquea después de MOMP, todavía se puede producir muerte celular, pero este tipo de muerte ahora se acompaña de una respuesta de IFN de tipo I y NF-κB, que activan al sistema inmunológico (Rongvaux et al., 2014; White et al., 2014; Giampazolias et al., 2017).

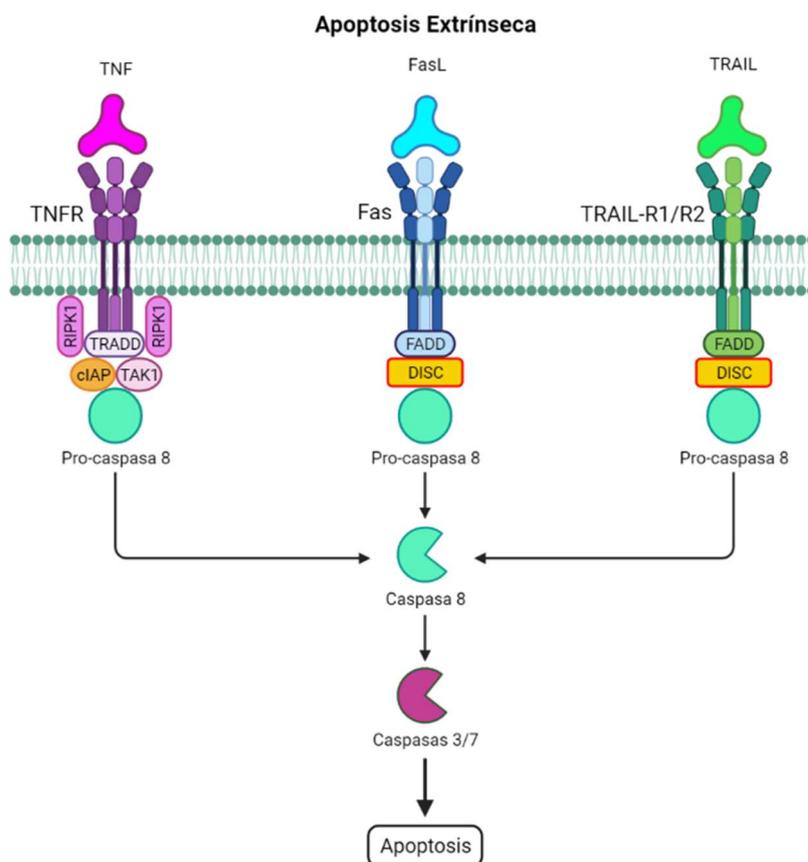
### 1.6.2.2. Apoptosis Extrínseca

La **ruta extrínseca** de la apoptosis, también denominada ruta apoptótica del **receptor de muerte (DR)** (Igney & Krammer, 2002), es iniciada por estímulos procedentes del medio ambiente, células vecinas o del sistema inmunitario, como células NK o macrófagos. Cuando estas células exponen en su superficie ligandos de muerte, se pueden unir a los DRs presentes en la membrana de la célula diana, iniciando la activación de la procaspasa 8 (Kim et al., 2004; Galluzzi et al., 2018). Los DRs forman parte de las proteínas de la superfamilia **TNF** (Factor de Necrosis Tumoral), y existen varios tipos (TNFR1, Fas, DR3, TRAIL-R1 y TRAIL-R2), los cuales incluyen diferentes ligandos de muerte (TNF, Fas-L, TLIA y TRAIL, respectivamente) (Bossen et al., 2006; Galluzzi et al., 2018).

Para activar la **caspasa 8**, un ligando de muerte debe unirse a su DR correspondiente (**FIGURA 33**) para que se produzca el reclutamiento de monómeros de procaspasa 8 al **DED** (del inglés, *Death Effector Domain*) presente en **DISC** (del inglés, *Death-Inducing Signaling Complex*), localizado en el dominio citoplasmático de DR al que se ha unido el ligando. DISC puede estar formado por las proteínas adaptadoras **FADD** (del inglés, *Fas-Associated Death Domain*) o **TRADD** (del inglés, *TNF Receptor-Associated Death Domain*), y por **c-FLIP** (del inglés, *FLICE-like inhibitory protein*), los cuales facilitan la interacción de la procaspasa 8 con DISC (Kim et al., 2004; Galluzzi et al., 2018). El reclutamiento de varios monómeros de procaspasa 8 a DISC resulta en la dimerización y activación de la procaspasa 8, resultando en una caspasa 8 capaz de inducir la apoptosis (D'Arcy, 2019).

En el caso del receptor de TNF (**TNFR**), el complejo formado en el DR se encuentra asociado a **RIPK1** (del inglés, *Receptor Interacting serine/threonine Kinase 1*) (Annibaldi & Meier, 2018), formando el **complejo I** o **rioptosoma**, el cual es un complejo molecular

transitorio asociado con el dominio intracelular de TNFR1, constituido por TRADD, TRAF2, cIAP1/2, RIPK1 y procaspasa 8 (Seo et al., 2021). Para desencadenar el proceso de muerte, se tienen que ver afectados varios puntos de control de la señal de muerte inducida por TNF (Annibaldi & Meier, 2018). De esta forma, RIPK1 se libera del complejo I y forma un nuevo **complejo citosólico II** con **FADD, caspasa 8** y **cFLIP**. Dependiendo de los niveles de cFLIP, el complejo II se degrada rápidamente o se acumula para provocar la muerte celular (Annibaldi & Meier, 2018; Galluzzi et al., 2018). En contraste con **Fas**, la salida principal de los receptores de unión a **TRAIL** (del inglés, *TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand*), **TRAIL-R1** y **TRAIL-R2**, no es la muerte, sino la señalización de NF-κB, una vía crucial para la inflamación y la respuesta antipatógena (Annibaldi & Meier, 2018).



**FIGURA 33 | Esquema de la ruta extrínseca de apoptosis.** Imagen modificada de Ichim & Tait, 2016.

Después de la activación de caspasa 8, pueden producirse dos sub-rutas celulares, dependiendo de si las células sean de tipo I o tipo II (Samraj et al., 2006). En las **células de tipo I**, como los linfocitos, la caspasa 8 escinde directamente las caspasas ejecutoras 3 y 7 e inicia la apoptosis. En las **células de tipo II**, como los hepatocitos, es necesario un bucle de amplificación a través de MOMP para que se produzca muerte celular, lo que destaca la importancia de la intercomunicación entre la ruta extrínseca y la ruta intrínseca (Kalkavan & Green, 2018). Esto es debido a que las IAPs inhiben la activación de las caspasas ejecutoras mediada por caspasa 8, a no ser que las IAPs estén inhibidas por proteínas liberadas desde

la mitocondria, como SMAC (Spencer et al., 2009). La caspasa 8 escinde la proteína **BID** (del inglés, *BH3 Interacting-Domain*) de la familia BCL-2, generando una forma truncada (**tBID**), que activa **BAX** y **BAK**, disparando eficientemente el proceso de MOMP (Haudek et al., 2007; Jost et al., 2009).

La principal defensa contra los patógenos son las respuestas inflamatorias causadas por vías de señalización como la de NK- $\kappa$ B (Rahman & McFadden, 2011) e IFN de tipo I (Schneider et al., 2014). Sin embargo, debido a que los patógenos han desarrollado mecanismos para inhibir estas vías y, por lo tanto, silenciar la respuesta inmune, los desencadenantes de la apoptosis pueden ser muy diversos, como salvaguarda de la supervivencia del hospedador. Sin embargo, hay más rutas de muerte que ayudan a combatir frente a virus, parásitos o células cancerosas.

### 1.6.3. NECROPTOSIS

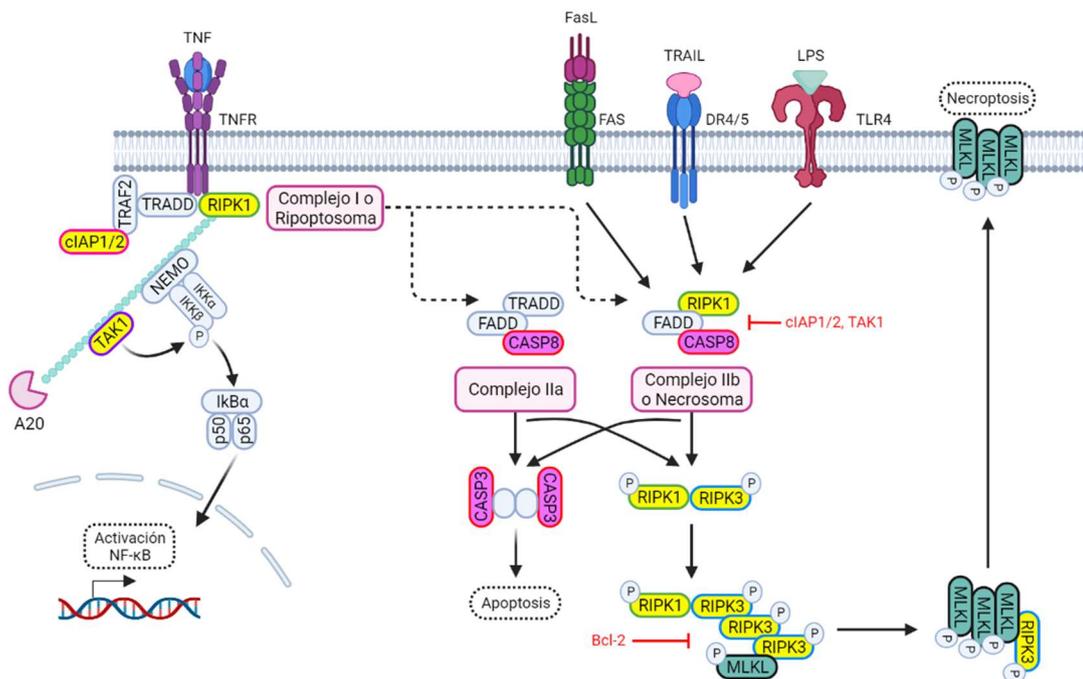
Este tipo de muerte celular fue descrita por primera vez en 2005, donde se vio que presentaba unas características similares a la necrosis, pero se encontraba altamente regulada (Degterev et al., 2005; Li et al., 2012). La necroptosis es un proceso controlado por RIPK1 y RIPK3 (del inglés, *Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 3*) en un ambiente deficiente de apoptosis (Degterev et al., 2005; Cho et al., 2009b; Yatim et al., 2015).

La necroptosis puede desencadenarse por ligandos de la familia de receptores de muerte, así como por una variedad de estímulos extracelulares e intracelulares que inducen la expresión y/o activación de ligandos de la familia de receptores de muerte (Zhou & Yuan, 2014; Oliveira et al., 2018). Los miembros de la superfamilia TNFR son los principales mediadores de la muerte celular, principalmente TNFR1, aunque los receptores de TRAIL (TRAIL-R1/2) y Fas también pueden inducir necroptosis (Holler et al., 2000; Aggarwal, 2003; Degterev et al., 2005). Se ha informado que TNFR1, Fas y TRAIL-R1/2 median la necroptosis en presencia de un inhibidor de pan-caspasas (Holler et al., 2000; Degterev et al., 2005).

La activación de los DR por la unión de sus ligandos recluta y activa a la caspasa 8 a través del dominio de muerte y de las proteínas adaptadoras de los DED, disparando el proceso de apoptosis en ausencia de la ruta de supervivencia del NF- $\kappa$ B (Thorburn, 2004). Es decir, cuando un ligando se une al TNFR1, este receptor se trimeriza e inicia el ensamblaje del **complejo I** o **ripososoma** (**FIGURA 34**) (Seo et al., 2021).

En el **complejo I**, **RIPK1** se modifica rápidamente por múltiples formas de ubiquitinación, tanto de forma lineal como en forma de poliubiquitinas por la acción de ubiquitina-ligasas E3 y **ciAP1**, respectivamente. Cuando RIPK1 se encuentra ubiquitinado, funciona como una estructura para el reclutamiento de **NEMO** y **TAK1** (del inglés, *Transforming growth factor  $\beta$ -Activated Kinase 1*), los cuales son los intermediarios críticos para la activación mediante TNF de las rutas del NF- $\kappa$ B y MAP quinasa, respectivamente. Estas dos vías se encargan de

mantener bajo control la activación de la caspasa 8 y promueven la supervivencia celular (Christofferson et al., 2014).



**FIGURA 34 | Mecanismo molecular de la necroptosis.** La unión de TNF induce la formación del complejo I o ripoptosoma, dando como resultado de la activación de la ruta de señalización de NF-κB. Si esta vía se encuentra inhibida, se activa el complejo IIa, donde la caspasa 8 induce la apoptosis. Si RIPK1 se encuentra desubiquitinado o se ha inhibido su fosforilación, se genera el complejo IIb, induciéndose de nuevo apoptosis. Si la caspasa 8 se encuentra inhibida, RIPK1 y RIPK3 forman el complejo denominado necrosoma, resultando en la activación de MLKL a través de una cascada de fosforilación. MLKL fosforilado sufre un proceso de oligomerización y migra a la membrana plasmática, iniciando la formación de poros. Asimismo, los ligandos de muerte, como FasL o TRAIL, y el LPS pueden activar la necroptosis mediante la formación de necrosomas. Imagen modificada de Seo et al., 2021.

TNFR2 no presenta dominio de muerte, por lo que no puede mediar la muerte celular por sí solo, pero facilita la muerte celular mediada por TNFR1 al promover la degradación de TRAF2, el cual es un mediador clave en la ubiquitinación de RIPK1 por parte de las ligasas E3 y cIAP1 (Zhou & Yuan, 2014). En el complejo I, RIPK1 se encuentra poliubiquitinado en el residuo Lys63. Cuando RIPK1 se desubiquitina por la acción de **CYLD** (del inglés, *Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase*), enzima clave para la activación de la necroptosis, se forman los **complejos IIa** y **IIb** (Moquin et al., 2013; D'Arcy, 2019). Sin embargo, cuando RIPK1 se desubiquitina por la acción de la enzima **A20**, y se ubiquitina en el residuo Lys48, queda marcado para su degradación proteasomal (Wertz et al., 2004).

El **complejo IIa** activa la caspasa 8, desencadenando el proceso de apoptosis, excepto bajo condiciones donde la caspasa 8 se encuentra inhibida. En este caso, se forma el **complejo multiproteico IIb (necrosoma)**, constituido por RIPK1, RIPK3 y MLKL que activa la necroptosis (D'Arcy, 2019). Para iniciar la necroptosis a través del complejo IIb, RIPK1 recluta a **RIPK3** e induce su auto- y trans-fosforilación, provocando la oligomerización de

RIPK3 fosforilado. RIPK3 recluta **MLKL** (del inglés, *pseudokinase Mixed Lineage Kinase domain-Like*) y la fosforila en los residuos de Thr357/Ser358, provocando la oligomerización de MLKL y su migración a la membrana plasmática desde el citoplasma de la célula. Esto resulta en la permeabilización de la membrana celular, posiblemente por su unión a residuos lipídicos de fosfatidilinositol y cardiolipina, culminando en muerte celular por necrosis (Sun et al., 2012; Wang et al., 2014; Weinlich & Green, 2014; Petrie et al., 2019). El FADD y la caspasa 8 también podrían ser detectados en el complejo IIb, pero la caspasa 8 debe permanecer inactiva para que no escinda a RIPK1 (Lin et al., 1999).

La ubiquitinación de RIPK1 juega un importante papel en la regulación de su actividad quinasa. Esto fue demostrado al bloquear la ubiquitinación de RIPK1 mediante un antagonista de cIAP1/2, sensibilizando a las células hacia la inducción de necroptosis por TNF (Feoktistova et al., 2011; McComb et al., 2012; Dondelinger et al., 2013). Asimismo, el empleo de la necrostatina, un inhibidor de RIPK1, inhibe potentemente la necroptosis al bloquear la formación del complejo IIb (Degterev et al., 2005, 2008).

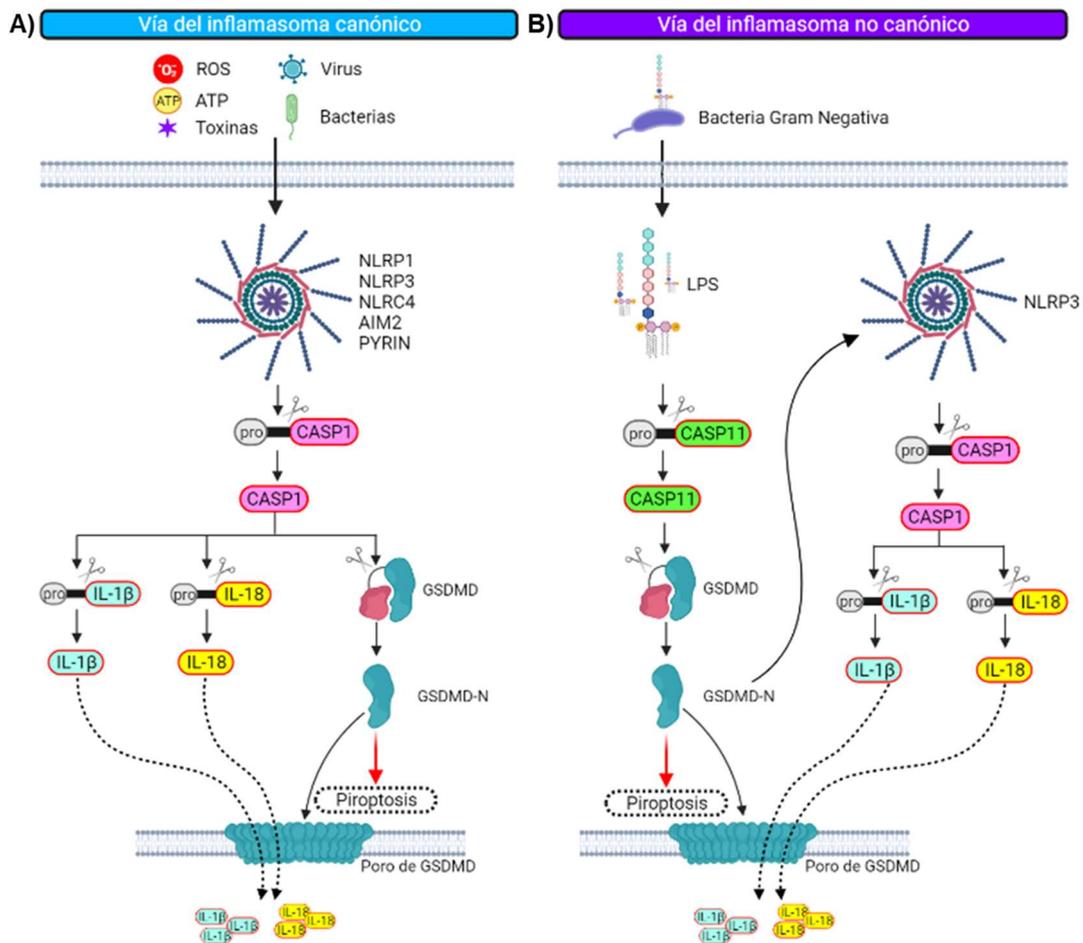
La necroptosis también puede ser disparada tras la estimulación por IFN de tipo I y de tipo II, en ausencia de RIPK1 (Dillon et al., 2014; Lin et al., 2016; Newton et al., 2016). Esto es debido a una proteína inducida por IFN denominada **ZBP1** (del inglés, *Z-DNA Binding Protein 1*), la cual puede reclutar directamente a RIPK3 (Dillon et al., 2014; Kuriakose & Kanneganti, 2018). Asimismo, MLKL también puede ser inducible por IFN (Knuth et al., 2019; Sarhan et al., 2019). Los PRRs también pueden desencadenar necroptosis tras la unión de PAMPs. Estas vías de señalización dependen de RIPK1, de ZBP1 o de TRIF (del inglés, *TIR-domain-containing adapter-Inducing interFeron-β*) para reclutar RIPK3 (He et al., 2011; Kaiser et al., 2013). Por ello, la necroptosis se puede considerar como una segunda línea de defensa frente a patógenos, como virus o bacterias, ya que puede ser desencadenada por IFN y PAMPs. De esta manera, la existencia de necroptosis asegura que se envíe un mensaje de alerta al sistema inmunitario, incluso en condiciones de falta de apoptosis (Legrand et al., 2019).

#### 1.6.4. PIROPTOSIS

La **piroptosis** fue identificada por primera vez en macrófagos infectados con *Salmonella* o *Shigella* (Zychlinsky et al., 1992; Hersh et al., 1999; Boise & Collins, 2001). Originalmente, se la consideraba como un proceso apoptótico genuino, ya que compartía algunas de sus características, como la mediación por caspasas, el tipo de daño producido al ADN y la condensación nuclear. Sin embargo, la piroptosis es una ruta alternativa a la apoptosis, ya que se define como una muerte celular programada proinflamatoria (Boise & Collins, 2001; D'Souza & Heitman, 2001; Fink & Cookson, 2005). Al igual que la necroptosis, la piroptosis es una muerte celular regulada lítica que culmina con la perforación de la membrana plasmática y la liberación del contenido celular (Galluzzi et al., 2018).

La piroptosis supone el procesamiento de gasdermina D o E (**GSDMD** o **GSDME**) por parte de diferentes caspasas (Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015; Wang et al., 2017). La escisión de GSDMD puede producirse por las caspasas 1, 11 u 8 (Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015; Orning et al., 2018; Sarhan et al., 2018), mientras que GSDME es escindida por las caspasas 3 y 8 (**FIGURA 35**) (Wang et al., 2017; Sarhan et al., 2018). Una vez procesadas, las gasderminas forman grandes poros en la membrana plasmática, lo que conlleva a la muerte celular (Ding et al., 2016).

La piroptosis puede ocurrir a través de una **ruta canónica (FIGURA 35A)** y, alternativamente, por la denominada **ruta no canónica**. La **ruta canónica** está mediada por el ensamblaje del **inflammasoma**, el cual es acompañado por la escisión de **GSDMD** y la liberación de **IL-1 $\beta$**  e **IL-18** (Cookson & Brennan, 2001). Los inflammasomas son unas plataformas de señalización claves que detectan PAMPs y DAMPs (Van Gorp & Lamkanfi, 2019). Se conocen varios tipos de inflammasomas, entre los cuales destacan el NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2 y pirina, los cuales son capaces de ensamblarse en la vía canónica (Barton & Medzhitov, 2003; Lamkanfi, 2011). El inflammasoma NLRP3 es el más común, aunque presenta una baja especificidad, ya que detecta una gran variedad de PAMPs, DAMPs, toxinas, ADN mitocondrial, AMP cíclico o, incluso, salida de ATP o K<sup>+</sup> al exterior celular (Mariathasan et al., 2006; Lee et al., 2012; Van Gorp & Lamkanfi, 2019). Por lo general, los inflammasomas se encuentran constituidos por tres componentes: NLRs (del inglés, *NOD Like Receptors*), los cuales contienen proteínas con repeticiones ricas en leucina, el **ASC** (del inglés, *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*), y la **pro-caspasa 1** (Barton & Medzhitov, 2003). El ensamblaje del inflammasoma comienza con la activación de los PRRs tras reconocer PAMPs y DAMPs (Strowig et al., 2012; Liston & Masters, 2017). La activación de PRRs desencadena una ruta de señalización y causa la generación de IFN de tipo I y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Martinon et al., 2002; Lamkanfi & Dixit, 2014; He et al., 2016; Rathinam & Fitzgerald, 2016; Place & Kanneganti, 2018). A continuación, los PRRs se agrupan junto con la procaspasa 1 y el ASC para formar los inflammasomas tras la estimulación de las células por moléculas de señalización procedentes de bacterias o virus (Martinon et al., 2002; Bergsbaken et al., 2009; Miao et al., 2010). Después del ensamblaje del inflammasoma, la **caspasa 1** es activada tras ser hidrolizado su precursor en dos fragmentos. Por un lado, la caspasa 1 es capaz de escindir a **GSDMD** en dos fragmentos, uno correspondiente al C-terminal (**C-GSDMD**) y el otro al N-terminal (**N-GSDMD**). N-GSDMD se traslada a la membrana plasmática para perforarla, generando poros que permiten el flujo de iones entre el medio intracelular y extracelular, rompiendo el equilibrio del gradiente iónico habitual, generando finalmente hinchazón y lisis celular (Chen et al., 2016; Sborgi et al., 2016). En la piroptosis, a diferencia de la apoptosis, se mantiene la integridad nuclear pero sí existe condensación nuclear (Hersh et al., 1999). Por otra parte, la caspasa 1 es capaz de escindir los precursores de **IL-1 $\beta$**  e **IL-18** para generar sus formas activas, las cuales son liberadas a través de los poros formados por GSDMD (Hersh et al., 1999; He et al., 2015; Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015; Liu et al., 2016c).

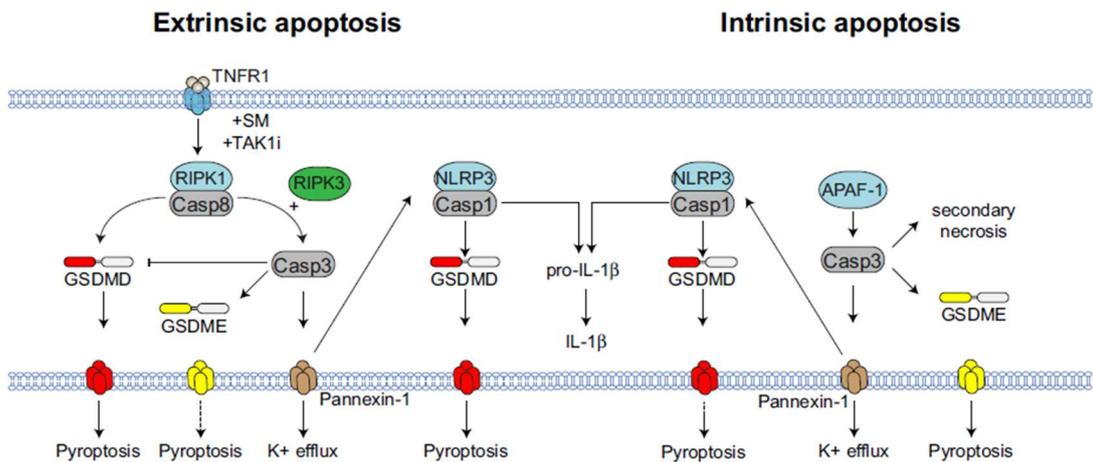


**FIGURA 35 | Mecanismo molecular de piroptosis. A)** Vía canónica: mediada por inflammasoma, caspasa 1 y GSDMD. **B)** Vía no canónica: desencadenada en ausencia de inflammasoma, y mediada por caspasa 11 y GSDMD. Ambas vías concluyen con la liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18 a través de los poros generados por GSDMD.

En la **ruta no canónica** de la piroptosis (**FIGURA 35B**), los inflammasomas se encuentran ausentes y la **caspasa 11** se puede activar directamente al unirse a LPS a través del dominio CARD N-terminal (Shi et al., 2014). Una vez que la caspasa 11 está activada, también puede fraccionar a **GSDMD**, cuyo fragmento **N-GSDMD**, se oligomeriza y se transfiere a la membrana celular para formar poros (Aglietti et al., 2016). Sin embargo, la caspasa 11 no puede activar a pro-IL-1 $\beta$  ni a pro-IL-18, pero puede mediar en la maduración y secreción de estas citoquinas a través del inflammasoma NLRP3 y la caspasa 1 (Shi et al., 2017). Además, la escisión de GSDMD por parte de la caspasa 11 produce la salida de K<sup>+</sup>, induciendo la formación del inflammasoma (Rühl & Broz, 2015; Shi et al., 2015).

En varios estudios se ha observado que las caspasas 3, 8 y 6 son capaces de escindir a GSDME, GSDMD y GSDMC, respectivamente, desencadenando el proceso de piroptosis (**FIGURA 36**) (Zheng et al., 1998; Rogers et al., 2017; Wang et al., 2017; Orning et al., 2018; Hou et al., 2020). Asimismo, la caspasa 9 también se encuentra involucrada en la piroptosis al escindir y activar a la caspasa 3 (Zhou et al., 2018). Igualmente, se ha visto que RIPK3 está

involucrado en la vía del inflamasoma NLRP3, ya que el LPS induce la asociación NLRP3 con FADD y caspasa 8, lo que sugiere una posible relación directa en la regulación entre el ripoptosoma y el inflamasoma NLRP3 (Kang et al., 2013). Estas condiciones se producen en ausencia de cIAP1/2 o XIAP, donde la estimulación del TLR4 conduce a la formación de inflamasomas y produce IL-1 $\beta$  en macrófagos y DCs (Vince et al., 2012; Yabal et al., 2014). Estos datos confirman cada vez más que las rutas celulares de muerte no son rutas aisladas, sino que existe una interconexión entre ellas.



**FIGURA 36 | Participación de la caspasa 3 y RIPK3 en el proceso de formación del inflamasoma y la escisión de GSDM (Chen et al., 2019).**

En resumen, la piroptosis se caracteriza por una cinética de muerte rápida y su naturaleza hiperinflamatoria, derivada de la secreción de IL-1 $\beta$  y la liberación de DAMPs. Por ello, compromete en ciertas ocasiones la supervivencia de los parásitos y, en ciertas enfermedades, la secreción de IL-1 $\beta$  puede llegar a ser contraproducente (Mantovani et al., 2019; Van Gorp & Lamkanfi, 2019).

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

- I. Establecer condiciones de muerte celular inmunogénica (ICD) mediante la inducción de necroptosis, apoptosis intrínseca y apoptosis extrínseca empleando inhibidores de proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2 e IAPs en macrófagos murinos derivados de médula ósea (BMDM) y macrófagos RAW 264.7 infectados con *L. infantum* 2713.
  - a. Evaluar la viabilidad y citotoxicidad de BMDM y RAW 264.7 mediante AlamarBlue y LDH, respectivamente, tras el tratamiento con los inhibidores correspondientes y determinar si estos parámetros se ven alterados por el proceso de infección.
  - b. Cuantificar la activación de las caspasas 8, 9 y 3/7 en BMDM y RAW 264.7 infectadas y no infectadas tras el tratamiento con inductores de ICD.
  - c. Cuantificar la concentración de IL-1 $\beta$  mediante ELISA en BMDM infectadas y no infectadas tras el tratamiento con inductores de ICD.
  - d. Puesta a punto de un método de evaluación *ex vivo* de la viabilidad de amastigotes de explantes de bazo de ratones C57BL/6 o BALB/c infectados con *L. donovani* LV9 iRFP tras su co-cultivo con esplenocitos de ratones C57BL/6 sanos estimulados con macrófagos en los que se ha inducido ICD.
- II. Generar cepas de *L. infantum* 2713 HASPB:OVA y *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA para que produzcan ovalbúmina (OVA) anclada a la cara externa de la membrana plasmática del parásito.
  - a. Evaluar la producción de OVA mediante Western blot y microscopía confocal de las cepas generadas.
- III. Generar ICD mediante radiación UV en células RAW 264.7 no infectadas e infectadas con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA y evaluar el porcentaje de células apoptóticas mediante la cuantificación de Anexina-V y yoduro de propidio por citometría de flujo.
  - a. Cuantificar el porcentaje de infección de células RAW 264.7 irradiadas con UV e infectadas con *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA mediante la cuantificación de la proteína mCherry por citometría de flujo.
- IV. Evaluar la presentación cruzada antigénica mediante el hibridoma B3Z tras el empleo de células RAW 264.7 irradiadas con UV e infectadas con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA como cargo de BMDM y BMDC (células dendríticas derivadas de médula ósea).
- V. Determinar el estado de activación de BMDM evaluando la expresión de moléculas MHC-II y las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 mediante citometría de flujo.
- VI. Evaluar la presentación cruzada antigénica mediante la cuantificación por citometría de flujo de la proliferación de células OT-I, empleando cDC1 cargadas con amastigotes de la cepa *L. infantum* 2713 HASPB:OVA, células RAW 264.7 irradiadas con UV con diferentes energías o tratadas con los inhibidores inductores de ICD.

## 2. OBJETIVOS

- VII. Realizar el fenotipado de bazos sanos e infectados a distintos tiempos con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA procedentes de ratones BALB/c. Caracterizar las distintas subpoblaciones de DCs existentes y determinar si la infección provoca cambios en sus proporciones.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 3.1. MATERIALES

### 3.1.1. LÍNEAS CELULARES

#### **BMDM (Bone Marrow Derived Macrophage).**

Los macrófagos obtenidos a partir de precursores de médula ósea fueron aislados de ratones C57BL/6. El método de aislamiento se encuentra descrito en el *apartado 3.2.1.1*.

**BMDC (Bone Marrow Dendritic Cell).** Las DCs obtenidas a partir de precursores de médula ósea fueron aisladas de ratones C57BL/6 y se diferenciaron mediante GM-CSF (*apartado 3.2.6.1*) y mediante el ligando Flt3 (*apartado 3.2.7.1*).

**RAW 264.7.** La línea celular de macrófagos murina RAW 264.7 procede de un tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson. Estas células fueron suministradas por Sigma Aldrich. Las células fueron cultivadas a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/mL en Medio RAW 264.7 hasta alcanzar el 80% de confluencia.

**L929.** La línea celular L929 se corresponde con células murinas procedentes de tejido conectivo subcutáneo, tejido adiposo y tejido areolar. Esta línea celular fue cedida por la Dra. Celia Fernández Rubio del Instituto de Salud Tropical (ISTUN), Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Navarra. Su cultivo fue realizado en Medio DMEM + 10% FBS (Suero Fetal Bovino) a partir de una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/mL, realizándose pases cada 3-4 días cuando alcanzaban el 80% de confluencia. El sobrenadante del cultivo de esta línea celular fue empleado como fuente del Factor M-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos) para la diferenciación de los precursores de médula ósea hacia un perfil macrofágico (Heap et al., 2021).

**B3Z.** El hibridoma B3Z representa un clon de células T citotóxicas específicas de OVA/K<sup>b</sup> transfectadas con el gen lacZ, el cual se encuentra regulado bajo la actividad transcripcional del promotor de IL-2. Cuando el péptido OVA 257-264 (SIINFEKL) es presentado por las APC en el MHC-I y es reconocido por el TCR, conduce a la activación transcripcional de estos elementos promotores, que dan como resultado la producción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (**FIGURA 47**). Esta línea celular fue cedida por el Dr. Salvador Iborra Martín, Departamento de Inmunología,

Oftalmología y ORL de la Universidad Complutense de Madrid. Las células fueron cultivadas en Medio B3Z partiendo de una densidad de  $10^6$  células/mL hasta alcanzar una confluencia del 80%.

**B16-Flt3L.** La línea celular B16-Flt3L procede de un melanoma de un ratón C57BL/6 y fue cedida igualmente por el Dr. Salvador Iborra Martín. Estas células fueron cultivadas partiendo de una densidad de  $5 \times 10^5$  células/mL en Medio B16-Flt3L hasta alcanzar una confluencia del 80%. El sobrenadante del cultivo de esta línea celular fue empleado como fuente del ligando Flt3 para la diferenciación de células precursoras de médula ósea hacia DCs (Brasel et al., 2000).

### 3.1.2. PARÁSITOS

***L. infantum* 2713.** Esta cepa fue adquirida al Centro Hospitalario Universitario (CHU) de Toulouse, Francia. La cepa *L. donovani* LV9 fue cedida por Philippe M Loiseau de la Universidad Paris-Saclay, Francia.

***L. infantum* 2713 HASPB:OVA.** Esta cepa fue generada durante el desarrollo de la tesis doctoral con el fin de producir parásitos que expresaran OVA en la cara externa de su membrana plasmática.

***L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA.** Esta cepa fue generada durante el desarrollo de la tesis doctoral a partir de la cepa *L. infantum* 2713 mCherry, la cual expresa la proteína fluorescente mCherry, además de expresar OVA en la cara externa de su membrana plasmática.

***L. donovani* LV9 iRFP.** Esta cepa fue transformada genéticamente para la expresión de la proteína fluorescente infrarroja (iRFP), la cual nos permite realizar un seguimiento de la viabilidad de los parásitos a través del sistema de imagen Odyssey LI-COR.

Las distintas cepas de parásitos fueron cultivadas como promastigotes a una densidad de  $10^6$  células/mL a 26°C en Medio M199. Los pases fueron realizados cada 3-4 d hasta alcanzar su fase exponencial. Para la infección en ratones, los parásitos se cultivaron durante 5-7 d en Medio Schneider hasta su fase estacionaria.

Para la diferenciación de amastigotes a partir de promastigotes, los parásitos fueron cultivados en Medio Amastigote pH 5.5 a 37°C

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

durante 5-7 d, partiendo de una densidad inicial de  $1,5 \times 10^6$  parásitos/mL.

#### 3.1.3. RATONES

**C57BL/6.** Los ratones hembra de 8-12 de edad semanas de la estirpe C57BL/6, fueron adquiridos a Janvier Labs (St Berthevin Cedex, Francia) y alojados en las instalaciones del Animalario de la Universidad de León.

**BALB/c.** Los ratones hembra de 8-12 de edad semanas de la estirpe BALB/C, fueron adquiridos a Janvier Labs (St Berthevin Cedex, Francia) y alojados en las instalaciones del Animalario de la Universidad de León.

**OT-I.** Los ratones empleados fueron hembras de 7-11 semanas de edad de ratones OT-I suministrados por Charles River Laboratories. Los ratones OT-I son una cepa que contiene insertos transgénicos para los genes Tcr $\alpha$ -V2 y Tcr $\beta$ -V5 que codifican para el TCR. El TCR transgénico se diseñó para reconocer los residuos peptídicos de ovoalbúmina 257-264 (OVA<sub>257-264</sub>) (SIINFEKL) en el contexto de H2Kb (interacción del correceptor CD8 con la molécula MHC-I). Esto da como resultado células T CD8<sup>+</sup> (células OT-I) específicas de OVA. Esto supone que las células OT-I de este ratón reconocen principalmente OVA<sub>257-264</sub> cuando se presentan por la molécula MHC I (Hogquist et al., 1994; Clarke et al., 2000).

Todos los ratones se estabularon en las instalaciones del Animalario de la Universidad de León en condiciones de estabulación estándar con libre acceso a pienso y agua. Los protocolos de manejo de animales utilizados en este estudio cumplen con la Ley Española (RD 53/2013) inspirada en la Legislación de la Unión Europea (2010/63/UE) y fueron aprobados por la Junta de Castilla y León bajo el OEBA JMJ/bb y 2113.2.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR INMUNOGENICA (ICD)

El objetivo de este apartado fue inducir la muerte celular inmunogénica (ICD) mediante el uso de inhibidores de proteínas que forman parte de diferentes rutas de muerte celular.

#### 3.2.1.1. Obtención de células progenitoras de médula ósea

1. Eutanasiar al ratón con CO<sub>2</sub>.
2. Esterilizar el abdomen y las patas traseras del ratón con etanol al 70%.
3. Hacer una incisión en el abdomen y cortar hacia afuera para exponer las patas traseras. Cortar el fémur en el extremo proximal, manteniendo la epífisis intacta, y la tibia en el extremo distal. Cortar el musculo circundante.
4. Con material quirúrgico estéril, cortar el fémur en la epífisis proximal y en la articulación de la rodilla. Usando una aguja de 25G y una jeringa de 10 mL, enjuagar el fémur con HBSS sobre una malla de 70  $\mu$ m colocada sobre un tubo de 50 mL para individualizar las células y crear una suspensión celular. Repetir con la tibia. El lumen del fémur y de la tibia debe cambiar de un color rojo a un color blanco, a medida que se van extrayendo las células de la médula ósea.
5. Centrifugar 10 min a 2.500 rpm. Descartar el sobrenadante.

En el caso de querer congelar las células extraídas, resuspender el pellet en Medio de Congelación y congelar  $10^7$  células/vial. Almacenar a -80°C durante 24-48 h y transferir a N<sub>2</sub> líquido.

#### A. Diferenciación de BMDM:

1. Resuspender el pellet de células en 10 mL de Medio BMDM con un 30% del sobrenadante L929. Contar las células.
2. Sembrar un total de  $10^7$  células en 5 mL de Medio BMDM con un 30% del sobrenadante

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

L929 en una placa de Petri de 60 mm tratada para cultivo celular. Incubar a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta el día siguiente. De esta forma, se permite que los fibroblastos se adhieran a la placa, mientras que las células precursoras de la médula ósea (no adherentes) se queden suspendidas en el medio de cultivo.

3. Replaquear el sobrenadante en una placa de Petri de 90 mm no tratada para cultivo celular y añadir 5 mL de Medio BMDM con 30% del sobrenadante L929 fresco.
4. Incubar a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
5. Al tercer día de diferenciación, añadir 5 mL de Medio BMDM con un 30% del sobrenadante L929 fresco.
6. Tras 7 d de diferenciación, aspirar el medio de cultivo y añadir 3 mL de Tripsina-EDTA.
7. Incubar a 37°C durante 5 min.
8. Añadir 10 mL de PBS a la placa para desactivar la tripsina y pipetear para ayudar a que las células se despeguen de la placa.
9. Transferir las células a un tubo y centrifugar a 2.500 rpm, 10 min.
10. Retirar el sobrenadante y resuspender las células en Medio BMDM con un 10% del sobrenadante L929.

#### 3.2.1.2. Tratamiento con inductores de ICD

1. Plaquear 100.000 células/pocillo de BMDM / RAW 264.7 en una placa de 96 pocillos de fondo plano en 100 µL de Medio BMDM al 10% del sobrenadante L929 / Medio RAW 264.7.
2. En el caso de los pocillos que van a ser infectados, esperar 2 h a que las células se adhieran al fondo para realizar la infección. La infección fue realizada con la cepa *L. donovani* LV9 iRFP PAC (puromicina) (**FIGURA 37**) con un Ratio de Infección (MOI, del inglés, *Multiplicity Of Infection*) (10:1). Tras 2 h de infección, se realizaron tres lavados con PBS para retirar los parásitos no internalizados.
3. Incubar 16 h a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.
4. Realizar un pre-tratamiento de 3 h con 100 µL de los compuestos preparados al 2X en

Medio BMDM al 10% del sobrenadante L929 / Medio RAW 264.7. Los compuestos y sus concentraciones se indican en la **FIGURA 38**.

Al añadirse sobre las células, donde ya había 100 µL de Medio BMDM / RAW 264.7 ( $V_{\text{final}} = 200 \mu\text{L/pocillo}$ ), estos compuestos se preparan al doble de concentración en el medio de cultivo correspondiente.

(\*) En el caso de los experimentos realizados para medir la viabilidad con la tinción alamarBlue donde se establecen condiciones de necroptosis, las células fueron pre-tratadas durante 1 h con Z-VAD-FMK (25 µM), GSK547 (5 µM) y HS-1371 (2,5 µM).

5. Incubar a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
6. Realizar el tratamiento con los inhibidores. Los compuestos y sus concentraciones se indican en la **FIGURA 38**.
7. Incubar durante 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
8. Estas células están listas para llevar a cabo los distintos ensayos que permitan evaluar la citotoxicidad, la viabilidad, IL-1β y la actividad de las caspasas.

#### 3.2.1.3. Ensayo de viabilidad con alamarBlue:

Tras el tratamiento de las células con los compuestos que producen ICD, se evaluó la viabilidad celular mediante alamarBlue Invitrogen (**FIGURA 40A**) (Voytik-Harbin et al., 1998).

1. Añadir el 10% (v/v) de alamarBlue del volumen de medio existente en el pocillo. En nuestro caso, son 50 µL de medio, por lo que se añaden 5 µL/pocillo del reactivo.
2. Incubar a 37°C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> durante 4-5 h.
3. Lectura de la fluorescencia (Excitación/Emisión = 560/590 nm) en el lector de placas Varioskan LUX Thermo Scientific.
4. Calcular el % de Viabilidad:

$$\% \text{ Viabilidad} = \left( \frac{\text{RFU Tratado}}{\text{RFU No Tratado}} \right) \times 100$$

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.1.4. Ensayo de citotoxicidad mediante Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Tras el tratamiento de las células con los compuestos que producen ICD, se evaluó la citotoxicidad mediante el Kit CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Invitrogen (**FIGURA 40B**) (Weidmann et al., 1995), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Antes de empezar:

- Calentar el Tampón de Lisis y la Solución de Parada a temperatura ambiente (RT).
- Preparar la Solución del Sustrato: añadir 11,4 mL de diH<sub>2</sub>O al Contenido de la Mezcla de Sustrato y mezclar hasta disolverlo.
- Preparar la Solución del Tampón de Ensayo: descongelar el Tampón de Ensayo a RT y proteger de la luz.
- Preparar la Mezcla de Reactivos: combinar 600 µL del Tampón de Ensayo con los 11,4 mL de la Solución del Sustrato, mezclar bien y proteger de la luz hasta su uso.
- Preparar el control *positivo* de LDH (1X): diluir 1,5 µL del Control Positivo de LDH con 1 mL de BSA (Albúmina Sérica Bovina) al 0,5% (p/v) en PBS.

1. Preparar los controles del experimento:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \left( \frac{\text{Actividad de LDH Tratados con Compuestos} - \text{Actividad Espontánea de LDH}}{\text{Actividad Máxima de LDH} - \text{Actividad Espontánea de LDH}} \right) \times 100$$

#### 3.2.1.5. Cuantificación de la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9:

La actividad de las caspasas iniciadoras (8 y 9) y ejecutoras (3/7) se midió con el Kit Cell Meter Multiplexing Caspase 3/7, 8 and 9 Activity Assay AAT Bioquest, siguiendo las instrucciones del fabricante.

1. Preparación de reactivos:

- Solución de Trabajo de Actividad de Caspasa Individual: preparar la Solución de Trabajo de las Caspasas 3/7, 8 y 9 añadiendo 50 µL del sustrato (componentes A, B o C) en 10 mL del Tampón de Ensayo (componente D) y mezclar bien.

- Preparar los Controles de Actividad Máxima de LDH, añadiendo 10 µL del Tampón de Lisis (10X) y mezclar. Incubar la placa durante 45 min a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
  - Preparar los Controles de Actividad Espontánea de LDH, añadiendo 10 µL de diH<sub>2</sub>O y estéril.
2. Transferir 50 µL de medio de cada muestra a una placa de 96 pocillos.
  3. Añadir 50 µL/pocillo de la Mezcla de Reactivos y mezclar bien.
  4. Incubar la placa durante 30 min a RT protegida de la luz.
  5. Añadir 50 µL/pocillo de la Solución de Parada y mezclar bien.
  6. Medir la absorbancia a 490 nm y a 680 nm.
  7. Para determinar la actividad LDH, sustraer los valores de absorbancia obtenidos a 680 nm (fondo) de los valores de absorbancia obtenidos a 490 nm antes de calcular el % de citotoxicidad.
  8. El % de citotoxicidad se calcula mediante la fórmula:

- Solución de Trabajo de Actividad Tri-Caspasa: añadir 50 µL de cada sustrato de caspasa de interés (componente A+B+C) en los 10 mL del Tampón de Ensayo (componente D).
2. Plaquear 100.000 BMDM/pocillo y tratar con los compuestos de interés durante 24 h, a 37°C y en una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5%.
  3. Añadir 100 µL/pocillo de la Solución de Trabajo de Actividad Tri-Caspasa.
  4. Incubar la placa a RT entre 30 y 60 min, protegida de la luz.
  5. Preparar unos pocillos para hacer el *blanco* del experimento (medio sin células).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

6. Lectura de la fluorescencia (**TABLA 2**) con el lector de placas Varioskan LUX Thermo Scientific.

7. Calcular el incremento de actividad de las caspasas en las Muestras Tratadas con respecto a la Muestra No Tratada:

$$\Delta\text{RFU NT} = \frac{\text{Valor Fluorescencia Muestra Tratada}}{\text{Valor Fluorescencia Muestra No Tratada}}$$

**TABLA 2 | Longitudes de onda espectrales para Caspasas 3/7, 8 y 9.**

Caspasa	Fluorescencia	Excitación	Emisión
Caspasas 3/7	Roja	535 nm	620 nm
Caspasa 8	Verde	490 nm	525 nm
Caspasa 9	Azul	360 nm	470 nm

#### 3.2.1.6. Detección de IL-1 $\beta$ mediante ELISA

Tras el cultivo de las células en presencia de los inhibidores que inducen ICD, se cuantificó la concentración de IL-1 $\beta$  presente en el sobrenadante de las células tratadas mediante el Kit Mouse IL-1 $\beta$  Uncoated ELISA Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de Reactivos:

- Tampón de Recubrimiento (1X): hacer una dilución 1:10 de PBS 10X en diH<sub>2</sub>O.
- Anticuerpo de Captura: diluir el Anticuerpo de Captura (250X) 1:250 con Tampón de Recubrimiento (1X).
- Solución 5X ELISA/ELISPOT: diluir el reactivo concentrado (5X) 1:5 en diH<sub>2</sub>O.
- Estándar: reconstituir el estándar de ratón de IL-1 $\beta$  añadiendo diH<sub>2</sub>O. El volumen de reconstitución está fijado en la etiqueta del vial del estándar. Permitir que el estándar se reconstituya durante 10-30 min. Mezclar vigorosamente para asegurar una solubilización completa y homogénea. El estándar tiene una concentración de 1.000 pg/mL.
- Anticuerpo de Detección: diluir el Anticuerpo de Detección (250X) 1:250 en la Solución ELISA/ELISPOT (1X).
- Estreptavidina-HRP: diluir el concentrado de HRP (Peroxidasa de Rábano Picante) (100X) 1:100 en la Solución ELISA/ELISPOT (1X).
- Tampón de Lavado: Tween-20 al 0.05% (v/v) en PBS.
- Solución de Parada: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 N.

1. Recubrir una placa de 96 pocillos con 100  $\mu$ L/pocillo del Anticuerpo de Captura preparado en el Tampón de Recubrimiento. Sellar la placa e incubar en agitación hasta el día siguiente a 4°C.
2. Aspirar los pocillos y lavar tres veces con >250  $\mu$ L/pocillo de Tampón de Lavado. Esperar 1 min entre cada paso de lavado para incrementar la efectividad de los lavados. Secar la placa en un papel absorbente para remover cualquier tampón residual.
3. Bloquear los pocillos con 200  $\mu$ L/pocillo de la Solución ELISA/ELISPOT (1X). Incubar 1 h en agitación a RT.
4. Preparar la curva estándar.
5. Aspirar y lavar al menos una vez con Tampón de Lavado.
6. Realizar diluciones seriadas (1:2) a partir del estándar (1.000 pg/mL) para hacer una curva de estándares con un total de ocho puntos. Para ello, añadir 100  $\mu$ L/pocillo de la Solución ELISA/ELISPOT (1X) dejando los primeros pocillos vacíos. Añadir 200  $\mu$ L/pocillo del estándar (1.000 pg/mL) de IL-1 $\beta$  a los primeros pocillos vacíos A1/A2. Transferir 100  $\mu$ L de los pocillos A1/A2 a los pocillos B1/B2. Mezclar bien y pasar 100  $\mu$ L a los pocillos C1/C2. No rascar la superficie de los pocillos con las puntas. Repetir este procedimiento cinco veces más.
7. Añadir 100  $\mu$ L/pocillo de los sobrenadantes de las muestras a los pocillos correspondientes.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

8. Añadir 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de Solución ELISA/ELISPOT (1X) al pocillo destinado para hacer el *BLANCO*.
9. Sellar la placa e incubar en agitación a RT durante 2 h (o durante toda la noche en agitación a 4°C para una mayor sensibilidad).
10. Preparar el Anticuerpo de Detección.
11. Aspirar y lavar como en el *Paso 2*. Repetir de tres a cinco veces. Esperar 1 min entre cada lavado para incrementar su efectividad. Secar la placa en un papel absorbente para remover cualquier resto de tampón.
12. Añadir 100  $\mu\text{L}$ /pocillo del Anticuerpo de Detección (1X) a todos los pocillos.
13. Sellar la placa e incubar en agitación a RT durante 1 h.
14. Preparar la Estreptavidina-HRP.
15. Aspirar y lavar como en el *Paso 2*, dejando 1 min entre cada lavado para mejorar su efectividad. Secar la placa en un papel absorbente para eliminar los restos de tampón.
16. Añadir 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de Estreptavidina-HRP (1X).
17. Sellar la placa e incubar en agitación a RT durante 30 min.
18. Aspirar y lavar como en el *Paso 2*, dejando entre 1-2 min entre cada paso de lavado. Repetir el paso entre cinco y siete veces.
19. Añadir 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de la Solución de TMB (1X).
20. Incubar en agitación a RT durante 15 min.
21. Añadir 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de la Solución de Parada.
22. Leer la placa a 450 nm. Si la sustracción de la longitud de onda es posible, sustraer los valores de 570 nm a los valores de 450 nm y analizar los datos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.1.7. ANEXO I.

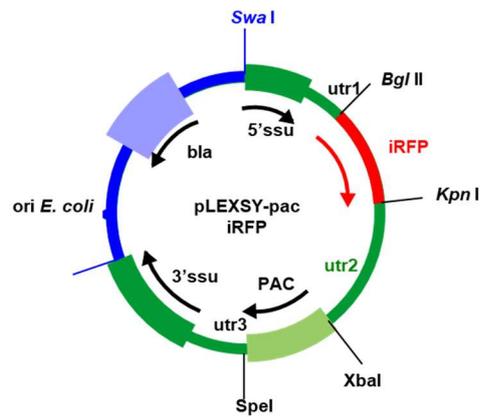


FIGURA 37 | Vector pLEXY-pac iRFP.

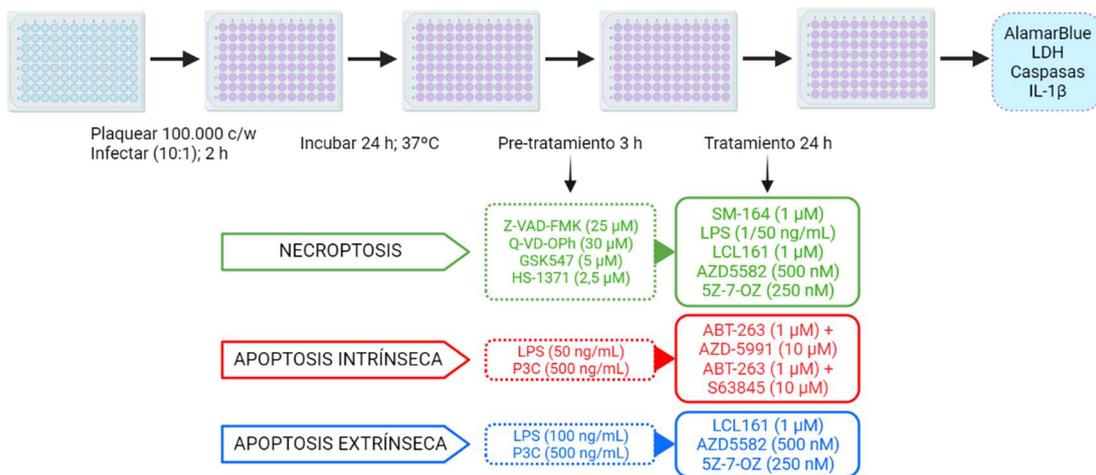


FIGURA 38 | Esquema del procedimiento de trabajo para el tratamiento con los inhibidores.

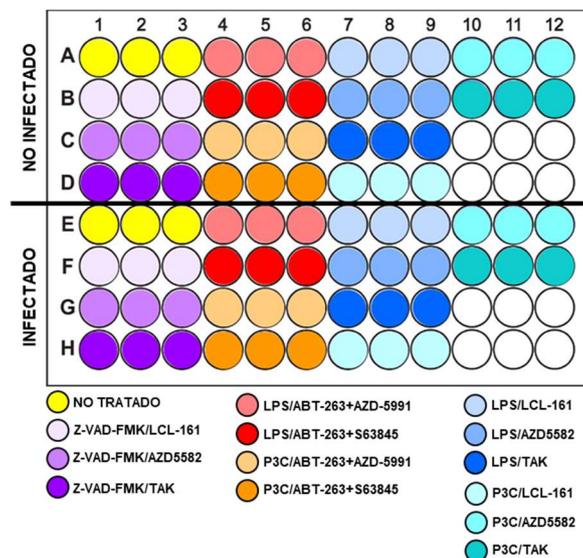
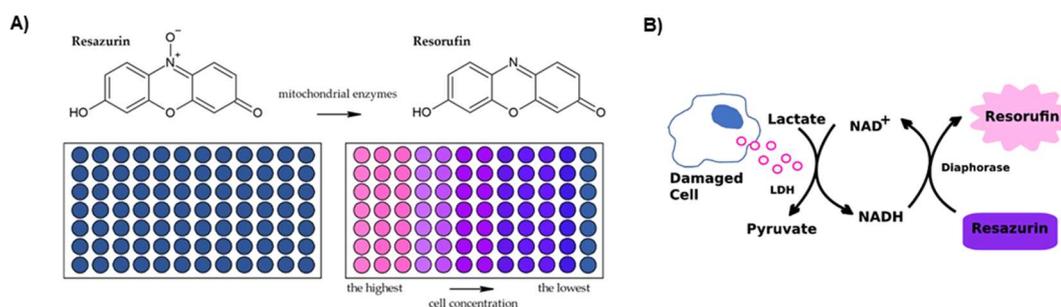


FIGURA 39 | Esquema de la placa de trabajo para el tratamiento con los inhibidores de proteínas implicadas en rutas de muerte celular.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS



**FIGURA 40 | A)** Esquema del mecanismo de la reducción de resazurina a resorufina en el ensayo del alamarBlue (Ligasová & Koberna, 2021). **B)** Esquema del mecanismo del ensayo de citotoxicidad LDH (Tribioscience, 2019).

**TABLA 3 | Reactivos.**

	Distribuidor	Referencia	Protocolo
<b>Kits comerciales</b>			
CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay	Invitrogen	C20301	Ensayo LDH
Mouse IL-1 beta Uncoated ELISA Kit	Invitrogen	88-7013-22	ELISA IL-1 $\beta$
Cell Meter Multiplexing Caspase 3/7, 8 and 9 Activity Assay Kit	AAT Bioquest	22820	Caspasas
<b>Inhibidores</b>			
Z-VAD-FMK	MedChemExpress	HY-16658B	Muerte celular
Q-VD-OPh	MedChemExpress	HY-12305	Muerte celular
GSK547	MedChemExpress	HY-114492	Muerte celular
HS-1371	MedChemExpress	HY-114349	Muerte celular
Pam3CSK4 (P3C)	InvivoGen	TLRL-PMS	Muerte celular
SM-164	MedChemExpress	HY-15989	Muerte celular
LCL161	MedChemExpress	HY-15518	Muerte celular
AZD5582	MedChemExpress	HY-12600	Muerte celular
5Z-7-Oxozeaenol (5Z-7-OZ)	MedChemExpress	HY-12686	Muerte celular
ABT-263 (Navitoclax)	MedChemExpress	HY-10087	Muerte celular
AZD-5991	MedChemExpress	HY-101533	Muerte celular
S63845	MedChemExpress	HY-100741	Muerte celular
<b>Reactivos</b>			
AlamarBlue HS Cell Viability Reagent	Invitrogen	A50101	AlamarBlue
<b>Equipos</b>			
Varioskan LUX Plate Reader	Thermo Scientific		AlamarBlue LDH IL-1 $\beta$ Caspasas

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**TABLA 4 | Medios de cultivo.**

<b>HBSS (pH 7.2)</b>		<i>1 Litro</i>	<b>Medio RAW 264.7</b>		<i>1 Litro</i>
NaCl		8 g	RPMI 1640		10,43 g
KCl		0,4 g	NaHCO <sub>3</sub>		24 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,06 g	HEPES		25 mM
Glucosa		1 g	Mezcla de Antibióticos		5 mL
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O		0,06 g	L-Glutamina		2 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		0,20 g	FBS		10% (v/v)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O		0,185 g	<b>Medio L929</b>		
NaHCO <sub>3</sub>		0,35 g	DMEM/F-12, HEPES	DMEM/F-12, HEPES	
<b>Medio BMDM (pH 7.2)</b>		<i>1 Litro</i>	Mezcla de Antibióticos		2,5 mL
RPMI 1640		10,43 g	FBS		10% (v/v)
NaHCO <sub>3</sub>		24 mM			
L-Glutamina		2 mM			
Mezcla de Antibióticos*		5 mL			
HEPES		25 mM			
1x RPMI AA		20 mL			
C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>		10 mL			
FBS		10% (v/v)			
Sobrenadante L929		10% (v/v)			

\*50 U/mL Penicilina / 50 µg/mL Estreptomina

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.2. CO-EXPLANTE

Tras conseguir distintas condiciones de muerte inmunogénica en macrófagos BMDM y RAW 264.7, quisimos ver si había diferencias entre distintos tratamientos en la reducción de la viabilidad de los parásitos presentes en un explante de bazo infectado tras co-cultivo con esplenocitos activados con un lisado de amastigotes, P3C y macrófagos tratados con las diferentes combinaciones de compuestos.

##### 3.2.2.1. Preparación del cargo

###### A. Células apoptóticas:

1. Se siembran 300.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos sin tratamiento. Las células empleadas en el experimento fueron RAW 264.7 o BMDM.
2. Tratamiento de las células siguiendo el apartado 3.2.1.2. En este caso, al trabajar con placas de 24 pocillos, el volumen final fue de 600  $\mu$ L/pocillo.
3. Recoger las células tratadas tras 3 y 24 h. Para ello, se recogió tanto el sobrenadante como las células adheridas al pocillo, ya que parte de las células se encuentran ya sin adherencia al haber entrado en apoptosis. Tras recoger el sobrenadante de los pocillos a un tubo, añadir 200  $\mu$ L/pocillo de Tripsina-EDTA (0,25%) e incubar durante 5 min a 37°C. Neutralizar la tripsina con PBS y recoger las células al mismo tubo donde se había recogido el sobrenadante. Centrifugar durante 10 min a 2.500 rpm a 4°C.
4. Resuspender el pellet de células en 187,5  $\mu$ L en Medio Esplenocito ( $1,6 \times 10^6$  células/mL) y conservar hasta su uso (25  $\mu$ L/pocillo).

###### B. Lisado de amastigotes de *L. donovani* LV9

1. Para diferenciar amastigotes a partir de promastigotes, estos se cultivaron en Medio Amastigote hasta fase logarítmica. Se centrifugan  $30 \times 10^6$  promastigotes totales durante 10 min a 3.500 rpm y se descarta el sobrenadante. El pellet de promastigotes se resuspende en 20 mL de Medio Amastigote pH 5.5 ( $1,5 \times 10^6$  promastigotes/mL) y se incuba durante 5-

7 d a 37°C con una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> (De Muylder et al., 2011).

2. Trascorrido este tiempo, los amastigotes se recogen por centrifugación durante 10 min a 3.500 rpm.
3. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 200  $\mu$ L de PBS.
4. Realizar siete ciclos de congelación/descongelación en N<sub>2</sub> líquido y conservar durante 24 h en N<sub>2</sub> líquido. Almacenar a 4°C.

##### 3.2.2.2. Preparación del explante de bazo:

1. Se eutanasia al ratón en una atmósfera de CO<sub>2</sub>.
2. Esterilizar el abdomen del ratón con etanol al 70%.
3. Los bazos de ratones no infectados e infectados durante 8 semanas con *L. donovani* LV9 iRFP PAC, se extraen en condiciones estériles y se colocan en una placa de Petri de 60 mm.
4. Se inyectan en los bazos 500  $\mu$ L de colagenasa D (20 mg/mL) empleando una jeringuilla de 1 mL y una aguja de 25G. Los bazos se cortan en piezas pequeñas y se añaden 5 mL de Tampón de Colagenasa que se inyecta en los diferentes trozos.

Con los bazos de los ratones infectados con *L. donovani* LV9 iRFP PAC, añadir 20  $\mu$ M de biliverdina a los 5 mL del Tampón de Colagenasa. De esta manera, se potencia la síntesis de iRFP, debido a que esta proteína emplea la biliverdina como cromóforo – un intermediario del metabolismo del grupo hemo – que hace que aumente la señal fluorescente, facilitando su detección *in vitro* e *in vivo* (Shcherbakova & Verkhusha, 2013).

5. Incubar a 37°C durante 20 min.
6. Pasar todo el material a través de una malla de 100  $\mu$ m colocada sobre un tubo de 50 mL, usando el émbolo de la jeringuilla y diluyendo con PBS hasta un volumen final de 50 mL.
7. Centrifugar durante 7 min a 1.000 x g. Retirar el sobrenadante.

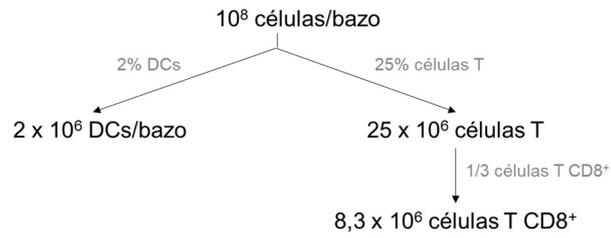
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

8. Resuspender el pellet en 4 mL de Tampón de Lisis e incubar en hielo durante 4 min. Agitar cada minuto.
9. Diluir el Tampón de Lisis con PBS hasta 50 mL.
10. Centrifugar durante 7 min a 1.000 x g. Retirar el sobrenadante.
11. Realizar tres lavados con PBS, enrasando hasta 50 mL cada vez.
12. Centrifugar durante 7 min a 1.000 x g. Retirar el sobrenadante.
13. Resuspender las células en Medio Esplenocito. Contar células.
14. ***Bazo infectado***. Realizar una curva de volúmenes del explante infectado en una placa de 96 pocillos tratada para cultivo celular de fondo óptico plano y paredes negras. De esta manera, se puede calcular el número de Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU)/ $\mu$ L. Incubar durante 2 h a 37°C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Medir la fluorescencia con el sistema de imagen Odyssey LI-COR y calcular el volumen necesario para colocar 600.000 RFU/pocillo en 100  $\mu$ L/pocillo de Medio Esplenocito.
15. ***Bazo sano (esplenocitos)***. Sabiendo que, aproximadamente, el 2% de las células totales de un bazo sano son DCs, sembrar 20.000 DC/pocillo (10<sup>6</sup> células totales de bazo sano/pocillo) en 50  $\mu$ L de Medio Esplenocito.
16. Realizar un pre-tratamiento de 3-4 h del explante de bazo sano antes de cocultivarlo con el explante del bazo infectado (**FIGURA 43**).
17. Añadir P3C a partir de una concentración de 1 mg/mL para conseguir una concentración final de 500 ng/mL de P3C/pocillo.
18. Añadir 40.000 células/pocillo de células apoptóticas (RAW 264.7/BMDM) en 25  $\mu$ L de Medio Esplenocito (2 células apoptóticas : 1 DC; 40.000 células apoptóticas : 20.000 DC).
19. Añadir 600.000 amastigotes lisados/pocillo en 25  $\mu$ L de Medio Esplenocito (30 Amastigotes : 1 DC; 600.000 Amastigotes : 20.000 DC).
20. Incubar el explante sano con el cargo durante 2 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. De esta forma, se pretende que las DCs del explante sano se activen por la presencia de DAMPs y PAMPs, procedentes de las células apoptóticas y del lisado de amastigotes, respectivamente.
21. Añadir 600.000 RFU/pocillo del explante de bazo infectado en 100  $\mu$ L de Medio Esplenocito sobre el explante de bazo sano activado.
22. Incubar a 37°C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> durante 5-6 d.
21. Medir la fluorescencia con el sistema de imagen Odyssey LI-COR cada 24 h, hasta que las cuentas de fluorescencia alcancen la fase estacionaria.
22. Calcular % viabilidad mediante la fórmula:

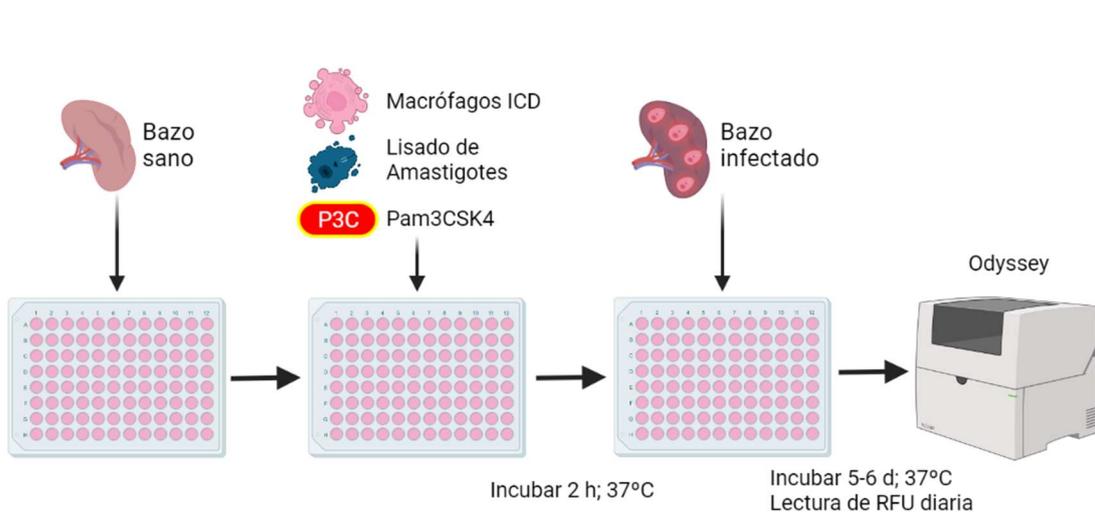
$$\% \text{ Viabilidad} = \left( \frac{\text{RFU Tratado}}{\text{RFU No Tratado}} \right) \times 100$$

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

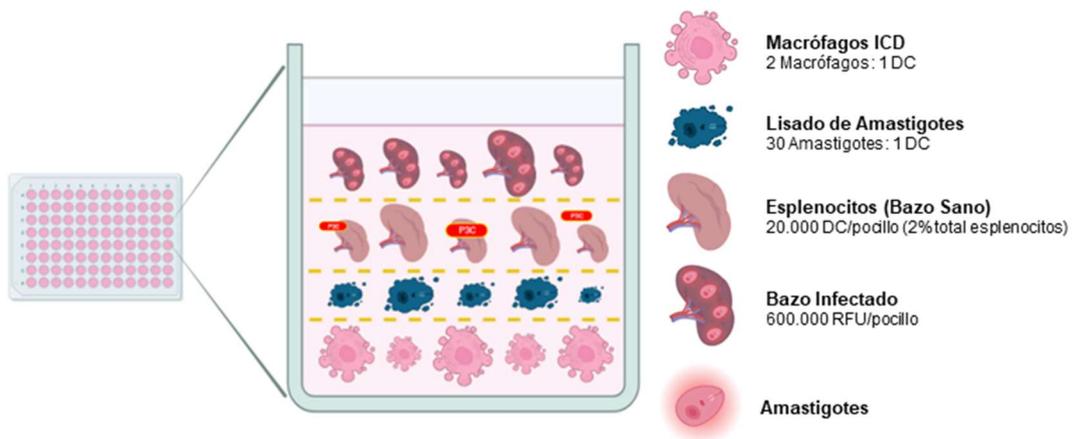
#### 3.2.2.3. ANEXO II.



**FIGURA 41 | Esquema del porcentaje teórico de las poblaciones de DCs y células T presentes en un bazo sano de ratón.**



**FIGURA 42 | Esquema del procedimiento de trabajo para la realización del co-explante.**



**FIGURA 43 | Esquema del contenido de un pocillo en el experimento del co-explante.** Se muestran las relaciones de los diferentes tipos de células empleadas en el experimento.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**TABLA 5 | Reactivos.**

	Distribuidor	Referencia
<b>Reactivos</b>		
Collagenase D	Roche	11088866001
Pam3CSK4	InvivoGen	TLRL-PMS
<b>Equipos</b>		
Odyssey M Imaging System	LI-COR	

**TABLA 6 | Medios de cultivo.**

<b>Tampón de Colagenasa (pH 7.4)</b>		<b>Medio Esplenocito (pH 7.2)</b>	
HEPES pH 7.4	10 mM	RPMI 1640	1 Litro 10,43 g
NaCl	150 mM	NaHCO <sub>3</sub>	24 mM
KCl	5 mM	L-Glutamina	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	Mezcla de Antibióticos	5 mL
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM	HEPES	25 mM
<b>Tampón de Lisis (pH 7.2)</b>	<b>1 Litro</b>	1x RPMI AA	20 mL
NH <sub>4</sub> Cl	8,025 g	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>	10 mL
KHCO <sub>3</sub>	0,1 g	FBS	20% (v/v)
EDTA	0,037 g		
<b>Medio Amastigote (pH 5.5)</b>			
KCl	15 mM		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136 mM		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	10 mM		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 mM		
NaHCO <sub>3</sub>	24 mM		
Glucosa	22 mM		
Glutamina	1 mM		
RPMI 1640 Vitamin Mix	1X		
Ácido Fólico	10 µM		
Adenosina	100 µM		
RPMI Amino Acid Mix	1X		
Hemina	5 µg/mL		
Mezcla de Antibióticos	5 mL		
MES	25 mM		
FBS	20% (v/v)		

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.3. DISEÑO DE LA CEPA *L. infantum* 2713 HASPB:OVA

La transfección es la internalización de ADN en el núcleo de células vivas (Keller et al., 2019). Recientemente, los protozoos han surgido como organismos de interés para la expresión heteróloga de proteínas eucariotas con sus correspondientes modificaciones post-traduccionales (Breitling et al., 2002; Basile & Peticca, 2009; Niimi, 2012; Jones, 2015; Legastelois et al., 2017). La evolución de los métodos de cultivo y la manipulación genética, así como el desarrollo de las técnicas de transfección ha hecho capaz la creación de un sistema de expresión denominado LEXSY (*L. expression system*, Jena Bioscience) (Basile & Peticca, 2009; Taheri et al., 2016).

Nuestro objetivo fue la transfección del protozoo unicelular *L. infantum* con el plásmido pLEXSY-hyg2.1 (**FIGURA 44**) sintetizado por la empresa GeneCust, el cual contiene la secuencia de la proteína de fusión HASPB:OVA y la higromicina como antibiótico de selección.

##### 3.2.3.1. Generación de células competentes de *Escherichia coli*

La transferencia de ADN en *E. coli* fue demostrada por primera vez por Mandel & Higa en 1970, los cuales informaron de que ADN bacteriófago podía ser transfectado dentro de células eucariotas (Mandel & Higa, 1970). La transfección ocurre cuando células y ADN son combinados en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a 0°C, seguido de una rampa ascendente de temperaturas (de 37 a 42°C) (Hanahan, 1983).

El método empleado está basado en el protocolo descrito por Inoue et al., 1990 y en el método de cloruro de rubidio (Hanahan, 1983; Inoue et al., 1990). Con ellos se consigue una alta eficiencia de transformación (hasta  $5 \times 10^8$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN).

La temperatura y agitación a las cuales crece el cultivo es de 18°C y 200 rpm. La aireación del cultivo debe mantenerse siempre con una relación 1/10 entre el medio y la capacidad del matraz.

1. Crecer *E. coli* en medio LB para obtener un cultivo fresco. Plaques en LB.
2. Crecer durante toda la noche un preinóculo en medio SOC a 37°C.

3. Inocular 1% de preinóculo en medio SOC (0,5 mL para 50 mL de medio SOC en un matraz de 500 mL). Crecer en agitación (200 rpm) a 18°C.
4. Una vez que el cultivo alcanza una  $\text{OD}_{600}$  de 0.2 (24-27 h), colocar el matraz en hielo durante 10 min. A partir de este momento trabajar en cámara fría, manteniendo las células siempre a una temperatura de 4°C.
5. Centrifugar a 3.000 rpm durante 10 min a 4°C.
6. Eliminar el medio y resuspender suavemente (sin agitación) las células en 80 mL de TB frío. Dejar 10 min en hielo.
7. Centrifugar 10 min a 3.000 rpm a 4°C.
8. Eliminar el medio y resuspender suavemente (sin agitación) en 20 mL de TB frío. Añadir DMSO al 7% (v/v). Agitar suavemente y dejar 10 min en hielo.
9. Alicuotar las células en microtubos de 1,5 mL. Congelar inmediatamente en  $\text{N}_2$  líquido. Almacenar los viales con las células competentes a -80°C.

##### 3.2.3.2. Transformación de *E. coli* con el plásmido pLEXSY-hyg2.1 HASPB:OVA

Las condiciones anteriores proporcionan la inducción de un estado de competencia para la toma de ADN (Hanahan, 1983), haciendo así posible su aplicación en la transformación genética de las bacterias *E. coli*.

1. Añadir 2  $\mu\text{L}$  de ADN (plásmido) + 150  $\mu\text{L}$  de *E. coli* competentes.
2. Incubar en hielo 15-20 min.
3. Colocar las células a 42°C durante 45 s.
4. Colocar 2 min en hielo.
5. Añadir 800  $\mu\text{L}$  de Medio SOC precalentado a 37°C.
6. Incubar 1 h a 37°C.
7. Centrifugar 5 min a 10.000 rpm.
8. Retirar parte del sobrenadante, dejando unos 100-300  $\mu\text{L}$  en el tubo.
9. Resuspender el pellet y añadir todo el contenido del tubo a una placa de LB + ampicilina precalentada a 37°C.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

10. Sembrar la placa (siembra en superficie).
11. Dejar secar al lado del mechero, dejando la placa sin tapar completamente para evitar la condensación.
12. Incubar a 37°C durante toda la noche.

#### 3.2.3.3. Aislamiento del plásmido pLEXY-hyg2.1 HASPB:OVA

Una vez que las bacterias han sido transformadas con el plásmido pLEXY-hyg2.1 HASPB:OVA, este vector debe ser aislado para su posterior uso:

1. Añadir 3 mL de Medio LB + 60 µg/mL de ampicilina a un tubo de 50 mL.
2. Seleccionar una colonia aislada y picarla con una punta P200 y dejar la punta metida dentro del tubo de 50 mL.
3. Incubar hasta el día siguiente en agitación a 200 rpm, 37°C.
4. Si las bacterias han crecido correctamente, el medio de cultivo habrá adquirido turbidez. Si esto ha ocurrido, añadir los 3 mL de cultivo a 100 mL de cultivo LB + ampicilina.
5. Incubar hasta el día siguiente en agitación a 200 rpm, 37°C.
6. Llevar a cabo el aislamiento del plásmido mediante el Kit comercial QIAGEN Plasmid Maxi, siguiendo las instrucciones del fabricante:
  - 6.1. Recoger las bacterias tras haber sido cultivadas durante toda la noche y centrifugarlas a 6.000 x g durante 15 min a 4°C.
  - 6.2. Resuspender el pellet de bacterias en 10 mL de tampón P1.
  - 6.3. Añadir 10 mL de tampón P2, mezclar vigorosamente invirtiendo el tubo entre cuatro y seis veces, e incubar a RT durante 5 min. Al usar el reactivo LyseBlue, la solución adquirirá un color azul.
  - 6.4. Añadir 10 mL del tampón P3 preenfriado a 4°C, mezclar vigorosamente invirtiendo el tubo de cuatro a seis veces. Incubar en hielo durante 20 min. Al usar el reactivo LyseBlue, al mezclar la solución quedará sin color.

- 6.5. Centrifugar a  $\geq 20.000$  x g durante 30 min a 4°C. Volver a centrifugar el sobrenadante a  $\geq 20.000$  x g durante 15 min a 4°C.
  - 6.6. Equilibrar la columna QIAGEN-tip 500 añadiendo 10 mL de tampón QBT y permitir que la columna se vacíe por gravedad.
  - 6.7. Añadir el sobrenadante del Paso 6.5 a la columna QIAGEN-tip y permitir que entre en la resina por gravedad.
  - 6.8. Lavar la columna QIAGEN-tip dos veces con 30 mL de tampón QC. Permitir que el tampón se mueva a través de la columna por gravedad.
  - 6.9. Eluir el ADN con 15 mL de tampón QF en un tubo limpio de 50 mL.
  - 6.10. Precipitar el ADN añadiendo 10,5 mL (0,7 vol.) de Isopropanol al ADN eluido y mezclar. Centrifugar a  $\geq 15.000$  x g durante 30 min a 4°C. Decantar el sobrenadante con cuidado.
  - 6.11. Lavar el pellet de ADN con 5 mL de etanol al 70% y centrifugar a  $\geq 15.000$  x g durante 10 min. Decantar el sobrenadante con cuidado.
  - 6.12. Dejar secar el pellet al aire durante 5-10 min y resuspender el ADN en un volumen apropiado de tampón.
7. Cuantificación del ADN extraído.

#### 3.2.3.4. Linearización del plásmido pLEXY-hyg2.1 HASPB:OVA

Para que el plásmido pueda ser insertado en el genoma de *Leishmania*, es necesario linealizarlo mediante una digestión enzimática empleando enzimas de restricción:

1. Mezclar 60 µg de ADN plasmídico con Tampón Fast Digest 10X y ajustar el volumen añadiendo H<sub>2</sub>O hasta alcanzar un volumen final de 250 µL.
2. Añadir 1,5 µL de la enzima de restricción Swa I (*Smi* I).
3. Incubar a 37°C durante 20 min.
4. Añadir de nuevo 1,5 µL de Swa I.
5. Incubar de nuevo a 37°C durante 20 min.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

6. Incubar durante 15 min a 65°C para detener la reacción.
7. Realizar una electroforesis en gel de agarosa del 0,7% (p/v) en H<sub>2</sub>O para poder extraer la banda de interés correspondiente al fragmento de plásmido linealizado. Tras el tratamiento con la enzima *Smi I*, el plásmido pLEXY tendrá un tamaño de 6.971 pares de bases (bp) (antes 9.831 bp).
8. Para poder extraer el ADN del gel de agarosa, llevar a cabo el protocolo descrito en el kit Extract Me DNA Clean-Up & Gel-Out Blirt, siguiendo las instrucciones del fabricante:
  - 8.1. Extraer la banda del agar y colocarla sobre un tubo.
  - 8.2. Añadir 3 vol. de tampón PS por cada 100 mg de agar. Incubar a 37°C hasta que el agar se haya disuelto.
  - 8.3. Atemperar a RT durante 20 min.
  - 8.4. Equilibrar la columna con 500 µL de tampón BL y centrifugar a 13.300 rpm durante 1 min. Eliminar el flujo recogido en el tubo colector y volver a colocar la columna en el mismo.
  - 8.5. Añadir el ADN a la columna en fracciones de 700 µL. Hacer pasar cada muestra de 700 µL dos veces por la columna.
  - 8.6. Una vez que hemos centrifugado toda la muestra, añadimos 700 µL de tampón PW, e incubamos 5 min para eliminar todas las sales.
  - 8.7. Centrifugar 1 min a 13.300 rpm. Descartar el flujo recogido en el tubo colector.
  - 8.8. Añadir 500 µL de tampón PW y centrifugar 1 min a 13.300 rpm. Descartar el flujo recogido en el tubo colector.
  - 8.9. Colocar la columna sobre un tubo nuevo y centrifugar 5 min a 13.300 rpm. Descartar el tubo y colocar otro tubo nuevo.
  - 8.10. Centrifugar 5 min a 13.300 rpm y descartar el tubo.
  - 8.11. Colocar la columna sobre un tubo nuevo y eluir el ADN con 30 µL de H<sub>2</sub>O.
  - 8.12. Incubar durante 2 min y centrifugar 1 min a 13.300 rpm.
  - 8.13. Recoger el ADN eluido y volver a hacerlo pasar por la columna una segunda vez.

8.14. Incubar durante 2 min y centrifugar 1 min a 13.300 rpm.

8.15. Repetir el *Paso 8.13* y *8.14*.

8.16. Guardar la muestra de ADN eluida y cuantificar la cantidad de ADN.

#### 3.2.3.5. Transfección de cepas de *Leishmania* con el plásmido pLEXY-hyg2.1 HASPB:OVA

Tras haber linealizado el fragmento de ADN de interés que contiene la secuencia que codifica para nuestra proteína de interés HASPB:OVA, se lleva a cabo la electroporación de las cepas de *Leishmania* (**FIGURA 45**).

1. Realizar cultivos de promastigotes rutinariamente hasta conseguir que, tras 24 h de incubación a 26°C, el cultivo alcance 5x10<sup>6</sup> parásitos/mL a partir de 10<sup>6</sup> parásitos/mL. El medio de cultivo utilizado para las cepas de *L. infantum* es el Medio M199.
2. Centrifugar los promastigotes a 3.500 rpm, 10 min. Conservar el sobrenadante, ya que se utilizará en un paso posterior.
3. Lavar dos veces con tampón Cytomix.
4. Descongelar en hielo el ADN linealizado.
5. Una vez que hemos hecho el segundo lavado con Cytomix, el pellet se resuspende en 450 µL de Cytomix.
6. Mezclar los promastigotes con 5 µg del ADN de interés y colocarlos en una cubeta de electroporación.
7. Electroporar los promastigotes con 1.5 V y 25 F de capacitancia.
8. Una vez realizada la electroporación, colocar rápidamente nuestra muestra en un corning que contiene el medio de cultivo recogido en el *Paso 2*.
9. Incubar durante 24 h a 26°C en agitación.
10. Centrifugar los promastigotes a 3.500 rpm, 10 min y resuspender el pellet en medio de cultivo fresco que contenga el antibiótico de selección correspondiente al ADN de interés que hemos electroporado, en nuestro caso, higromicina (200 µg/mL).
11. Incubar a 26°C en agitación hasta que el cultivo progrese.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

12. Realizar pases cada 2-3 d añadiendo de nuevo el antibiótico de selección para que los parásitos con los que se va a trabajar sean únicamente aquellos que hayan incorporado este ADN en su genoma.

#### 3.2.3.6. Microscopía confocal para la detección de la proteína OVA

*Si partimos de una muestra de parásitos:*

1. Tratar los LabTek Thermo Scientific con poli-lisina (1:5 en H<sub>2</sub>O) durante 5 min, RT.
2. Retirar poli-lisina y dejar secar durante 2 h a 80°C o incubar durante toda la noche.
3. Sembrar 4x10<sup>6</sup> parásitos/pocillo en LabTek Thermo Scientific en 300 µL de PBS.
4. Esperar 40 min para que los parásitos se adhieran al LabTek Thermo Scientific gracias a la poli-lisina.
5. Retirar PBS.

\*Para la diferenciación de promastigotes a amastigotes, se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.2.2.1.

*Si partimos de una muestra de BMDM:*

1. Esterilizar cubres redondos en etanol al 70% durante 5 min y dejar secar.
2. Colocar los cubres esterilizados en los pocillos de una placa de 24 pocillos sin tratar.
3. Sembrar 200.000 células/pocillo en 500 µL de medio y esperar 3-4 h a que se adhieran a los cubres.
4. Infectar las células con los parásitos con un ratio de 10:1 (parásitos:célula) añadiendo 1 mL medio/pocillo.
5. Centrifugar la placa a 330 x g, 5 min.
6. Incubar durante 2 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
7. Retirar el medio de cultivo y realizar entre tres y seis lavados para retirar los parásitos que no han sido internalizados.
8. Añadir 1 mL de medio/pocillo y dejar incubando durante 48-72 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Una vez que se ha preparado la muestra, el proceso es el siguiente:

1. Fijar con PFA al 4% durante 20 min a RT.
2. Retirar el PFA y lavar una vez con PBS.
3. En el caso de los macrófagos infectados, permeabilizar con Inside Perm del Kit Inside Stain Miltenyi Biotec durante 5-7 min a RT.
4. Retirar el permeabilizador y lavar una vez con PBS.
5. Para reducir la autofluorescencia de las células, tratar con glicina 0,1 M (en PBS) durante 20 min, RT.
6. Retirar la glicina y lavar una vez con PBS.
7. Bloquear con caseína al 0,1% (p/v) en PBS (solución de bloqueo) durante 20 min, RT.
8. Retirar la caseína.
9. Incubar con el anticuerpo 1° (disuelto en solución de bloqueo) durante 1h, RT.
  - a. Anti-OVA conjugado con FITC (1:500).
10. Retirar el anticuerpo 1° y lavar tres veces con PBS.
11. Teñir con DAPI (1:1000 en diH<sub>2</sub>O) durante 5 min, RT.
12. Lavar una vez con PBS.
13. Dejar secar los cubres/LabTek (grosor de #1) Thermo Scientific.
14. Montaje de cubres/LabTek con el medio de montaje Antifade.
15. Dejar secar toda la noche a RT y tomar las fotografías con el microscopio confocal LSM800 Zeiss.

#### 3.2.3.7. Western blot de fluorescencia de extractos de *Leishmania*

Para comprobar la expresión de la proteína OVA en la cepa *L. infantum* transfectada con el plásmido pLEXY-hyg2.1 HASPB:OVA, se llevó a cabo su inmunodetección mediante la técnica de Western blot.

##### A. Preparación de lisados de *Leishmania*

1. Tras 3-4 d de cultivo, los promastigotes se recogen por centrifugación. El pellet se resuspende en 100 µL de PBS.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

2. Sonicar los parásitos en hielo durante 25 min con el sonicador U50 Control IKA LaborTechnik, haciendo ciclos de 30 s de sonicación y 30 s de descanso, con un 60% de amplitud, 1 ciclo.
3. Centrifugar a 6.000 x g durante 10 min.
4. Recoger el sobrenadante a un nuevo tubo y resuspender el pellet (lisado) en 100 µL de PBS.
5. Cuantificar la proteína con el kit BCA Pierce Thermo Scientific, siguiendo las instrucciones del fabricante.
  - 5.1. Preparar las diferentes diluciones estándar para elaborar la recta patrón (2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250, 125, 25 y 0 - *blanco* - µg/mL).
  - 5.2. Pipetear 25 µL/pocillo de cada dilución estándar y de la muestra desconocida en una placa de 96 pocillos (rango de trabajo = 20-2.000 µg/mL). Si el tamaño de muestra es limitado, pueden usarse 10 µL/pocillo de las diluciones estándar y de la muestra (Rango de trabajo = 125-2.000 µg/mL).
  - 5.3. Preparar el BCA Working Reagent (WR) mezclando 50 partes del BCA Reagent A con 1 parte del BCA Reagent B (50:1; Reagent A:B).
  - 5.4. Añadir 200 µL/pocillo del WR y mezclar en un agitador de placas durante 30 s.
  - 5.5. Cubrir la placa e incubar a 37°C durante 30 min.
  - 5.6. Dejar que la placa se enfríe a RT.
  - 5.7. Medir la absorbancia a 562 nm en el lector de placas Varioskan LUX Thermo Scientific.
6. Almacenar tanto los sobrenadantes como los lisados a -20°C hasta su uso.

#### B. Electroforesis en gel

1. Preparar las muestras añadiendo 20 ng de proteína procedente del sobrenadante y del lisado de promastigotes, tampón de carga 4X y H<sub>2</sub>O hasta obtener un volumen final de 20 µL. Como control *positivo*, se añadió 1 µg de OVA.
2. Hervir las muestras 5 min a 95°C.

3. Cargar las muestras en un gel de agarosa del 12% (p/v) en H<sub>2</sub>O y 3 µL de la escalera PageRuler Prestained NIR Protein Ladder.
4. Realizar la electroforesis del gel a 200 V durante, aproximadamente, 30 min.

#### C. Transferencia gel-membrana

1. Equilibrar la membrana Immobilon-FL PVDF en metanol 100% durante 15 s.
2. Equilibrar la membrana, el gel, las esponjas y los papeles en el Tampón de Transferencia.
3. Preparar el cassette y colocarlo en la cubeta donde se lleva a cabo la transferencia y rellenar con el Tampón de Transferencia.
4. Realizar la transferencia a 12 V, durante 18 h, a 4°C.

#### D. Bloqueo e incubación con anticuerpos

1. Sumergir la membrana en PBS durante 5 min, RT, en agitación.
2. Retirar el PBS y añadir 25 mL de la Solución de Bloqueo durante 1 h, RT, en agitación.
3. Preparar el anticuerpo 1º Anti-OVA Mouse Anti-Chicken (1:500) en la Solución de Bloqueo e incubar durante 1 h, RT, en agitación.
4. Retirar el anticuerpo 1º y realizar un primer lavado con PBS + Tween20 al 0,1% (v/v) durante 15 min.
5. Realizar dos lavados más de 5 min cada uno con PBS + Tween20 al 0,1% (v/v).
6. Preparar el anticuerpo 2º anti-Mouse IRDye 800 (1:15.000) en la Solución de Bloqueo e incubar durante 1 h a RT, en agitación.
7. Retirar el anticuerpo 2º y realizar un primer lavado con PBS + Tween20 al 0,1% (v/v) durante 15 min.
8. Realizar dos lavados más de 5 min cada uno con PBS + Tween20 al 0,1% (v/v).

#### E. Inmunodetección

1. Revelado de la membrana con el sistema de imagen Odyssey LI-COR.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.3.8. ANEXO III.

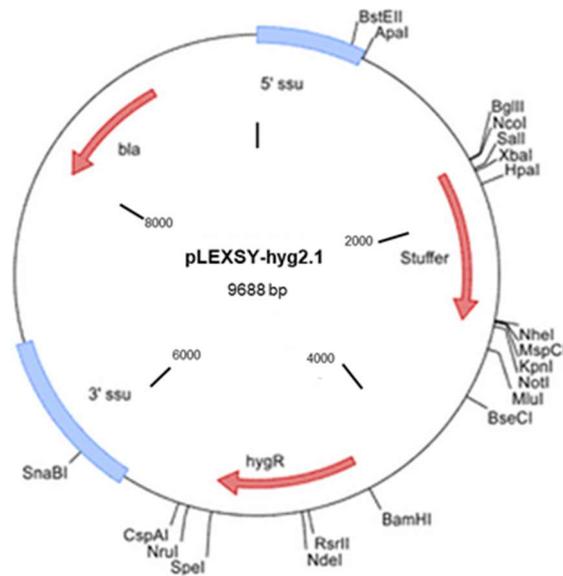


FIGURA 44 | Vector pLEXSY-hyg2.1. Imagen modificada de Jena Bioscience, 2023.

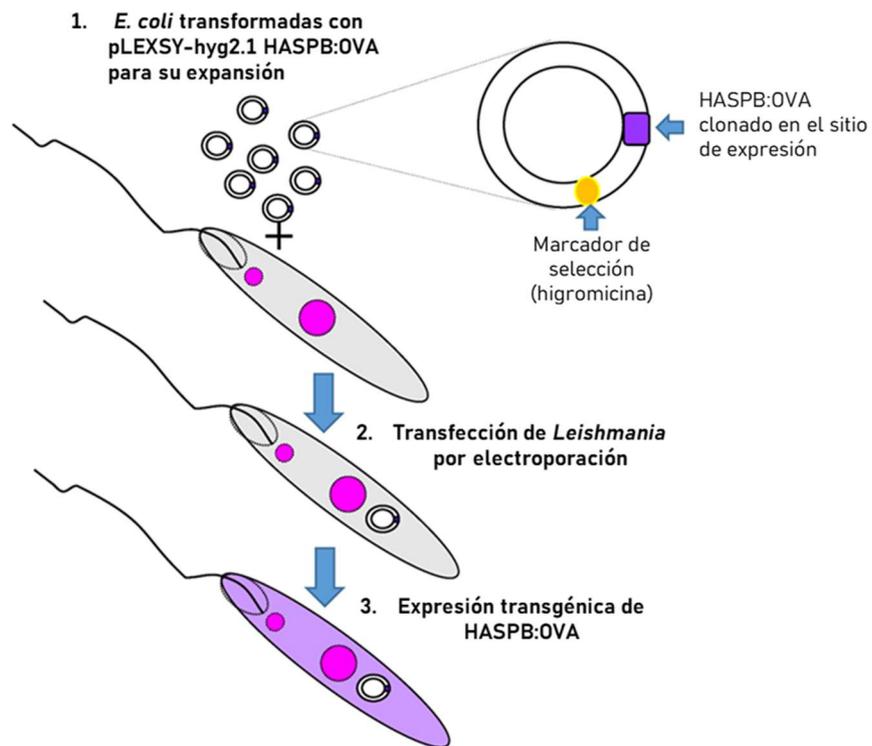


FIGURA 45 | Proceso de transfección de *Leishmania* con el vector pLEXSY-hyg2.1 HASPB:OVA. Imagen modificada de (Chang et al., 2022).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

TABLA 7 | Reactivos.

	Distribuidor	Referencia	Protocolo
<b>Antibióticos</b>			
Ampicilina	Sigma Aldrich	A9518-25G	Células competentes de <i>E. coli</i> Transformación de <i>E. coli</i>
Higromicina B	Corning	30-240-CR	Transfección de <i>Leishmania</i>
<b>Reactivos comerciales</b>			
Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12162	Aislamiento <i>pLEXSY-hyg2.1</i> HASPB:OVA
Extract Me DNA Clean-Up & Gel-Out	Blirt	EM26.1-250	Aislamiento <i>pLEXSY-hyg2.1</i> HASPB:OVA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23225	Western Blot
<b>Anticuerpos</b>			
Anti-OVA Host: Rat; Reactivity: Chicken	Antibodies-online	ABIN400507	Microscopía confocal
Rabbit anti-Rat IgG (H+L) Secondary Antibody, FITC	Invitrogen	A18916	Microscopía confocal
Monoclonal Anti-OVA antibody produced in mouse	Sigma Aldrich	SAB5300165	Western Blot
IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody	LI-COR	926-32210	Western Blot
<b>Reactivos activos</b>			
Fast Digest Smi I	Thermo Scientific	FD1244	Aislamiento <i>pLEXSY-hyg2.1</i> HASPB:OVA
10X Fast Digest Buffer	Thermo Scientific	FD1244	Aislamiento <i>pLEXSY-hyg2.1</i> HASPB:OVA
Schneider's Insect Media	Sigma Aldrich	S9895	Diferenciación Amastigotes
Poly-L-lysine solution	Sigma Aldrich	25988-63-0	Microscopía confocal
Inside Stain Kit (Inside Fix)	Miltenyi Biotec	130-090-477	Microscopía confocal
Inside Stain Kit (Inside Perm)	Miltenyi Biotec	130-090-477	Microscopía confocal
ProLong Diamond Antifade Mountant	Invitrogen	P36961	Microscopía confocal
PageRuler™ Prestained NIR Protein Ladder	Thermo Scientific	26635	Western Blot
<b>Fungible</b>			
Sistema dNunc Lab-Tek II Chamber Slide	Thermo Scientific	16260661	Microscopía confocal
<b>Equipos</b>			
Microscopio Confocal LSM800	ZEISS		Microscopía confocal
Sonicador U50 Control	IKA LaborTechnik		Western Blot
Varioskan LUX Plate Reader	Thermo Scientific		Western Blot
Odyssey M Imaging System	LI-COR		Western Blot

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**TABLA 8 | Medios de cultivo.**

<b>Medio LB (pH 7)</b>		<b>PBS (pH 7.2)</b>	
Triptona	10 g/L	NaCl	8 g/L
Extracto de levadura	5 g/L	KCl	0,2 g/L
NaCl	10 g/L	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,42 g/L
Agar	15 g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27 g/L
<b>Medio SOC (pH 7)</b>		<b>Medio Schneider (pH 7)</b>	
	<b>1 Litro</b>		<b>1 Litro</b>
Triptona	20 g	Schneider Medium	24.5 g
Extracto de levadura	5 g	Bicarbonato Sódico	0.4 g
NaCl	0.5 g	Cloruro Cálculo	0.6 g
Glucosa 50%	88 mL	FBS	20% (v/v)
MgCl <sub>2</sub>	2 M	<b>Medio Amastigote (pH 5.5)</b>	
KCl	250 mM	KCl	15 mM
<b>Tampón TB (pH 6.7):</b>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136 mM
PIPES	10 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	15 mM	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 mM
KCl	250 mM	NaHCO <sub>3</sub>	24 mM
KOH	1 M	Glucosa	22 mM
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10,9 g/L	Glutamina	1 mM
<b>Medio M199 (pH 6.9)</b>		RPMI 1640 Vitamin Mix	1X
	<b>1 Litro</b>	Ácido Fólico	10 µM
5X Medium 199 M3274	200 mL	Adenosina	100 µM
HEPES	1 M	RPMI Amino Acid Mix	1X
Mezcla de Antibióticos	5 mL	Hemina	5 µg/mL
Glutamina 100X	200 mM	Mezcla de Antibióticos	5 mL
RPMI 1649 Vitamin Mix	10 mL	MES	25 mM
Ácido Fólico	10 mg/mL	FBS	20% (v/v)
Adenosine 250	25 mM	<b>Tampón de Transferencia</b>	
Hemina 1000X	5 mg/mL	Glicina	192 mM
FBS	100 mL	Tris	20 mM
Milli-Q	640 mL	Metanol	10% (v/v)
<b>Tampón Cytomix (pH 7.6)</b>		<b>Solución de Bloqueo</b>	
			<b>1 Litro</b>
KCl	120 mM	PBS 1X	50 mL
CaCl <sub>2</sub>	0.15 mM	H <sub>2</sub> O	50 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM	Caseína	0,1 g/L
HEPES	25 mM		
EDTA	2 mM		
MgCl <sub>2</sub>	5 mM		

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.4. MEDICIÓN DE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS RAW 264.7 TRAS EL TRATAMIENTO CON RADIACIÓN UV

Un método muy utilizado para medir la muerte celular en una población de células es el uso conjunto de la unión de la Anexina-V, junto con la captación de yoduro de propidio (IP) y la citometría de flujo. La Anexina-V es una proteína que se une a la fosfatidilserina de la superficie celular durante las primeras etapas de la apoptosis (van Engeland et al., 1998; Crowley et al., 2016). IP es un colorante rojo fluorescente que es permeable únicamente en las células muertas. IP es impermeable a las células con la membrana plasmática intacta, pero cuando la integridad de la membrana se ve comprometida, es capaz de difundir al interior del núcleo y unirse al ADN, traduciéndose en un núcleo altamente fluorescente. La citometría de flujo nos permite analizar las poblaciones de células en función de su unión a Anexina-V y IP. Combinando estas técnicas, nos permite llevar a cabo la detección y cuantificación simultáneas de células apoptóticas y necróticas de una muestra (Atale et al., 2014; Crowley et al., 2016).

Al enfrentar IP y Anexina-V, podemos diferenciar tres poblaciones diferentes (**FIGURA 46**) (van Engeland et al., 1998).

El primer objetivo fue establecer la cantidad de energía necesaria de radiación ultravioleta (UV) para producir apoptosis en macrófagos murinos RAW 264.7. El siguiente objetivo se basó en determinar si la infección de RAW 264.7 con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA retrasa la apoptosis, en comparación con macrófagos sin infectar.

##### 3.2.4.1. Cultivo e infección de macrófagos RAW 264.7

1. Sembrar las células RAW 264.7 en placas de 24 pocillos sin tratar a una densidad de 300.000 células/pocillo en un volumen de 1 mL/pocillo de Medio RAW 264.7.
  - Preparar 2 réplicas por cada condición.
  - Preparar una placa diferente para cada valor de energía.

2. Incubar durante 24 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. En el caso de los pocillos que van a ser infectados con *Leishmania*, esperar 3-4 h a que las células se adhieran. Posteriormente, añadir los parásitos con un MOI = 10:1 (3x10<sup>6</sup> parásitos/pocillo) e incubar durante 2 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Retirar la infección realizando tres lavados con PBS para eliminar los parásitos que no hayan sido internalizados, añadir 1 mL/pocillo de Medio RAW 264.7 e incubar durante 24 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

##### 3.2.4.2. Irradiación de macrófagos RAW 264.7 con UV

Esterilizar previamente el UV Crosslinker Model UVC500 Hoefer con el máximo de energía posible para que esté estéril a la hora de introducir las placas con nuestras células.

Una de las placas no será sometida a radiación y se reservará para usarse como control *negativo*.

Para las placas que van a ser tratadas con radiación UV:

1. Retirar el medio de cultivo de los pocillos.
2. Realizar dos lavados con 1 mL/pocillo de PBS para retirar todo el rojo fenol existente en el medio de cultivo, ya que interfiere con la radiación UV.
3. Colocar 100 µL/pocillo de PBS, para evitar la desecación de las células durante el tratamiento con UV.
4. Irradiar cada placa con la energía correspondiente (mJ/cm<sup>2</sup>).
5. Añadir 900 µL de Medio RAW 264.7 (Volumen final = 1 mL/pocillo).
6. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 4 o 24 h.

##### 3.2.4.3. Citometría de flujo

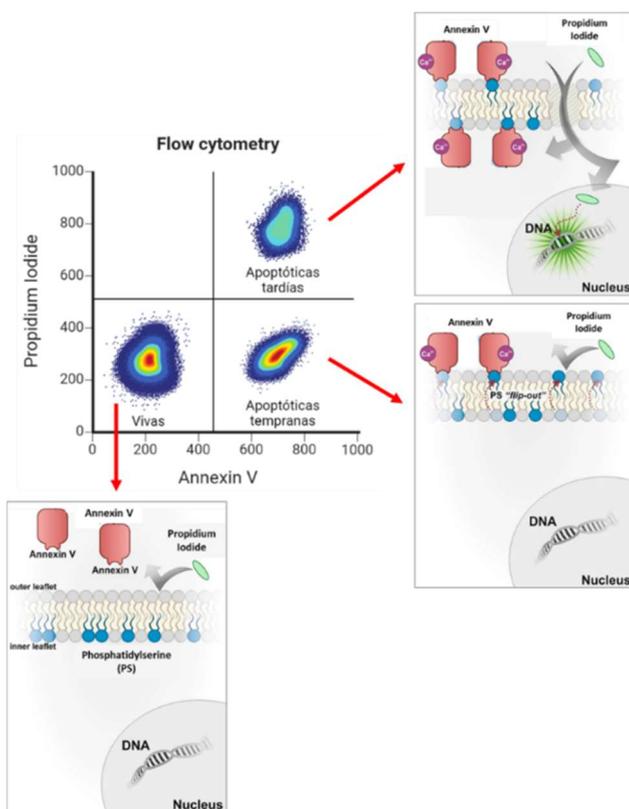
1. Retirar el medio de cultivo de los pocillos.
2. Añadir 500 µL/pocillo de PBS-EDTA 10 mM e incubar durante 7 min a 37°C, para liberar las células de la superficie del cultivo.
3. Recoger los 500 µL de PBS-EDTA con nuestras células a su tubo correspondiente.
4. Con 1 mL de PBS, pipetear en el pocillo para levantar las células que hayan quedado adheridas y añadirlo al tubo

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

- correspondiente, junto con los 500  $\mu\text{L}$  del paso previo (Volumen final = 1,5 mL).
5. Centrifugar 10 min, 3.400 rpm, 4°C.
  6. Retirar el sobrenadante.
  7. En el caso del control *positivo*, resuspender el pellet en 1 mL de paraformaldehído (PFA) al 3% (v/v) en PBS e incubar en hielo durante 30 min. Tras los 30 min de incubación, centrifugar 10 min, 3.400 rpm, 4°C. Retirar el sobrenadante.
  8. Resuspender el pellet en 1 mL de PBS.
  9. Centrifugar 10 min, 3.400 rpm, 4°C. Retirar el sobrenadante.
  10. Resuspender el pellet en 1 mL de Binding Buffer.
  11. Centrifugar 10 min, 3.400 rpm, 4°C. Retirar el sobrenadante.
  12. Resuspender el pellet en 100  $\mu\text{L}$  de Binding Buffer todos los tubos. En el caso del control *negativo*, se resuspende en 400  $\mu\text{L}$  de Binding Buffer, ya que se debe repartir 100  $\mu\text{L}$  en 4 tubos:
    - 1 tubo Sin Teñir (para fijar Tamaño/Complejidad)
    - 1 tubo teñido únicamente con Anexina-V
    - 1 tubo teñido únicamente con Yoduro de Propidio (IP)
    - 1 tubo teñido con Anexina-V e IP (control *negativo*)
  13. Añadir 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Rnasa A (Stock = 3  $\text{mg}/\text{mL}$ ) a cada tubo.
  14. Añadir 5  $\mu\text{L}$  de Anexina V-FITC.
  15. Añadir 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de IP (Stock = 1  $\text{mg}/\text{mL}$ ) a cada tubo.
  16. Incubar a RT durante 15 min.
  17. Diluir con 300  $\mu\text{L}$  de PBS (Volumen final = 400  $\mu\text{L}$ ).
  18. Analizar las muestras empleando el citómetro de flujo MACSQuant Analyzer 10 Miltenyi Biotec.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.4.4. ANEXO IV.



**FIGURA 46 |** Esquema de las diferentes poblaciones que pueden ser detectadas tras la tinción con IP y Anexina-V, mostrándose los sitios de unión de cada reactivo, donde la Anexina-V se une a la fosfatidilserina y el IP al ADN. Imagen modificada de Kupcho et al. (Kupcho et al., 2019).

**TABLA 9 |** Reactivos.

	Distribuidor	Referencia	Protocolo
<b>Reactivos</b>			
Inside Stain Kit (Inside Fix)	Miltenyi Biotec	130-090-477	Citometría de flujo
FITC Annexin V	BD Pharmingen	51-65874X	Citometría de flujo
<b>Equipos</b>			
UV Crosslinker Model UVC500	Hoefer Scientific		Radiación UV RAW 264.7
MACSQuant Analyzer 10 Flow Cytometer	Miltenyi Biotec		Citometría de flujo

**TABLA 10 |** Medios de cultivo.

<b>Medio RAW 264.7</b>	<b>1 Litro</b>	<b>1X Binding Buffer:</b>	<b>1 Litro</b>
RPMI 1640	10,43 g	HEPES/NaOH, pH 7.4	10 mM
NaHCO <sub>3</sub>	24 mM	NaCl	140 mM
HEPES	25 mM	CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM
Mezcla de Antibióticos	5 mL		
L-Glutamina	2 mM		
FBS	10% (v/v)		

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.5. CUANTIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN DE RAW 264.7 IRRADIADAS CON UV

Una vez que las células RAW 264.7 eran irradiadas con UV, se llevó a cabo la cuantificación del porcentaje de infección.

1. Sembrar las células RAW 264.7 en placas de 24 pocillos sin tratar a una densidad de 300.000 células/pocillo en un volumen de 1 mL/pocillo de Medio RAW 264.7.
2. Incubar durante 24 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. En el caso de los pocillos que van a ser infectados con *L. infantum* mCherry-HASPB:OVA, esperar 3-4 h a que las células se adhieran. Posteriormente, añadir los parásitos con un MOI = 10:1 (3x10<sup>6</sup> parásitos/pocillo) e incubar durante 2 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Retirar la infección realizando tres lavados con PBS para eliminar los parásitos que no hayan sido internalizados, añadir 1 mL/pocillo de Medio RAW 264.7 e incubar durante 24 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
3. Realizar la irradiación UV de las células. Esterilizar el UV Crosslinker Model UVC500 Hoefer con el máximo de energía posible para que esté estéril a la hora de introducir las placas con nuestras células. Una de las placas no será sometida a radiación y se reservará para usarse como control *negativo*.
4. Retirar el medio de cultivo de los pocillos.
5. Realizar dos lavados con 1 mL/pocillo de PBS para retirar todo el rojo fenol existente en el medio de cultivo, ya que interfiere con la radiación UV.
6. Colocar 100 µL/pocillo de PBS, para evitar la desecación de las células durante el tratamiento con UV.
7. Irradiar cada placa con 500 mJ/cm<sup>2</sup>.
8. Añadir 900 µL de Medio RAW 264.7.
9. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 4 o 24 h.
10. Retirar el medio de cultivo de los pocillos y añadir 500 µL/pocillo de PBS-EDTA 10 mM para ayudar que las células se despeguen de la superficie de los pocillos e incubar durante 7 min a 37°C.
11. Recoger las células a un tubo y, con ayuda de 1 mL de PBS, pipetear arriba y abajo para levantar las células que hayan quedado adheridas al pocillo y recogerlas al mismo tubo.
12. Centrifugar 10 min, 3.400 rpm, 4°C, retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 400 µL de PBS.
13. Analizar las muestras empleando el citómetro de flujo MACSQuant Analyzer 10 Miltenyi Biotec.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.5.1. ANEXO V.

TABLA 11 | Reactivos.

	Distribuidor	Protocolo
<b>Equipos</b>		
UV Crosslinker Model UVC500	Hoefer Scientific	<i>Radiación UV de macrófagos RAW 264.7</i>
MACSQuant Analyzer 10 Flow Cytometer	Miltenyi Biotec	<i>Citometría de flujo</i>

TABLA 12 | Medios de cultivo.

<b>Medio RAW 264.7</b>	<i>1 Litro</i>
RPMI 1640	10,43 g
NaHCO <sub>3</sub>	24 mM
HEPES	25 mM
Mezcla de Antibióticos	5 mL
L-Glutamina	2 mM
FBS	10% (v/v)

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.6. PRESENTACIÓN CRUZADA CON CÉLULAS B3Z

Para evaluar la presentación de péptidos derivados de la OVA en el MHC I *in vitro*, se empleó el hibridoma de células T citotóxicas B3Z específico de OVA (**FIGURA 47**), cuya actividad  $\beta$ -galactosidasa se correlaciona con la presentación de péptidos derivados de OVA tras medir la absorbancia de los pocillos tras realizar la lisis celular y la adición de su sustrato, el clorofenol rojo- $\beta$ -D-galactopiranosido (CPRG) (Karttunen et al., 1992). Este experimento se realizó tanto con DCs (BMDC) como con macrófagos (BMDM) derivados de médula ósea (**FIGURA 48**).

##### 3.2.6.1. Diferenciación de BMDC con GM-CSF:

1. Obtención de progenitores de médula ósea (*apartado 3.2.1.1*).
2. Resuspender el pellet de células en 5 mL de Medio B3Z. Contar las células.
3. Sembrar  $2 \times 10^6$  células totales en 10 mL en una placa de Petri de 90 mm.
4. Añadir 20 ng/mL de GM-CSF (Factor estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos) a los 10 mL de medio.
5. Incubar a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
6. En el día 3, añadir 10 mL de Medio B3Z y 20 ng/mL de GM-CSF, sobre los 10 mL que ya teníamos.
7. En el día 6, retirar 10 mL de medio. Al no ser células adherentes, hay que centrifugar las células a 300 x g, 5 min, RT, descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 10 mL de Medio B3Z fresco + 20 ng/mL de GM-CSF.
8. En el día 7, retirar GM-CSF del medio de cultivo de las BMDCs, para que estén 18 h antes de tratarlas sin estimulante de crecimiento y se queden quiescentes. Para ello, retiramos los 20 mL de medio que tenemos, centrifugamos las células, retiramos el sobrenadante y resuspendemos el pellet en 20 mL de medio nuevo sin GM-CSF.
9. En el día 8, recoger tanto las células no adherentes como las adheridas débilmente.

10. Centrifugar 300 x g, 5 min, RT. Resuspender en Medio B3Z. Contar células.

##### 3.2.6.2. Estimulación de las BMDC con LPS

1. Preparar las BMDC a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/mL resuspendidas en Medio B3Z.
2. Sembrar 100.000 células/pocillo en un volumen de 50  $\mu$ L/pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en "U" no tratada para cultivo celular
3. Estimular las BMDC con 100 ng/mL de LPS. Dejar parte de las células sin tratar para emplearlas como control.
4. Incubar durante 16 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 3.2.6.3. Preparación de RAW 264.7 infectadas e irradiadas con UV

1. Para la infección y radiación de los macrófagos 264.7, se llevó a cabo el método descrito en los *apartados 3.2.4.1 y 3.2.4.2*.
2. Para realizar la infección de células RAW 264.7 (MOI 1:10), se emplearon amastigotes de la cepa *L. infantum* 2713 HASPB:OVA diferenciados a partir de promastigotes (*apartado 3.2.2.1*).
3. Las células RAW 264.7, se irradiaron con UV a una energía de 500 mJ/cm<sup>2</sup>.
4. Incubar durante 24 h a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 3.2.6.4. Co-cultivo de BMDC con RAW 264.7

1. Recoger las células irradiadas e infectadas, tanto en suspensión como adheridas.
2. Centrifugar 3.400 rpm, 10 min, 4°C. Descartar el sobrenadante, excepto 50  $\mu$ L, que se emplearán para resuspender el pellet de células.
3. Añadir los 50  $\mu$ L sobre los pocillos correspondientes que contienen las BMDC.
4. Incubar durante 24 h a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.6.5. Preparación de bolas recubiertas con OVA/BSA (bbOVA)

1. Se preparan bolas recubiertas con diferentes concentraciones de OVA/BSA (**TABLA 13**). Siguiendo la ficha de datos de las bolas, para 250  $\mu$ L de bolas se pueden colocar hasta 750  $\mu$ L de mezcla de proteínas (3X). Calcular el número de bolas que se van a necesitar para el experimento, sabiendo que se colocan 10  $\mu$ L de bolas/pocillo.
2. Preparar tantos tubos como condiciones. Se trabajará con una concentración total de 10 mg/mL de mezcla de proteínas por cada condición.
3. Añadir el volumen de bolas necesario a cada tubo y añadir 1,5 mL de Tampón Acetato para lavar las bolas.
4. Mezclar con vortex.
5. Centrifugar a 5.000 x g, 5 min, 4°C.
6. Retirar el sobrenadante y añadir 1,5 mL de Tampón Acetato.
7. Resuspender las bolas con vortex.
8. Centrifugar a 5.000 x g, 5 min, 4°C.
9. Retirar el sobrenadante y añadir la mezcla de proteínas OVA/BSA correspondiente.
10. Incubar las bolas con la mezcla de proteínas durante toda la noche a 4°C en agitación.

#### 3.2.6.6. Sub-cultivo de células B3Z

1. Tras alcanzar una confluencia del 80%, realizar un pase de células, sembrándolas a una densidad de  $10^6$  células/mL en Medio B3Z.
2. Incubar durante 24 h a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.6.7. Lavar bbOVA

1. Realizar tres lavados con 1 mL de PBS frío. Centrifugar los tubos a 5.500 x g durante 10 min a 4°C. Descartar el sobrenadante.
2. Resuspender las bbOVA en Medio B3Z, de tal forma que las bolas queden diluidas 1:5 (por ejemplo, si habíamos colocado 50  $\mu$ L de bolas/tubo, se añadirán 250  $\mu$ L de medio/tubo).

3. Añadir 50  $\mu$ L/pocillo de bbOVA sobre las BMDC 4 h antes de añadir las células B3Z, e incubar a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.6.8. Preparación de las diluciones de OVA soluble (sOVA)

1. Preparar las distintas concentraciones de sOVA que se emplearán para estimular las BMDC (0,5-2 mg/mL). Incluir un control *negativo* que contenga BSA (2 mg/mL).
2. Añadir 50  $\mu$ L/pocillo de sOVA sobre las BMDC 4 h antes de añadir las células B3Z, e incubar a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.6.9. Preparación de las diluciones del péptido SIINFEKL

1. Preparar las distintas concentraciones de SIINFEKL que se emplearán para estimular las BMDC (0-3 ng/mL).
2. Añadir 50  $\mu$ L/pocillo de SIINFEKL sobre las BMDC 30 min antes de añadir las células B3Z, e incubar a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.6.10. Lavar y fijar BMDC

1. Lavar las BMDC con 100  $\mu$ L/pocillo de BSA al 0,1% (p/v) en PBS en hielo.
2. Centrifugar a 800 x g, 2 min, a 4°C. Retirar el sobrenadante dándole la vuelta a la placa.
3. Hacer dos lavados más.
4. Fijar las células pipeteando con 50  $\mu$ L/pocillo de glutaraldehído al 0,008% (v/v) en PBS (PBS-GTA) e incubar 5 min en hielo.
5. Añadir 50  $\mu$ L/pocillo de 0,4 M de glicina en PBS sobre los 50  $\mu$ L de PBS-GTA.
6. Centrifugar a 800 x g, 2 min, a 4°C. Retirar el sobrenadante dándole la vuelta a la placa.
7. Añadir 100  $\mu$ L/pocillo de 0,2 M de glicina en PBS.
8. Centrifugar a 800 x g, 2 min, a 4°C. Retirar el sobrenadante dándole la vuelta a la placa.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

9. Lavar con 200  $\mu$ L/pocillo de Medio B3Z.
10. Centrifugar a 800 x g, 2 min, a 4°C. Retirar el sobrenadante dándole la vuelta a la placa.
11. Hacer un lavado más con Medio B3Z.
12. Resuspender las células fijadas en 100  $\mu$ L/pocillo de Medio B3Z.

#### 3.2.6.11. Co-cultivo de BMDC y B3Z

1. Añadir 100.000 B3Z/pocillo (relación 1 BMDC : 1 B3Z) en 100  $\mu$ L/pocillo de Medio B3Z.
2. Incubar durante 16 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.6.12. Revelar el ensayo

1. Centrifugar la placa a 800 x g, 2 min, a 4°C.
2. Lavar una vez con 100  $\mu$ L/pocillo de BSA al 0,1% (p/v) en PBS.
3. Centrifugar la placa a 800 x g, 2 min, a 4°C. Retirar el sobrenadante dándole la vuelta a la placa.
4. Incubar la placa a -20°C durante 10 min para facilitar el lisado de las células.

5. Añadir 20  $\mu$ L/pocillo de Tampón de Lisis. Asimismo, preparar unos pocillos que sirvan como *blanco* del experimento.
6. Para ello, añadir 20  $\mu$ L/pocillo de Tampón de Lisis en un par de pocillos vacíos que no contengan células.
7. Preparar una alícuota de 30 mg de CPRG. Preparar una solución CPRG 25X, añadiendo 1 mL de Tampón A al vial de 30 mg de CPRG. Mezclar por inversión.
8. Preparar una solución de CPRG 1X (5 mmol/L), añadiendo 1 parte del CPRG 25X a 24 partes de Tampón A (1:25).
9. Añadir 130  $\mu$ L/pocillo de CPRG 1X.
10. Incubar la reacción durante 30 min o más (hasta 72 h) a 37°C hasta que la muestra cambie a un color rojo oscuro.
11. Parar la reacción añadiendo 80  $\mu$ L/pocillo de Solución de Parada. Una vez añadida, el CPRG comienza a oxidarse, por lo que debe medirse dentro de las 2 h siguientes.
12. Medir la absorbancia a 575 nm con un lector de placas Varioskan LUX Thermo Scientific cada 30-60 min hasta que la reacción sature (4-6 h). Medir la absorbancia del *blanco* y sustraérselo a los valores de las muestras.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.6.13. ANEXO VI.

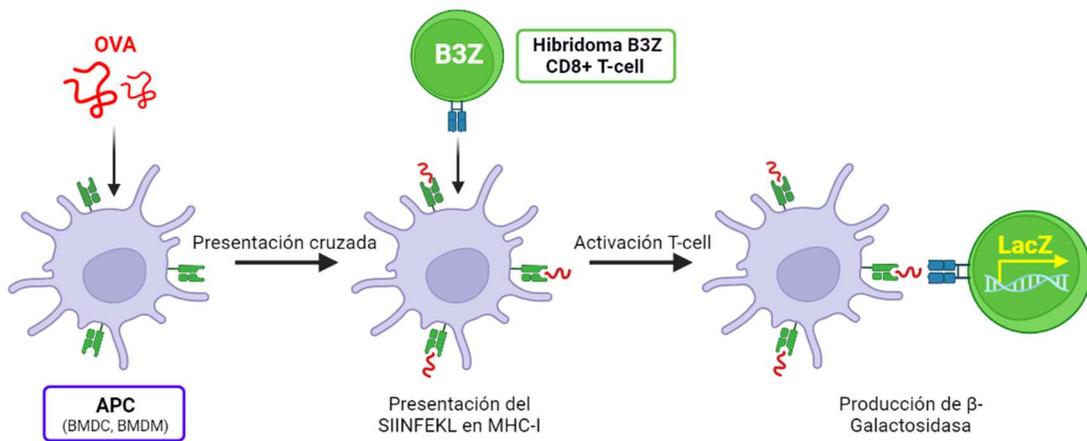


FIGURA 47 | Esquema de la presentación cruzada antigénica empleando células B3Z.

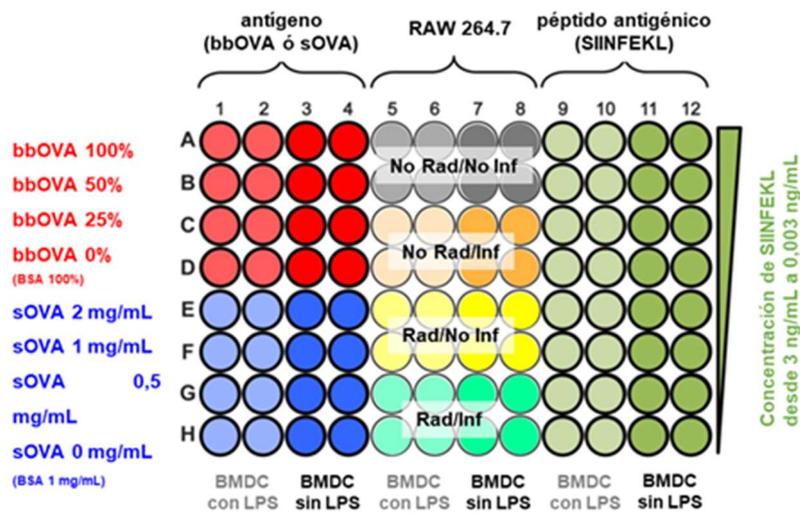


FIGURA 48 | Esquema de la placa de trabajo empleada en el experimento de presentación cruzada con células B3Z. Se obtuvieron resultados de BMDC, estimuladas o no con LPS (100 ng/mL). Asimismo, también se obtuvieron resultados co-cultivando las células B3Z con BMDM.

TABLA 13 | Concentraciones de OVA/BSA empleadas para la preparación de las bbOVA.

bbOVA		
TUBO A	100% OVA (10 mg/mL OVA)	0% BSA (0 mg/mL BSA)
TUBO B	50% OVA (5 mg/mL OVA)	50% BSA (5 mg/mL BSA)
TUBO C	25% OVA (2,5 mg/mL OVA)	75% BSA (7,5 mg/mL BSA)
TUBO D	0% OVA (0 mg/mL OVA)	100% BSA (10 mg/mL BSA)

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

TABLA 14 | Reactivos.

	Distribuidor	Referencia
<b>Reactivos</b>		
Polybead Polystyrene 3.0 Micron Microspheres 3.00 µm	Polysciences	17134-15
Ovalbumin EndoFit	InvivoGen	vac-pova-100
Ova Peptide (257-264)	GenScript	RP10611
CPRG	ChemCruz	sc-257242A
<b>Equipos</b>		
Varioskan LUX Plate Reader	Thermo Scientific	

TABLA 15 | Medios de cultivo.

<b>HBSS (pH 7.2)</b>		<i>1 Litro</i>	<b>Tampón A (pH 7.5)</b>	
NaCl	8 g		MOPS [3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid]	25 mM
KCl	0,4 g		NaCl	100 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06 g		MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Glucosa	1 g		<b>Tampón Lisis (pH 7.4)</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,06 g		Tris	0.25 M
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,20 g		NP-40	0,25% (v/v)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,185 g		EDTA	2.5 mM
NaHCO <sub>3</sub>	0,35 g		<b>Solución de Parada</b>	
<b>Medio B3Z (pH 7.2)</b>			Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.5 M
RPMI 1640	10,43 g/L		<b>Tampón Acetato</b>	
Mezcla de Antibióticos	5 mL		Ácido Acético	0.1 M
Glutamina	2 mM		Acetato Sódico	0.1 M
β-mercaptoethanol	50 µM		<b>Medio de Congelación</b>	
MEM NEAA	1X		FBS	90% (v/v)
Piruvato Sódico	100 mM		DMSO	10% (v/v)
FBS	10% (v/v)			
<b>Medio BMDM (pH 7.2)</b>		<i>1 Litro</i>		
RPMI 1640	10,43 g			
NaHCO <sub>3</sub>	24 mM			
L-Glutamina	2 mM			
Mezcla de Antibióticos	5 mL			
HEPES	25 mM			
1x RPMI AA	20 mL			
C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>	10 mL			
FBS	10% (v/v)			
Sobrenadante L929	10/30% (v/v)			

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.7. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE BMDC

##### 3.2.7.1. Diferenciación de BMDC mediante el ligando Flt3L

1. Sacrificar un ratón C57BL/6 con CO<sub>2</sub>.
2. Esterilizar el abdomen y las patas traseras del ratón con etanol al 70%.
3. Hacer una incisión en el abdomen y cortar hacia afuera para exponer las patas traseras. Cortar el fémur en el extremo proximal, manteniendo la epífisis intacta, y la tibia en el extremo distal. Cortar el musculo circundante.
4. Con material quirúrgico estéril, cortar el fémur y la tibia en la epífisis proximal y en la articulación de la rodilla. Usando una aguja de 25G y una jeringa de 10 mL, enjuagar el fémur y la tibia con HBSS + FBS al 2% (v/v) sobre un tubo de 50 mL. El lumen del fémur y de la tibia debe cambiar de un color rojo a un color blanco, a medida que se van extrayendo las células de la medula ósea.
5. Centrifugar 5 min, a 4°C, 1.800 rpm.
6. Añadir 1 mL de Tampón de Lisis RBC e incubar durante 1 min a RT. Tras la incubación, añadir 20 mL de HBSS + FBS al 2% (v/v) para neutralizar la solución de lisis.
7. Centrifugar 5 min, a 4°C, 1.800 rpm.
8. Resuspender el pellet en 10 mL de HBSS + FBS al 2% (v/v).
9. Pasar la suspensión celular a través de una malla de 70 µm para individualizar las células y contar.
10. Sembrar 2x10<sup>6</sup> células/pocillo en 2 mL/pocillo de Medio BMDC-Flt3L en una placa de 24 pocillos tratada para cultivo celular.
11. En el día 3 de diferenciación, retirar 1 mL de cada pocillo y añadir 1 mL de Medio BMDC-Flt3L fresco.
12. En el día 7 de diferenciación, añadir 100 ng/mL de LPS a los pocillos correspondientes e incubar durante 8 h a 37°C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 3.2.7.2. Citometría de flujo

1. Recoger las células de los pocillos, recogiendo también el sobrenadante a un tubo, ya que hay células en suspensión, y añadir 500 µL/pocillo de Tripsina-EDTA e incubar durante 5 min a 37°C. Neutralizar la tripsina con PBS y recoger las células al mismo tubo donde se había recogido el sobrenadante. Contar las células y comenzar con la tinción para el análisis por citometría de flujo.
2. Tinción de viabilidad con Zombie Yellow (1:500) en 100 µL/pocillo de PBS. Este colorante fluorescente reacciona con las aminas presentes en las proteínas (**FIGURA 49**). No es permeable en las células vivas, pero sí lo es en las células muertas que presentan daños en la membrana. En las células sanas, este colorante sólo puede unirse a las aminas de la superficie celular. Sin embargo, las células dañadas se vuelven permeables a este tinte, el cual puede unirse a las proteínas citoplasmáticas. El número significativamente mayor de proteínas intracelulares en comparación con las de superficie celular da como resultado una mayor fluorescencia en las células muertas (Nordic BioSite, 2019).
3. Incubar durante 15 min a RT en oscuridad.
4. Centrifugar 1.000 x g, 5 min.
5. Bloqueo con CD16/32 (1:100) en 100 µL/pocillo de FACs.
6. Incubar durante 10 min en hielo y en oscuridad.
7. Centrifugar 1.000 x g, 5 min.
8. Tinción con anticuerpos (**TABLA 16**).
9. Incubar durante 15 min en hielo dentro de una nevera a 4°C en oscuridad.
10. Centrifugar 1.000 x g, 5 min.
11. Realizar dos lavados con 200 µL/pocillo de FACs.
12. Fijación con PFA al 2% (v/v) en FACs. Para ello, resuspenderemos el pellet de células con 100 µL/pocillo de FACs y, seguidamente, añadir 100 µL/pocillo de PFA al 4% (quedará diluido a una concentración del 2%).
13. Incubar durante 15 min a RT en oscuridad.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

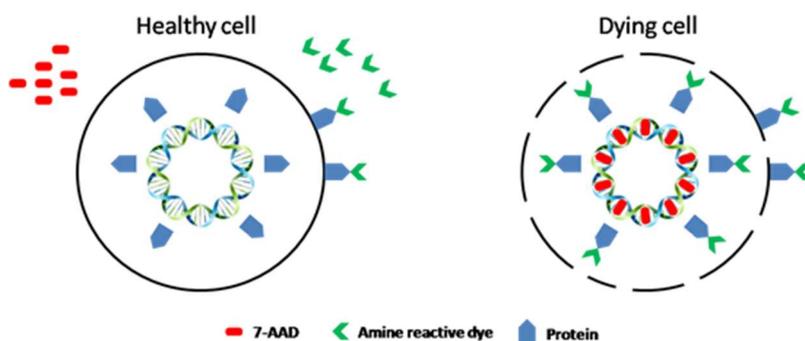
14. Centrifugar 1.000 x g, 5 min.

15. Resuspender en PBS.

16. Analizar por citometría de flujo con el citómetro espectral Aurora Cytex Biosciences.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.7.3. ANEXO VII.



**FIGURA 49 |** Representación esquemática de la tinción con colorantes de viabilidad de unión a aminas (Nordic BioSite, 2019).

**TABLA 16 |** Anticuerpos empleados para la cuantificación del estado de activación de BMDC.

Marcador	Fluorocromo	Concentración
CD11c	APC-Vio770	1:50
CD11b	VioBlue	1:100
CD80	Alexa Fluor 488	1:200
CD86	PerCP-Cy5.5	1:40
MHC-II	PerCP-Cy5.5	1:400

**TABLA 17 |** Reactivos.

	Distribuidor	Referencia	Protocolo
<b>Anticuerpos</b>			
Purified anti-mouse CD16/32	BioLegend	101302	Citometría de flujo
CD11c Antibody anti-mouse APC-Vio770	Miltenyi Biotec	130-122-016	Citometría de flujo
CD11b Antibody anti-mouse, VioBlue	Miltenyi Biotec	130-113-810	Citometría de flujo
AlexFluor 488 anti-mouse CD80	BioLegend	104716	Citometría de flujo
PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD86	BioLegend	105028	Citometría de flujo
PerCP/Cyanine5.5 MHC-II anti-mouse I-A/I-E Antibody	BioLegend	107625	Citometría de flujo
<b>Reactivos</b>			
Zombie Yellow Fixable Viability Kit	BioLegend	423103	Citometría de flujo
IC Fixation Buffer	Invitrogen	FB001	Citometría de flujo
<b>Equipos</b>			
Citómetro de flujo espectral Aurora	Cytek Biosciences		Citometría de flujo

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**TABLA 18 | Medios de cultivo.**

<b>HBSS (pH 7.2)</b>	<i>1 Litro</i>	<b>Medio BMDC-Fit3L</b>	<i>1 Litro</i>
NaCl	8 g	RPMI 1640 medium	10,43 g
KCl	0,4 g	L-Glutamina	2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06 g	Mezcla de Antibióticos	5 mL
Glucosa	1 g	HEPES	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,06 g	1x RPMI non-essential amino acid solution	20 mL
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,20 g	Piruvato Sódico	1 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,185 g	FBS	5% (v/v)
NaHCO <sub>3</sub>	0,35 g	2-mercaptoethanol	55 µM
<b>Tampón de Lisis RBC</b>	<i>1 Litro</i>	Flt3L	50 ng/mL
NaCl	8.3 g	<b>Tampón FACS</b>	
Tris-HCl buffer	0.01 M	PBS	1X
		BSA	0,5% (p/v)
		EDTA	2 mM

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.8. PRESENTACIÓN CRUZADA ANTIGÉNICA CON CÉLULAS OT-I

Se llevó a cabo la evaluación de la presentación cruzada antigénica tras la cuantificación de la proliferación de células OT-I (**FIGURA 50**) tras su co-cultivo con DCs estimuladas con macrófagos en los que se ha inducido ICD y un lisado de amastigotes de la cepa *L. infantum* HASPB:OVA. Para ello, se emplearon cDC1 aisladas procedentes de bazos de ratones a los que se les implantó el tumor B16-F1t3L.

##### 3.2.8.1. Expansión de cDC1 *in vivo* para su uso en experimentos *ex vivo*

1. Cultivar células B16-F1t3L en Medio B16-F1t3L en un flask T75 hasta que alcancen una confluencia del 80%.
2. Recoger las células. Aspirar el medio de cultivo, añadir 3 mL de Tripsina-EDTA e incubar 5 min a 37°C. Añadir 9 mL de PBS al flask para neutralizar la tripsina. Recoger las células en un tubo de 15 mL.
3. Centrifugar las células 6 min a 2.000 rpm. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 5 mL de PBS.
4. Contar las células y resuspenderlas en PBS a una concentración de  $5 \times 10^8$  células/mL.
5. Colocar 100  $\mu$ L de la suspensión celular en una jeringuilla con una aguja de 25G.
6. Implantación subcutánea de  $5 \times 10^6$  células B16-F1t3L en los flancos izquierdo y derecho de un ratón C57BL/6. Esperar entre 7 y 11 d a que el tumor alcance un diámetro entre 2 y 10 mm y sea visiblemente palpable.
7. Extraer el bazo y colocarlo sobre una placa de Petri de 60 mm. Inyectar 500  $\mu$ L de colagenasa (20 mg/mL) en el tejido y añadir 5 mL de Tampón de Colagenasa. Incubar durante 20 min a 37°C.
8. Procesar el bazo haciéndolo pasar a través de una malla de 100  $\mu$ m situada sobre un falcon de 50 mL. Ir añadiendo PBS para conseguir una suspensión celular.
9. Centrifugar 7 min a 2.500 rpm a 4°C.

10. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 4 mL de Tampón de Lisis. Incubar en hielo durante 4 min, agitando cuidadosamente la suspensión celular cada minuto.
11. Centrifugar 7 min a 2.500 rpm a 4°C.
12. Descartar el sobrenadante y hacer tres lavados con PBS frío.
13. Resuspender el pellet de células en PBS y contar las células.

##### 3.2.8.2. Aislamiento de cDC1

Para el aislamiento de cDC1 se empleó el kit CD8+ Dendritic Cell Isolation Miltenyi Biotec, siguiendo las instrucciones del fabricante.

##### A. Marcado magnético de células T, B y NK.

1. Resuspender  $10^8$  células totales en 200  $\mu$ L de Tampón FACs. Añadir 50  $\mu$ L de Biotin Antibody Cocktail. Mezclar bien. Incubar 10 min en hielo.
2. Añadir 150  $\mu$ L de Tampón FACs. Añadir 100  $\mu$ L de Anti-Biotin MicroBeads. Mezclar bien. Incubar 15 min en hielo.
3. Lavar las células añadiendo 5-10 mL de Tampón FACs. Centrifugar a  $1.000 \times g$ , 7 min en frío. Retirar el sobrenadante completamente. Resuspender el pellet en 800  $\mu$ L de Tampón FACs.

##### B. Separación magnética: Depleción de células T, B y NK.

1. Colocar la columna LS en el soporte magnético y activarla añadiendo 3 mL de Tampón FACs.
2. Añadir la suspensión celular en la columna.
3. Recoger las células no marcadas que salen de la columna.
4. Lavar la columna por dos veces con 3 mL de Tampón FACs.
5. Recoger el total eluido (fracción de células no marcada).
6. Proceder con el aislamiento de las DCs CD8+.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### C. Marcado magnético de las células dendríticas CD8<sup>+</sup>.

1. Centrifugar la suspensión celular a 1.000 x g, 7 min. Descartar el sobrenadante por completo.
2. Resuspender el pellet de células en 400 µL de Tampón FACs. Añadir 100 µL de CD8a (Ly-2) MicroBeads. Mezclar bien. Incubar 30 min en hielo. Mezclar al menos una vez durante el tiempo de incubación.
3. Lavar con 5-10 mL de Tampón FACs. Centrifugar a 1.000 x g, 10 min, 2-8°C. Aspirar el sobrenadante por completo. Resuspender las células en 800 µL de Tampón FACs.

#### D. Separación magnética: Selección Positiva de células dendríticas CD8<sup>+</sup>.

1. Colocar la columna MS en el soporte magnético y activarla con 500 µL de Tampón FACs.
2. Añadir la suspensión celular en la columna.
3. Recoger las células sin marcar que salen de la columna.
4. Lavar la columna por tres veces con 500 µL de Tampón FACs.
5. Recoger la fracción eluida por la columna (fracción celular sin marcar; *no es la fracción de interés*).
6. Retirar la columna del soporte magnético, colocarla sobre un tubo colector y añadir 1 mL de Tampón FACs a la columna. Empujar el émbolo en la columna para sacar las células marcadas magnéticamente (*fracción de interés*) y recogerlas en el tubo colector.
7. Contar las células y resuspenderlas en Medio RPMI suplementado a una concentración de 5x10<sup>5</sup> células/mL.
8. Colocar 100 µL/pocillo de células dendríticas (50.000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos con fondo en "U" tratadas para cultivo celular.

#### 3.2.8.3. Preparación del cargo

##### A. Lisado de amastigotes irradiados:

1. Diferenciación de promastigotes a amastigotes en Medio Amastigote (*apartado 3.2.2.1*).
2. Contar los amastigotes y colocar 2,5x10<sup>7</sup> amastigotes/mL en 10 mL de PBS en una placa de Petri mediana. Es importante que el medio no lleve rojo fenol, ya que interfiere durante la irradiación.
3. Colocar la placa de Petri sin tapa en el interior del Stratalinker. Seleccionar la cantidad de energía de 300 mJ/cm<sup>2</sup> e irradiar los parásitos con UV.
4. Recoger los amastigotes irradiados en un tubo. Centrifugar 10 min, 3.500 rpm. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en Medio RPMI Suplementado a una densidad de 10<sup>6</sup> amastigotes/µL.
5. Colocar 1,25x10<sup>6</sup> amastigotes/pocillo en 50 µL/pocillo de Medio RPMI Suplementado sobre los pocillos que contienen DCs (amastigotes:DC; 25:1).

##### B. Muerte celular de macrófagos RAW 264.7:

1. Cultivar la línea celular en un flask T75 hasta que alcance un 80% de confluencia.
2. Retirar el medio de cultivo y añadir 3 mL de Tripsina-EDTA. Incubar 5 min a 37°C. Neutralizar la tripsina con 9 mL de PBS y recoger las células a un tubo.
3. Centrifugar 6 min a 1.800 rpm y descartar el sobrenadante. Resuspender el pellet de células en 5 mL de Medio RAW 264.7. Contar las células.
4. Sembrar las células en una placa de 24 pocillos tratada para cultivo celular a una densidad de 300.000 células/pocillo en 300 µL de Medio RAW 264.7.
5. Realizar un pretratamiento con 300 µL de LPS a las siguientes concentraciones:
  - a. Apoptosis intrínseca: LPS (50 ng/mL)
  - b. Apoptosis extrínseca: LPS (100 ng/mL)
6. Incubar durante 3 h a 37°C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>.
7. Tratar las células con los inhibidores de interés:
  - a. Apoptosis intrínseca: 1 µM ABT-263 + 1 µM AZD-5991

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

- b. Apoptosis extrínseca: 1  $\mu$ M LCL-161
8. Preparar las células RAW 264.7 irradiadas con UV a 240 y 500 mJ/cm<sup>2</sup> como en el apartado 3.2.4.2.
9. Incubar las células durante 3 h a 37°C.
10. Recoger las células de los pocillos y resuspenderlas en 150  $\mu$ L de Medio RPMI Suplementado ( $2 \times 10^6$  células/mL). De esta forma, podremos tener tres réplicas de cada tratamiento ya que se añaden 50  $\mu$ L/pocillo sobre las DC, colocando así 100.000 células/pocillo (RAW 264.7:DC; 2:1).
11. Añadir 50  $\mu$ L/pocillo (100.000 células/pocillo) sobre los pocillos que contienen DCs.
5. Lavar de nuevo con 200  $\mu$ L/pocillo de PBS.
6. Centrifugar y desechar el sobrenadante, como antes.
7. Parar la fijación de PFA agregando 100  $\mu$ L/pocillo de glicina 0,5 M en RPMI sin suero e incubar 5 min a RT.
8. Centrifugar a RT y desechar el sobrenadante, como antes.
9. Lavar cuatro veces en PBS, centrifugar y desechar el sobrenadante, como antes.
10. Añadir 200  $\mu$ L/pocillo de medio RPMI Suplementado e incubar 20 min a 37°C. Esto sirve para permitir la liberación del exceso de PFA de las DCs.
11. Centrifugar y desechar el sobrenadante como antes.

#### 3.2.8.4. Estimulación de cDC1

1. Una vez añadido el cargo, centrifugar 300 x g, 2 min e incubar hasta el día siguiente a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>.
2. Realizar el recubrimiento de la placa con  $\alpha$ -CD3 (50  $\mu$ g/mL), el cual será empleado como control *positivo*, e incubar hasta el día siguiente a 4°C.
3. Tras incubar las DCs con el cargo durante toda la noche, tratar las DCs correspondientes con LPS (100 ng/mL) y SIINFEKL (2  $\mu$ M) durante 30 min antes de comenzar con la fijación de las células. Será empleado como control *positivo*.
4. Centrifugar 800 x g, 5 min. Retirar y desechar el sobrenadante con cuidado, utilizando una pipeta P200.
5. Lavar dos veces con 200  $\mu$ L/pocillo de PBS.
6. Centrifugar y descartar los sobrenadantes, como antes.

#### 3.2.8.5. Fijación de las DCs

1. Fijar las DCs añadiendo 100  $\mu$ L/pocillo de PFA al 0,05 % (v/v) en PBS a cada pocillo.
2. Incubar las células 5 min a RT.
3. Lavar una vez añadiendo 100  $\mu$ L/pocillo de PBS a cada pocillo que contenga PFA.
4. Centrifugar a RT. Desechar el sobrenadante con cuidado, como antes.

#### 3.2.8.6. Aislamiento de linfocitos T CD8+

Como célula T se emplearon linfocitos esplénicos de ratones OT-I aislados mediante el kit CD8a+ T Cell Isolation Miltenyi Biotec, siguiendo las instrucciones del fabricante.

1. Sacrificar un ratón OT-I de entre 7 y 11 semanas de edad.
2. Extracción y procesamiento del bazo. No se realiza un proceso de digestión con colagenasa. Pasar todo el material a través de una malla de 70  $\mu$ m. Ayudarse del émbolo de la jeringuilla. Ir añadiendo PBS para ir limpiando la malla.
3. Centrifugar 7 min, 1.000 x g. Descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet en 1 mL de Tampón de Lisis RBC e incubar durante 1 min a RT. Añadir PBS para neutralizar la lisis.
5. Centrifugar 7 min, 500 x g. Contar las células.

#### A. Aislamiento por columna. Marcaje magnético:

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Resuspender el pellet en 40  $\mu$ L de Tampón FACs para un total de  $10^7$  células. Añadir 10  $\mu$ L de Biotin-Antibody Cocktail para  $10^7$  células totales. Mezclar bien e incubar 10 min a 4°C.
2. Añadir 30  $\mu$ L de Tampón FACs para  $10^7$  células totales. Añadir 20  $\mu$ L de Anti-Biotin MicroBeads para  $10^7$  células totales. Mezclar bien e incubar 10 min a 4°C.
3. Añadir 800  $\mu$ L de Tampón FACs.

#### B. Separación magnética de células

1. Colocar la columna LS en el soporte magnético y activarla con 3 mL del Tampón FACs y dejar que se vacíe por completo.
2. Añadir la suspensión de células a la columna.
3. Recoger las células sin marcar que salen de la columna, ya que representan la fracción *enriquecida* en células T CD8<sup>+</sup>.
4. Lavar la columna por dos veces con 3 mL de Tampón FACs. Recoger las células que atraviesan la columna (células T CD8<sup>+</sup>) y juntarlas con las del paso anterior.
5. Contar las células.
6. Centrifugar 5 min, 0.7 x g. Descartar el sobrenadante. Resuspender en PBS a una concentración de:
  - a. 500.000 células/mL para células sin teñir.
  - b.  $2 \times 10^6$  células/mL para células que van a ser teñidas con CellTrace Yellow.

#### 3.2.8.7. Tinción de células T CD8+ con CellTrace Yellow

El colorante CellTrace Yellow se incorpora tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células, y se retiene bien dentro de las células teñidas (**FIGURA 51**). Cuando las células teñidas se dividen, este colorante se distribuye uniformemente entre las células hijas, lo que resulta en la dilución de este colorante a la mitad en cada división celular consecutiva, generando distintos picos de fluorescencia cuando una población que ha proliferado es observada como un histograma tras el análisis por citometría de flujo (Lyons & Parish, 1994).

1. Añadir 40  $\mu$ L de DMSO a un vial de solución de tinción CellTrace Yellow (Stock = 5 mM).
2. Preparar una solución 2X de CellTrace Yellow (2  $\mu$ M) en 500  $\mu$ L de PBS por cada  $10^6$  células. (Concentración de uso = 1  $\mu$ M por cada  $10^6$  células).
3. Mezclar las células T CD8<sup>+</sup> ( $10^6$  células / 500  $\mu$ L) + 500  $\mu$ L del CellTrace 2X.
4. Incubar 20 min a RT en oscuridad. Agitar la muestra cada 2 min.
5. Añadir 5 vol. de PBS + FBS al 2% (v/v) e incubar 5 min, RT. Este paso sirve para eliminar restos de colorante.
6. Centrifugar 1000 x g, 5 min, descartar el sobrenadante y resuspender en Medio RPMI Suplementado a una concentración de 500.000 células/mL.

#### 3.2.8.8. Co-cultivo de DCs y células T CD8+

1. Realizar tres o cuatro lavados con PBS en los pocillos donde se había realizado el recubrimiento con  $\alpha$ -CD3 antes de añadir las células T CD8<sup>+</sup>.
2. Añadir 200  $\mu$ L/pocillo (100.000 células) de la suspensión de células T CD8<sup>+</sup> a los pocillos que contenían las DCs fijadas.
3. Para los pocillos destinados para el control *positivo*:
  - a.  $\alpha$ -CD3 (50  $\mu$ g/mL): colocado 24 h antes a 4°C.
  - b.  $\alpha$ -CD28 (5  $\mu$ g/mL).
4. Incubar a 37°C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h.

#### 3.2.8.9. Citometría de flujo

1. Centrifugar la placa de células 800 x g, 5 min. Retirar el sobrenadante con cuidado con una pipeta P200.
2. Lavar con 200  $\mu$ L/pocillo de PBS.
3. Centrifugar la placa de células 800 x g, 5 min. Retirar el sobrenadante con cuidado.
4. Añadir 100  $\mu$ L/pocillo de una dilución 1:500 de Zombie Yellow en PBS. Incubar 15 min a RT en oscuridad.
5. Centrifugar la placa de células 800 x g, 5 min. Retirar el sobrenadante con cuidado.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

6. Realizar dos lavados con 200  $\mu$ L/pocillo de FACs.
7. Fijar las células con 200  $\mu$ L/pocillo de PFA al 2% (v/v) en FACs. Incubar 15 min a RT en oscuridad.
8. Centrifugar la placa de células 800 x g, 5 min. Retirar el sobrenadante con cuidado con una pipeta P200.
9. Resuspender las células en 250  $\mu$ L de PBS.
10. Analizar por citometría de flujo con el citómetro espectral Aurora Cytex Biosciences.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.8.10. ANEXO VIII.

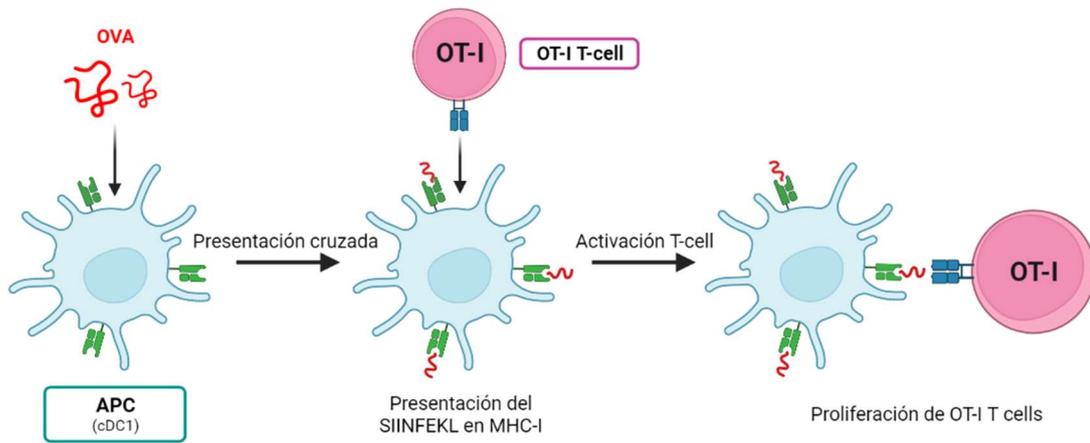


FIGURA 50 | Esquema de la presentación cruzada antigénica empleando células B3Z.

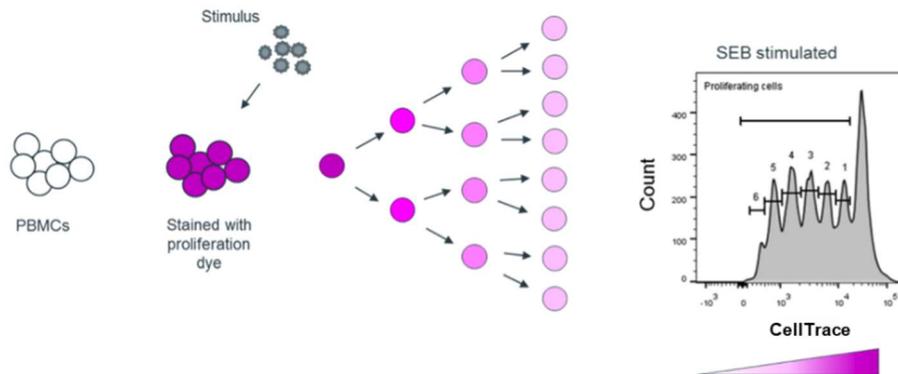


FIGURA 51 | Principio de los ensayos de dilución de los colorantes empleados para la cuantificación de la proliferación celular. Las células parentales se tiñen con CellTrace Yellow el día 0. Cuando las células se dividen, el colorante se va diluyendo en las células hijas. El análisis por citometría de flujo permite revelar la presencia de picos más tenues, que corresponderían a las diferentes generaciones de células generadas a partir de la célula parental. Imagen modificada de Sanquin, 2021.

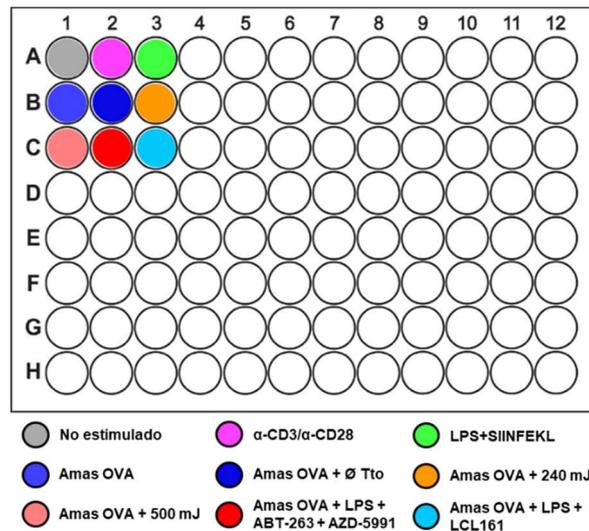


FIGURA 52 | Esquema de la placa de trabajo empleada en el experimento de presentación cruzada con células OT-I.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

TABLA 19 | Reactivos.

	Distribuidor	Referencia	Protocolo
<b>Kits comerciales</b>			
CD8+ Dendritic Cell Isolation Kit, mouse			
• CD8+ Dendritic Cell Biotin-Antibody Cocktail, mouse	Miltenyi Biotec	130-091-169	<i>Aislamiento cDC1</i>
• Anti-Biotin MicroBeads			
• CD8a (Ly-2) MicroBeads			
CD8a+ T Cell Isolation Kit, mouse			
• CD8a+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail, mouse	Miltenyi Biotec	130-104-075	<i>Aislamiento células T CD8</i>
• Anti-Biotin MicroBeads			
<b>Anticuerpos</b>			
Ultra-LEAF Purified anti-mouse CD3	BioLegend	100238	<i>Estimulación células T CD8</i>
Ultra-LEAF Purified anti-mouse CD28	BioLegend	102116	<i>Estimulación células T CD8</i>
<b>Inhibidores</b>			
ABT-263 (Navitoclax)	MedChemExpress	HY-10087	<i>Muerte celular RAW 264.7</i>
AZD-5991	MedChemExpress	HY-101533	<i>Muerte celular RAW 264.7</i>
LCL161	MedChemExpress	HY-15518	<i>Muerte celular RAW 264.7</i>
<b>Reactivos</b>			
Collagenase D	Roche	11088866001	<i>Aislamiento células T CD8</i>
Ova Peptide (257-264)	GenScript	RP10611	<i>Carga DCs</i>
16% Formaldehyde Solution (v/v), Methanol-free	Thermo Scientific	28906	<i>Fijación DC</i>
Zombie Yellow™ Fixable Viability Kit	BioLegend	423103	<i>Citometría de flujo</i>
CellTrace Yellow Cell Proliferation Kit	Invitrogen	C34567	<i>Citometría de flujo</i>
DMEM/F-12, HEPES	Gibco	11574546	<i>Células B16-F1t3L</i>
<b>Fungible</b>			
LS Columns	Miltenyi Biotec	130-042-401	<i>Aislamiento cDC1</i> <i>Aislamiento células T CD8</i>
MS Columns	Miltenyi Biotec	130-042-201	<i>Aislamiento células T CD8</i>
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec	130-042-302	<i>Aislamiento cDC1</i> <i>Aislamiento células T CD8</i>
MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotec	130-042-102	<i>Aislamiento cDC1</i>
<b>Equipos</b>			
Citómetro de flujo espectral Aurora	Cytek Biosciences		<i>Citometría de flujo</i>

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**TABLA 20 | Medios de cultivo.**

<b>Medio B16-Fit3L</b>		<b>Medio Amastigote (pH 5.5)</b>	
DMEM/F-12, HEPES	0.5 L	KCl	15 mM
Mezcla de Antibióticos	2,5 mL	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136 mM
FBS	10% (v/v)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	10 mM
<b>Tampón de Colagenasa (pH 7.4)</b>		MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 mM
HEPES pH 7.4	10 mM	NaHCO <sub>3</sub>	24 mM
NaCl	150 mM	Glucosa	22 mM
KCl	5 mM	Glutamina	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	RPMI 1640 Vitamin Mix	1X
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM	Ácido Fólico	10 µM
<b>Tampón de Lisis (pH 7.2)</b>		Adenosina	100 µM
	<i>1 Litro</i>	RPMI Amino Acid Mix	1X
NH <sub>4</sub> Cl	8,025 g	Hemina	5 µg/mL
KHCO <sub>3</sub>	0,1 g	Mezcla de Antibióticos	5 mL
EDTA	0,037 g	MES	25 mM
<b>Tampón FACs</b>		FBS	20% (v/v)
PBS	1X	<b>Medio RAW 264.7</b>	
BSA	0,5% (p/v)		<i>1 Litro</i>
EDTA	2 mM	RPMI 1640	10,43 g
<b>Medio RPMI Suplementado</b>		NaHCO <sub>3</sub>	24 mM
RPMI 1640 Medium		HEPES	25 mM
NaHCO <sub>3</sub>	23.81 mM	Mezcla de Antibióticos	5 mL
L-Glutamina	2 mM	L-Glutamina	2 mM
Mezcla de Antibióticos	5 mL	FBS	10% (v/v)
Piruvato Sódico	1 mM	<b>Tampón de Lisis RBC</b>	
HEPES Buffer	10 mM		<i>1 Litro</i>
Solución de Aminoácidos	1X	NaCl	8.3 g
No Esenciales		Tris-HCl buffer	0.01 M
β-Mercaptoetanol	0.055 mM		
FBS	5% (v/v)		

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.9. FENOTIPADO DE BAZO SANO E INFECTADO PARA DCs

##### 3.2.9.1. Procesamiento del bazo

1. Extraer el bazo del ratón y colocarlo en una placa de Petri de 60 mm.
2. Inyectar en el bazo del ratón 500  $\mu$ L de colagenasa D (20 mg/mL) empleando una jeringuilla de 1 mL y una aguja de 25G. Cortar el bazo en pequeñas piezas, añadir 5 mL de Tampón de Colagenasa e inyectarlo en los diferentes trozos.
3. Incubar a 37°C durante 20 min.
4. Pasar todo el material a través de una malla de 70  $\mu$ m colocada sobre un tubo de 50 mL, usando el émbolo de la jeringuilla y diluyendo con PBS hasta un volumen final de 50 mL.
5. Centrifugar durante 7 min a 1.000 x g. Retirar el sobrenadante.
6. Resuspender el pellet en 4 mL de Tampón de Lisis e incubar en hielo durante 4 min. Agitar cada minuto.
7. Diluir el Tampón de Lisis con PBS hasta 50 mL.
8. Centrifugar durante 7 min a 1.000 x g. Retirar el sobrenadante.
9. Realizar tres lavados con PBS, enrasando hasta 50 mL cada vez.
10. Centrifugar durante 7 min a 1.000 x g. Retirar el sobrenadante. Resuspender el pellet en 5 mL de PBS. Contar las células.

##### 3.2.9.2. Citometría de flujo

1. Procesamiento del bazo (*apartado* 3.2.2.2).
2. Colocar 500.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en "U" sin tratar para cultivo celular.
3. Centrifugar 1.000 x g, 5 min.
4. Tinción de viabilidad con Zombie Yellow (1:500) en 100  $\mu$ L/pocillo de PBS.
5. Incubar durante 15 min a RT en oscuridad.
6. Centrifugar 1.000 x g, 5 min.

7. Bloqueo con CD16/32 (1:100) en 100  $\mu$ L/pocillo de FACs.
8. Incubar durante 10 min en hielo en oscuridad.
9. Centrifugar 1.000 x g, 5 min.
10. Tinción con anticuerpos (**TABLA 21**).
11. Incubar durante 15 min en hielo dentro de una nevera a 4°C en oscuridad.
12. Centrifugar 1.000 x g, 5 min.
13. Realizar dos lavados con 200  $\mu$ L/pocillo de FACs.
14. Fijación con PFA al 2% (v/v) en FACs. Para ello, resuspenderemos el pellet de células con 100  $\mu$ L/pocillo de FACs y, seguidamente, añadir 100  $\mu$ L/pocillo de PFA al 4% (quedará diluido a una concentración del 2%).
15. Incubar durante 15 min a RT en oscuridad.
16. Centrifugar 1.000 x g, 5 min.
17. Resuspender el pellet en 100  $\mu$ L/pocillo de Tampón Permeabilizador.
18. Centrifugar 1.000 x g, 5 min.
19. Tinción con el anticuerpo frente a OVA (1:25) conjugado con FITC preparado en 100  $\mu$ L/pocillo en Tampón Permeabilizador.
20. Incubar durante 10 min a RT en oscuridad.
21. Añadir 100  $\mu$ L/pocillo de Tampón Permeabilizador.
22. Centrifugar 1000 x g, 5 min.
23. Resuspender en PBS.
24. Analizar por citometría de flujo con el citómetro espectral Aurora Cytex Biosciences.

##### 3.2.9.3. Aislamiento de Pan-DCs

Para cuantificar el porcentaje de infección de pan-DCs procedentes de bazos infectados con *L. infantum* HASPB:OVA, se empleó el kit Pan Dendritic Cell Isolation Miltenyi Biotec, siguiendo las instrucciones del fabricante.

1. Infectar a un ratón BALB/c con  $1,5 \times 10^9$  promastigotes metacíclicos de la cepa *L. infantum* 2713 HASPB:OVA (cultivo de promastigotes en estado estacionario; de 5

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

- a 7 d). Inocular los parásitos por vía intraperitoneal en 200  $\mu$ L de PBS.
- Tras 3, 8 y 16 semanas post-infección, extraer el bazo del ratón y colocarlo en una placa de Petri de 60 mm, en condiciones estériles.
- Procesamiento del bazo (*apartado* 3.2.2.2).
- Resuspender el pellet en Tampón FACs y contar las células.

#### A. Marcado Magnético

Trabajar rápido y en hielo. Usar soluciones pre-enfriadas.

- Centrifugar la suspensión celular a 300 x g durante 10 min. Aspirar el sobrenadante completamente. Resuspender el pellet de células en 350  $\mu$ L de Tampón FACs para un total de  $10^8$  células.
- Añadir 50  $\mu$ L del Reactivo de Bloqueo de FcR para un total de  $10^8$  células. Añadir 100  $\mu$ L del Cóctel de anticuerpos conjugados con Biotina de Células PanDendríticas para un total de  $10^8$  células. Mezclar bien e incubar durante 10 min a 4°C.
- Lavar las células añadiendo 10 mL por cada  $10^8$  células del Tampón FACs y centrifugar a 300 x g durante 10 min. Aspirar el sobrenadante. Resuspender el pellet de células en 800  $\mu$ L de Tampón FACs.
- Añadir 200  $\mu$ L de MicroBeads Anti-Biotina para un total de  $10^8$  células. Mezclar bien e incubar durante 10 min a 4°C.

#### B. Separación Magnética con Columnas LS

- Colocar la columna en el imán y activarla con 3 mL del Tampón FACs.
- Aplicar la suspensión celular en la columna, permitir que las células pasen a través y recoger la fracción de células sin marcar (fracción celular *enriquecida* en PanDCs).

- Lavar la columna por dos veces con 3 mL de Tampón FACs. Añadir el tampón sólo cuando todo el reservorio de la columna esté vacío. Recoger el eluyente completo en el mismo tubo que en el paso anterior.

#### 3.2.9.4. Microscopía confocal

- Fijar con PFA al 4% (v/v) durante 20 min a RT. Retirar el PFA y lavar una vez con PBS.
- Permeabilizar las células con Inside Perm del Kit Inside Stain Miltenyi Biotec durante 10 min, RT. Retirar Permeabilizador y lavar una vez con PBS.
- Para reducir la autofluorescencia de las células, tratar con 0,1 M de glicina en PBS durante 20 min, RT. Retirar glicina y lavar una vez con PBS.
- Bloquear con caseína al 0,1% (p/v) en PBS (solución de bloqueo) durante 20 min, RT. Retirar caseína.
- Incubar con el anticuerpo 1º preparado en solución de bloqueo durante 1h, RT.
  - Anti-OVA Rat Anti-Chicken (1:500).
- Retirar el anticuerpo 1º y lavar dos veces con PBS.
- Incubar con el anticuerpo 2º Anti-Rat Alexa Fluor 647 (4  $\mu$ g/mL) durante 1 h, RT.
- Lavar tres veces con PBS.
- Teñir con DAPI (1:1000 en diH<sub>2</sub>O) durante 5 min, RT.
- Lavar una vez con PBS.
- Dejar secar los LabTek Thermo Scientific.
- Montaje de LabTek Thermo Scientific (grosor de #1) con el medio de montaje Antifade.
- Dejar secar toda la noche a RT y tomar las fotografías con el microscopio confocal LSM800 Zeiss.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.9.5. ANEXO IX.

**TABLA 21 | Anticuerpos empleados para el fenotipado de bazo murino.**

Marcador	Fluorocromo	Concentración
CD11c	APC-Vio770	1:50
MHC-II	PerCP-Cy5.5	1:1.000
CD11b	VioBlue	1:100
XCR1	PE	1:50
Siglec-H	BV605	1:25
CD317	PE-Vio770	1:25

**TABLA 22 | Reactivos.**

	Distribuidor	Referencia	Protocolo
<b>Kits comerciales</b>			
Pan Dendritic Cell Isolation Kit			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• FcR Blocking Reagent, mouse</li> <li>• Pan Dendritic Cell Biotin-Antibody Cocktail, mouse</li> <li>• Anti-Biotin MicroBeads</li> </ul>	Miltenyi Biotec	130-100-875	<i>Aislamiento Pan-DCs</i>
<b>Anticuerpos</b>			
Purified anti-mouse CD16/32	BioLegend	101302	<i>Citometría de flujo</i>
CD11c Antibody anti-mouse APC-Vio770	Miltenyi Biotec	130-122-016	<i>Citometría de flujo</i>
PerCP/Cyanine5.5 MHC-II anti-mouse I-A/I-E Antibody	BioLegend	107625	<i>Citometría de flujo</i>
CD11b Antibody anti-mouse, VioBlue	Miltenyi Biotec	130-113-810	<i>Citometría de flujo</i>
PE anti-mouse/rat XCR1	BioLegend	148203	<i>Citometría de flujo</i>
BV605 Rat Anti-mouse Siglec-H	BD Biosciences	747673	<i>Citometría de flujo</i>
CD317 (PDCA-1) Antibody, anti-mouse, PE-Vio770	Miltenyi Biotec	130-112-222	<i>Citometría de flujo</i>
Anti-OVALBUMIN (Rabbit) Antibody Fluorescein Conjugated	Rockland	200-4233-0100	<i>Citometría de flujo</i>
Anti-OVA Host: Rat; Reactivity: Chicken	Antibodies-online	ABIN400507	<i>Microscopía confocal</i>
Alexa Fluor 647 goat anti-rat IgG (H+L)	Invitrogen	A21247	<i>Microscopía confocal</i>
<b>Reactivos</b>			
Collagenase D	Roche	11088866001	<i>Citometría de flujo</i>
Zombie Yellow Fixable Viability Kit	BioLegend	423103	<i>Citometría de flujo</i>
IC Fixation Buffer	Invitrogen	FB001	<i>Citometría de flujo</i>
Inside Stain Kit (Inside Perm)	Miltenyi Biotec	130-090-477	<i>Citometría de flujo</i>
ProLong Diamond Antifade Mountant	Invitrogen	P36961	<i>Microscopía confocal</i>
<b>Fungible</b>			
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec	130-042-302	<i>Aislamiento Pan-DCs</i>
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec	130-042-303	<i>Aislamiento Pan-DCs</i>
LS Columns	Miltenyi Biotec	130-042-401	<i>Aislamiento Pan-DCs</i>
Sistema dNunc Lab-Tek II Chamber Slide	Thermo Scientific	16260661	<i>Microscopía confocal</i>
<b>Equipos</b>			
Citómetro de flujo espectral Aurora	Cytek Biosciences		<i>Citometría de flujo</i>
Microscopio Confocal LSM800	ZEISS		<i>Microscopía confocal</i>

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

TABLA 23 | Medios de cultivo.

---

<b>Tampón de Colagenasa (pH 7.4)</b>	
HEPES pH 7.4	10 mM
NaCl	150 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
<b>Tampón de Lisis (pH 7.2)</b>	
<i>1 Litro</i>	
NH <sub>4</sub> Cl	8,025 g
KHCO <sub>3</sub>	0,1 g
EDTA	0,037 g
<b>Tampón FACs</b>	
PBS	1X
BSA	0,5% (p/v)
EDTA	2 mM

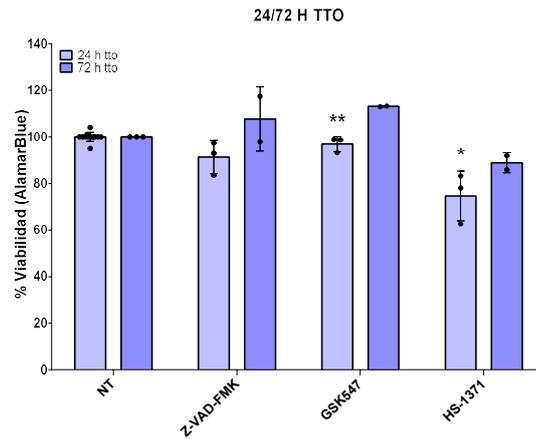
## **4. RESULTADOS**

## 4.1. CAPÍTULO I: NECROPTOSIS.

### 4.1.1. Inducción a la necroptosis en cultivos primarios BMDM

La necroptosis es un proceso de muerte celular programada independiente de la activación de caspasas que puede ser inducido por diferentes estímulos extracelulares (TLR1 y TLR4) e intracelulares (inhibición de proteínas inhibitoras de apoptosis, entre otros). A diferencia de la apoptosis, la necroptosis es un proceso inflamatorio que supone la formación de poros en la membrana plasmática, por los que se van a eliminar citoquinas y quimiocinas inflamatorias. Como los procesos que desencadenan la apoptosis y la necroptosis están íntimamente relacionados, una forma de diferenciarlos es añadir inhibidores genéricos de caspasas reguladoras y ejecutoras (inhibidores pan-caspasa), después de haber estimulado el proceso de muerte celular programada. En sus inicios, la necroptosis era considerada un tipo de necrosis, como un programa de muerte celular inducido en respuesta a TNF- $\alpha$  y dependiente de las serina/treonina quinasas RIPK1 y RIPK3 (He et al., 2011). Con este fin, Legarda & Ting en 2018 describieron un procedimiento para producir necroptosis en cultivos celulares, consistente en la iniciación de la muerte mediante la estimulación de receptores TLR4 con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* (Legarda & Ting, 2018), en presencia del inhibidor de pan-caspasa Z-VAD-FMK (Holler et al., 2000). La viabilidad o muerte celular resultante de la exposición a estos compuestos, puede medirse por procedimientos estándar como la tinción con alamarBlue (**FIGURA 53-FIGURA 56**), o la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (**FIGURA 57**), respectivamente.

Los experimentos se realizaron en cultivos primarios de macrófagos de médula ósea (BMDM) procedentes de ratones C57BL/6, infectados o no con amastigotes de *L. infantum* a las 24 h y 72 h post-infección, con el fin de ver el papel que juega el patógeno en la viabilidad o muerte de los macrófagos. En una primera instancia, se comprobó que los compuestos utilizados no eran tóxicos para las células hospedadoras a las concentraciones que iban a ser usados. En la **FIGURA 53**, se muestran los resultados de viabilidad obtenidos con alamarBlue tras el tratamiento de células no infectadas durante 24 y 72 h con 25 mM Z-VAD-FMK, y con los inhibidores de RIPK1 (GSK547) y de RIPK3 (HS-1371) a 5  $\mu$ M cada uno. De esta forma, pudimos comprobar que estos compuestos, por sí mismos, no son capaces de producir muerte celular en BMDM a las concentraciones indicadas, que son las que se utilizaron para experimentos posteriores.



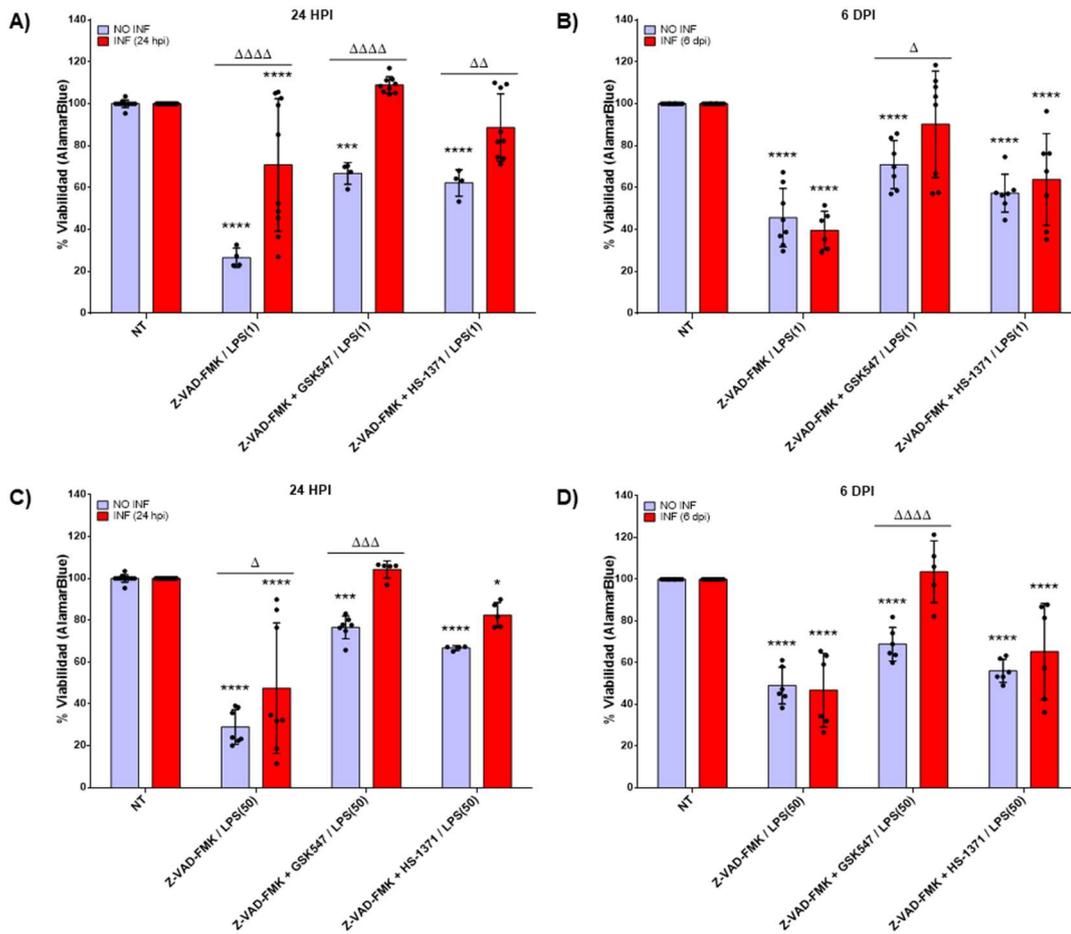
**FIGURA 53 | Viabilidad celular resultante del tratamiento de células BMDM procedentes de ratones C57BL/6 con los compuestos inductores e inhibidores de necroptosis, mediante alamarBlue.** Las células fueron tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M), GSK547 (5  $\mu$ M) y HS-1371 (5  $\mu$ M) durante 24 y 72 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0,1$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples.

#### 4.1.1.1. Inducción a la necroptosis por LPS

La inducción de la necroptosis por LPS en presencia de Z-VAD-FMK produjo una reducción del 75% en la viabilidad de BMDM, independientemente de la concentración de LPS añadido al medio; 1 ng/mL (**FIGURA 54A**) o 50 ng/mL (**FIGURA 54C**) a las 24 h de incubación. Este porcentaje se redujo hasta el 45-50% a los 6 d de infección con *L. infantum*. Sí fue significativo el papel jugado por los amastigotes de *L. infantum* que estaban infectando los macrófagos ya que, en este caso, la viabilidad celular fue  $>70\%$  en los BMDM estimulados con 1 ng/mL LPS (**FIGURA 54C**) y  $>50\%$  con 50 ng/mL LPS (**FIGURA 54D**). Este efecto protector del patógeno sobre la célula hospedadora no se mantuvo tras 6 d de infección. Dado que no hubo diferencias importantes entre las dos concentraciones de LPS, se optó por utilizar la de 1 ng/mL en el resto de la memoria.

Independientemente de la ruta de iniciación de la necroptosis, los receptores RIPK1 y RIPK3 juegan un papel indispensable en la activación de MLKL – la proteína responsable de perforar la membrana plasmática de las células que mueren por necroptosis. Para comprobar que la combinación Z-VAD-FMK/LPS provocaba realmente una condición de necroptosis en las células tratadas, se añadieron previamente a los cultivos de BMDM estimulados con 1 ng/mL LPS, dos inhibidores específicos de estas proteínas (McComb et al., 2014; Alturki et al., 2018): GSK547, inhibidor específico de RIPK1 (Wang et al., 2018), y HS-1371, inhibidor específico de RIPK3 (Park et al., 2018). Como era de esperar, la muerte celular por necroptosis inducida por Z-VAD-FMK/LPS fue parcialmente prevenida en BMDM en todos los casos, obteniéndose una viabilidad comprendida entre el 60-80% con ambos inhibidores tras 24 h de incubación (**FIGURA 54A**), independientemente de la concentración de LPS (**FIGURA**

54C), disminuyendo ligeramente a los 6 d (FIGURA 54B y D). En cualquier caso, la reversión con el inhibidor de RIPK1 fue siempre superior a la producida por el inhibidor de RIPK3.



**FIGURA 54 | Viabilidad celular resultante del tratamiento de células BMDM con las combinaciones de compuestos inductores de necroptosis, mediante alamarBlue tras (A, C) 24 h post-infección (24 hpi) y (B, D) 6 d post-infección (6 dpi) con *L. infantum*. Las células fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M), GSK547 (5  $\mu$ M) y HS-1371 (2,5  $\mu$ M) durante 1 h y, posteriormente, las células fueron tratadas con (A-B) 1 ng/mL de LPS y (C-D) 50 ng/mL de LPS durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0,1$ );  $\Delta\Delta$  ( $p < 0,01$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,001$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de viabilidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.**

Para ver si *Leishmania* afectaba a la viabilidad celular de los macrófagos inducidos a la muerte celular por necroptosis, BMDM infectados con amastigotes de *L. infantum* e inducidos con Z-VAD-FMK/LPS fueron tratados con GSK547 y HS-1371 para inhibir RIPK1 y RIPK3, respectivamente. Igual que en los experimentos anteriores, la viabilidad de los macrófagos infectados se midió a las 24 h (FIGURA 54A y C) o tras 6 d post-infección (FIGURA 54B y D). En ambos casos, la viabilidad de los BMDM infectados y tratados con GSK547 y HS-1371 fue superior al de las células no infectadas, tanto a las 24 h como a los 6 d post-infección.

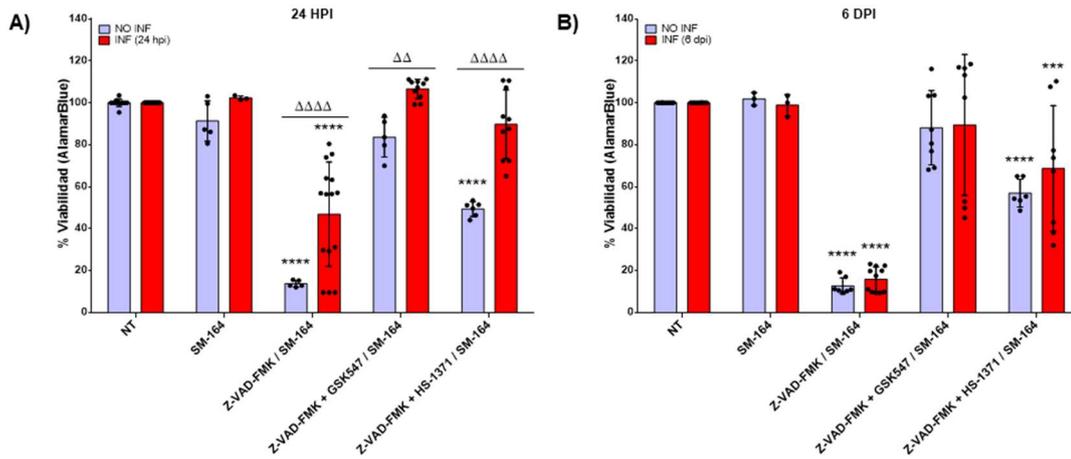
Asimismo, si comparamos la viabilidad de las células no infectadas respecto a las infectadas a las 24 h, estas últimas tenían porcentajes de viabilidad significativamente mayores, revirtiendo por completo el proceso de necroptosis (valores <100% de viabilidad) después del tratamiento con GSK547, y cerca del 100% después del tratamiento con HS-1371 (**FIGURA 54A y C**). Estos porcentajes disminuían a los 6 d de incubación, aunque seguían siendo elevados (**FIGURA 54B y D**).

Este hecho podría interpretarse como que *Leishmania* era capaz de retrasar el proceso de muerte de las células hospedadoras. Este hecho ya ha sido observado en el estudio de Giri y col. en 2016, en el que vieron que, al infectar células con amastigotes de *L. donovani* y tratarlas con actinomicina D, el porcentaje de células apoptóticas se reducía progresivamente a medida que el tiempo de infección aumentaba (Giri et al., 2016).

#### 4.1.1.2. Inducción a la necroptosis por inhibidores IAPs

Una vez establecidas las condiciones iniciales de necroptosis con Z-VAD-FMK/LPS, se quiso inducir muerte celular programada por necroptosis de una manera alternativa, consistente en la inhibición de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) en presencia de Z-VAD-FMK. En estudios anteriores, se provocó necroptosis en cultivos establecidos de células HT-29 y en BMDM de ratones C57BL/6, empleando miméticos de SMAC, como BV6 (inhibidor dual de XIAP y cIAP), combinado con Z-VAD-FMK (He et al., 2011; Seo et al., 2020). SM-164 es un inhibidor de los dominios BIR2 y BIR3 de la proteína XIAP, un miembro importante de la familia IAP, (Lu et al., 2008). XIAP tiene como función prevenir la formación del rioposoma e inhibir la activación de la caspasa 8 (Yabal et al., 2014; Lawlor et al., 2015, 2017), por lo tanto, la deficiencia o inhibición enzimática de XIAP provoca muerte celular apoptótica mediada por caspasa 8. En nuestro caso, hemos combinado SM-164 con Z-VAD-FMK para provocar necroptosis en cultivos celulares primarios BMDM infectados o no con amastigotes de *L. infantum*.

De acuerdo con los resultados de la **FIGURA 55**, al combinar Z-VAD-FMK con SM-164, la viabilidad de BMDM disminuyó > 85%, tanto a las 24 h como a los 6 d post-infección, en comparación con las células control o las tratadas únicamente con SM-164. Para comprobar si la condición Z-VAD-FMK/SM-164 provocaba necroptosis, las células fueron cultivadas en presencia de GSK547 y de HS-1371. Efectivamente, la necroptosis se previno parcialmente con ambos inhibidores, siendo mayor de nuevo la prevención producida por GSK547 – casi el 100 % – de manera semejante a lo que había sido descrito por Seo y col. en 2020 con el inhibidor de RIPK1, GSK963 (**FIGURA 55A y B**) (Seo et al., 2020). De la misma manera que con la necroptosis mediada por LPS, las células BMDM infectadas con *L. infantum*, volvieron a mostrar una mayor resistencia a morir por necroptosis a las 24 h, pero no a los 6 d, entendiendo que el patógeno retrasaba los procesos de muerte celular (Giri et al., 2016).

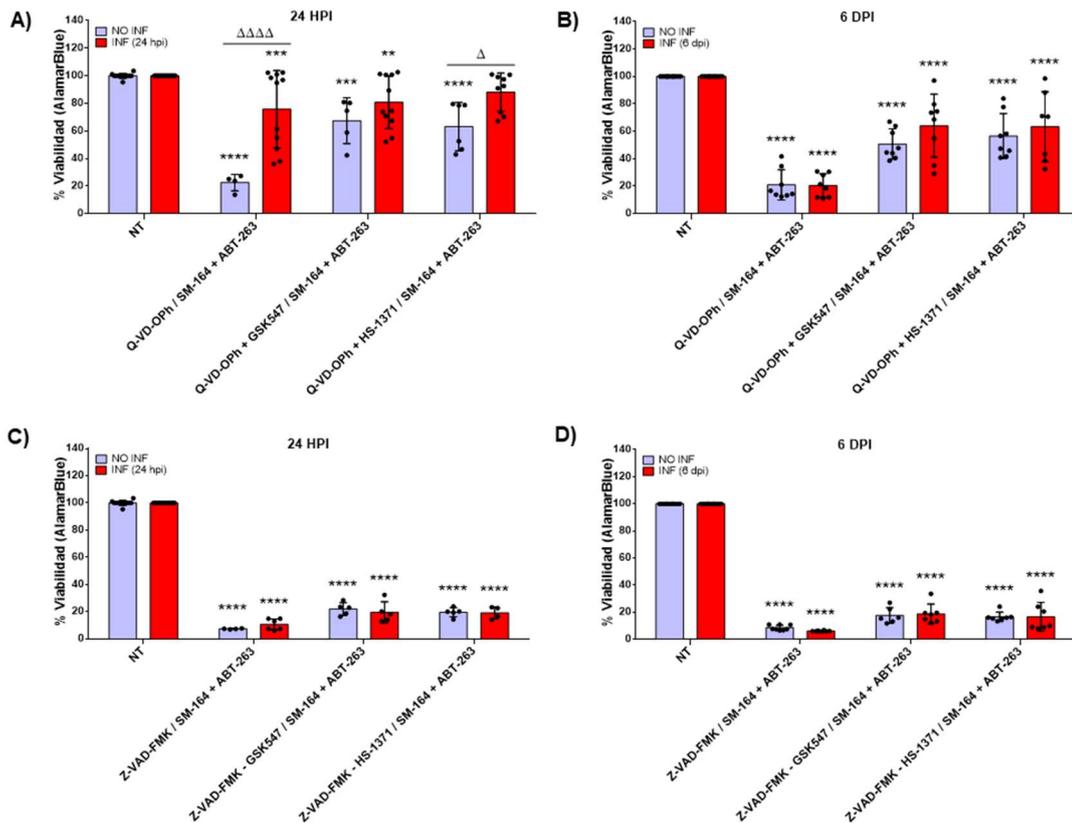


**FIGURA 55 | Viabilidad celular resultante del tratamiento de células BMDM con las combinaciones de compuestos inductores de necroptosis, mediante AlamarBlue tras (A) 24 h post-infección (24 hpi) y (B) 6 d post-infección (6 dpi) con *L. infantum*.** Las células fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M), GSK547 (5  $\mu$ M) y HS-1371 (2,5  $\mu$ M) durante 1 h y, posteriormente con SM-164 (1  $\mu$ M) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta$  ( $p < 0,01$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de viabilidad de BMDM infectados o no, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

Para demostrar que las rutas intrínseca y extrínseca de la muerte celular por apoptosis se encuentran interrelacionadas (Chen et al., 2019), realizamos experimentos de combinación de compuestos que inhibieran proteínas de ambas rutas en BMDM infectados o no, con amastigotes de *L. infantum* (FIGURA 56). En nuestro caso, combinamos el inhibidor de XIAP, SM-164 con el inhibidor de proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2, ABT-263. El ABT-263 (Navitoclax) es un agente antitumoral en fase experimental que se une a BCL-2, BCL-XL y BCL-W produciendo apoptosis en células senescentes, pero no en las no senescentes (Tse et al., 2008). El objetivo era producir un aumento de los niveles intracelulares de SMAC, intentando contrarrestar el papel inhibitorio de la muerte que presenta *Leishmania* en células tratadas únicamente con Z-VAD-FMK y SM-164. Parte de los niveles de SMAC procederían de la mitocondria tras la inducción del MOMP mediante el tratamiento de las células con ABT-263; la otra parte se estaría aportando mediante el mimético químico SM-164. Con estas combinaciones, se esperaba que el SMAC procedente de ambas vías tuviera una acción sinérgica que fuera más potente frente a la acción protectora de *Leishmania*.

La muerte por necroptosis se indujo añadiendo los inhibidores de caspasas Q-VD-OPh (FIGURA 56A y B) y Z-VAD-FMK (FIGURA 56C y D) a una concentración de 30 y 25  $\mu$ M, respectivamente, antes de la adición del resto de inhibidores al cultivo de células BMDM. Q-VD-OPh es un inhibidor pan-caspasa de amplio espectro con actividad antiapoptótica que previene la escisión y activación tanto de las caspasas iniciadoras como de las efectoras

(Caserta et al., 2003). La viabilidad de las células BMDM tratadas con ABT-263 y SM-164 en presencia de 30  $\mu\text{M}$  Q-VD-OPh fue de apenas el 20%, pudiendo ser prevenida tras el tratamiento con los inhibidores de RIPK1 y RIPK3. Al igual que ocurría anteriormente, las células BMDM infectadas con *L. infantum*, volvieron a mostrar una mayor resistencia a la muerte a las 24 h, pero no a los 6 d, entendiendo que el patógeno retrasaba los procesos de muerte celular (**FIGURA 56A y B**) (Giri et al., 2016).



**FIGURA 56 | Viabilidad celular resultante del tratamiento de células BMDM con las combinaciones de compuestos inductores de necroptosis, mediante alamarBlue tras (A, C) 24 h post-infección (24 hpi) y (B, D) 6 d post-infección (6 dpi) con *L. infantum*. (A-B) Las células fueron pre-tratadas con Q-VD-OPh (30  $\mu\text{M}$ ), GSK547 (5  $\mu\text{M}$ ) y HS-1371 (2,5  $\mu\text{M}$ ) durante 1 h y, posteriormente, las células fueron tratadas con SM-164 (1  $\mu\text{M}$ ) y ABT-263 (10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h. (C-D) Las células fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu\text{M}$ ), GSK547 (5  $\mu\text{M}$ ) y HS-1371 (2,5  $\mu\text{M}$ ) durante 1 h y, posteriormente con SM-164 (1  $\mu\text{M}$ ) y ABT-263 (10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0, 1$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de viabilidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.**

Debido a que Q-VD-OPh y Z-VAD-FMK presentan la misma función como inhibidores pan-caspasa, se esperaban resultados similares con ambos. Sin embargo, no fue así ya que en presencia de Z-VAD-FMK la viabilidad celular fue escasamente del 10%, no pudiendo ser revertida por los inhibidores de RIPK1 y RIPK3. En consecuencia, se puede afirmar que este

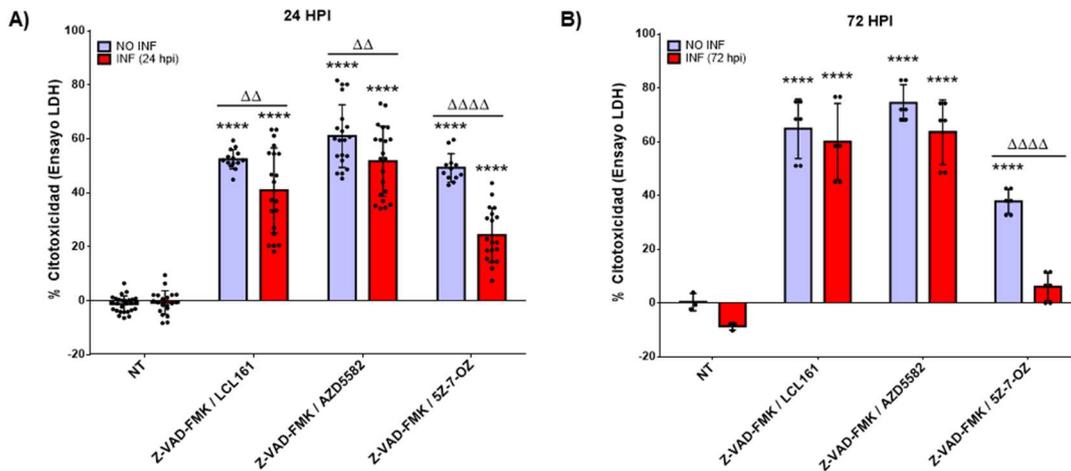
tipo de muerte no era necroptótica. Tampoco era una muerte celular apoptótica ya que las caspasas, necesarias para la muerte por apoptosis, se encontraban inhibidas por Z-VAD-FMK, por lo que se puede concluir que se está produciendo otro tipo de muerte celular, de mecanismo desconocido (**FIGURA 56C y D**).

Es importante señalar dos efectos diferenciadores con respecto a los resultados anteriores: i) esta elevada muerte celular por necroptosis era duradera en el tiempo y ii) no era prevenida por *L. infantum*, consiguiendo así el objetivo de combatir la acción del parásito (**FIGURA 56C y D**) (Giri et al., 2016).

Alternativamente a la viabilidad de los cultivos medida con alamarBlue, analizamos directamente la citotoxicidad producida por la inducción de la necroptosis, empleando el ensayo de LDH (Weidmann et al., 1995). Basándonos en los resultados de viabilidad obtenidos anteriormente, y viendo que la combinación del inhibidor de XIAP SM-164 con Z-VAD-FMK generaba condiciones de necroptosis en células BMDM, quisimos centrar la atención en otros inhibidores de IAPs. El compuesto SM-164 fue desestimado para posteriores estudios después de ver los resultados de McComb y col. en 2012 tras la administración *in vivo* de SM-164 en ratones *knockdown* para RIPK1 y RIPK3 infectados con *Listeria monocytogenes*. En este estudio se observó una muerte necroptótica específica de macrófagos, pero se vio comprometido el control de la infección, aumentando la carga parasitaria en bazo y peritoneo, con respecto a los animales tratados con el vehículo (McComb et al., 2012). De acuerdo con Lawlor y col. en 2017, la pérdida simultánea de las IAPs generaba mayores niveles de necroptosis. Esto podría ser explicado como que la falta de estas proteínas antiapoptóticas disparaba una muerte celular dependiente de RIPK3 y caspasa 8 (Lawlor et al., 2017).

Otra de las proteínas que podrían estar implicadas en la inmunosupresión causada por *Leishmania* es TAK1 (Srivastav et al., 2012; Saha et al., 2018; G. Saha et al., 2020). TAK1 es una serina/treonina quinasa que forma parte de la familia MAPK que actúa como mediador de la señal a TGF- $\beta$ . Se ha demostrado que TAK1 es capaz de activarse por diferentes estímulos, para después fosforilar a otras proteínas, generando así diferentes señales de transducción y respuestas celulares (Xu & Lei, 2021). Se ha demostrado que los inhibidores de TAK1, así como los miméticos de SMAC, promueven la muerte celular inflamatoria dependiente de caspasas 8 y 9 (Chen et al., 2019). En la **FIGURA 57** se muestran los resultados de citotoxicidad inducida en BMDM, infectadas o no con *L. infantum*, tras la combinación de compuestos que producen necroptosis tras 24 h (**FIGURA 57A**) y 72 h (**FIGURA 57B**) de infección. Se eligieron dos inhibidores de IAPs, LCL-161 – un inhibidor de XIAP y cIAP1 (Pemmaraju et al., 2021) – y AZD5582 – un inhibidor de XIAP, cIAP1 y cIAP2 (Moon et al., 2015). Además, se utilizó el 5Z-7-Oxozeaenol (5Z-7-OZ) como inhibidor de TAK1 (Ninomiya-Tsuji et al., 2003). Todos estos compuestos se combinaron con 25  $\mu$ M Z-VAD-FMK para seleccionar la muerte por necroptosis. Las diferentes combinaciones de compuestos fueron citotóxicas ( $p < 0.0001$ ) en comparación con las células no tratadas, aunque el efecto

fue menor con 5Z-7-OZ. Además, las células infectadas mostraron unos porcentajes de citotoxicidad significativamente menores a las no infectadas, sobre todo en la combinación Z-VAD-FMK/5Z-7-OZ, lo que supondría que *Leishmania* aporta una mayor resistencia a la muerte del hospedador. Igualmente, la citotoxicidad producida por AZD5582 fue mayor a la observada con LCL161, lo cual podría explicarse como que AZD5582 está inhibiendo tres proteínas IAPs (XIAP, cIAP1 y cIAP2) mientras que LCL161 sólo dos (XIAP y cIAP1).

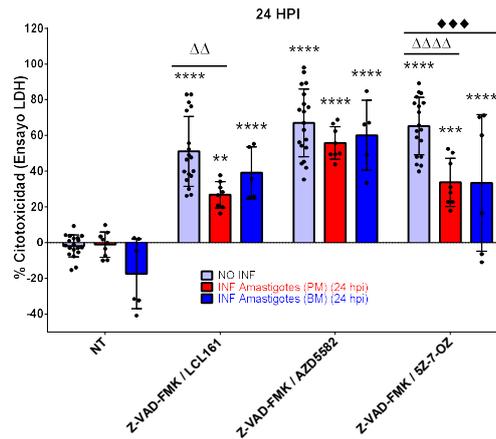


**FIGURA 57 | Citotoxicidad observada en cultivos BMDM mediante el ensayo LDH tras el tratamiento con compuestos inductores de necroptosis, 24 h (A) y 72 h después (B) de la infección con amastigotes de *L. infantum*.** Las células fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M) durante 3 h y, posteriormente, los BMDM fueron tratados con los inhibidores LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (250 nM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0.01$ );  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

#### 4.1.2. Inducción a la necroptosis en cultivos de macrófagos RAW 264.7

Los experimentos de muerte celular por necroptosis se llevaron a cabo también en cultivos celulares RAW 264.7, una línea celular macrófaga de ratón establecida a partir de un tumor inducido con el virus de la leucemia murina de Abelson (Raschke et al., 1975, 1978; ATCC, 2022). En este caso, las células fueron infectadas con amastigotes de *L. infantum* procedentes de diferentes orígenes: amastigotes diferenciados a partir de promastigotes (PM), incubados a 37°C en un medio de cultivo a pH 5,5 durante 5 d (De Muylder et al., 2011), o bien amastigotes extraídos de médula ósea de un ratón infectado (BM).

De la misma manera que en los experimentos realizados en BMDM, los macrófagos RAW 264.7 fueron tratados con 25  $\mu$ M Z-VAD-FMK en combinación con el inhibidor de XIAP y cIAP1, LCL161 (Pemmaraju et al., 2021), de XIAP, cIAP1 y cIAP2, AZD5582 (Moon et al., 2015) y de TAK1, 5Z-7-OZ (Ninomiya-Tsuji et al., 2003) (**FIGURA 58**).



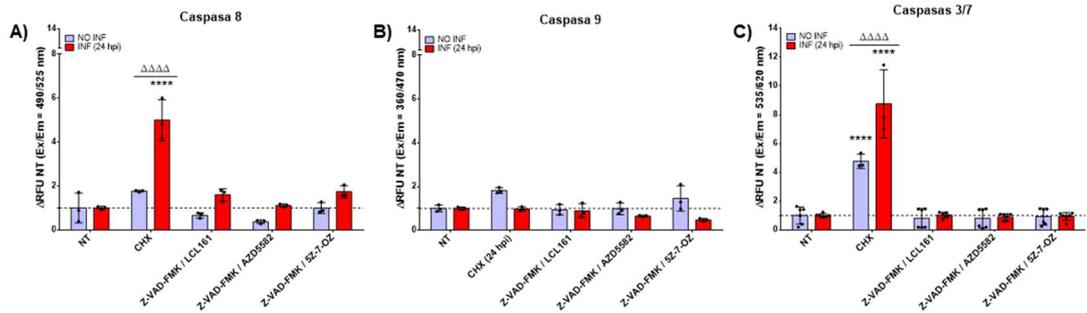
**FIGURA 58 | Citotoxicidad observada en cultivos RAW 264.7 mediante el ensayo LDH tras el tratamiento con compuestos inductores de necroptosis, 24 h después de la infección con amastigotes (PM) o amastigotes (BM) de *L. infantum*.** Las células fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M) durante 3 h y, posteriormente, con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD-5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (250 nM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.01$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectadas o no con amastigotes (PM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\blacklozenge\blacklozenge$  ( $p < 0.001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectadas o no con amastigotes (BM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

Tras evaluar el efecto de estos tratamientos en RAW 264.7 mediante el ensayo de liberación de LDH, estas combinaciones generaron porcentajes de citotoxicidad comprendidos entre el 40-60%, es decir, valores similares a los obtenidos en BMDM. De forma similar a lo que ocurría con BMDM, las células infectadas presentaban valores de citotoxicidad menores que las células no infectadas, independientemente del origen de los amastigotes PM o BM.

#### 4.1.3. Evaluación de la activación de caspasas en necroptosis

Para conocer el posible papel de las caspasas durante la necroptosis, se determinó la actividad enzimática relativa tanto de las caspasas iniciadoras (caspasas 8 y 9) como de las ejecutoras (caspasas 3/7). Como control positivo de activación de caspasas, se empleó cicloheximida (CHX) a una concentración de 10  $\mu$ g/mL (Tang et al., 1999). En la **FIGURA 59** se puede observar que únicamente las caspasas 3 y 7 (**FIGURA 59C**) se indujeron significativamente por el tratamiento de la CHX, pero no por los inhibidores de IAPs, LCL161 y AZD5582, ni por el inhibidor de TAK1 5Z-7-OZ, en presencia del inhibidor pan-caspasa Z-VAD-FMK (Smith et al., 1980; Van Noorden, 2001). No se observaron cambios en la actividad de las caspasas 8 (**FIGURA 59A**) y 9 (**FIGURA 59B**), ni en presencia de CHX ni de los inhibidores de necroptosis. Sin, embargo, sí se observó una inducción significativa de caspasa

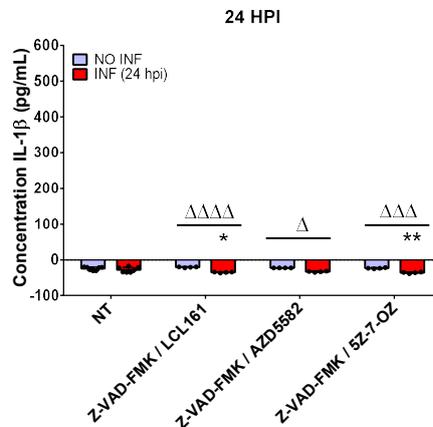
8 y caspasas 3 y 7 en las células infectadas y tratadas con CHX, por lo que se podría concluir que la CHX desencadenaría la ruta extrínseca de la apoptosis.



**FIGURA 59 | Determinación de las actividades caspasa 8 (A), caspasa 9 (B) y caspasas 3/7 (C) tras el tratamiento de BMDM con inductores de necroptosis** tras 24 h de infección con *L. infantum*. Las células fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25 μM) durante 3 h y, posteriormente, los BMDM fueron tratados con los inhibidores LCL161 (1 μM), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (TAK) (250 nM) durante 24 h. Como control positivo de apoptosis, se trató a las células durante 24 h con CHX (10 μg/mL) tras 24 h post-infección con *L. infantum*. Cada barra del histograma representa la Media ± SD \*\* (p < 0.01); \*\*\*\* (p < 0.0001) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos ΔΔΔΔ (p < 0.0001) resultan de comparar el incremento sobre el NT de Unidades Relativas de Fluorescencia (ΔRFU) de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

**4.1.4. Evaluación de la producción de IL-1β en necroptosis**

Siendo la necroptosis una ruta de muerte celular de tipo inflamatorio (Dhuriya & Sharma, 2018), se quisieron cuantificar los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-1β tras el tratamiento con los compuestos inductores de necroptosis. Los resultados obtenidos tras la cuantificación mediante ELISA mostraron valores muy similares de IL-1β entre los grupos tratados y el control NT (**FIGURA 60**). Estos valores eran esperables, ya que el procesamiento de la forma inmadura de IL-1β, requiere de la intervención de caspasas que estaban siendo inhibidas por Z-VAD-FMK.



**FIGURA 60 | Niveles de IL-1β en los sobrenadantes de los cultivos de células BMDM infectados o no con *Leishmania* durante 24 h con las combinaciones de inductores de necroptosis.** Los

cultivos de BMDM fueron pretratados con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M) durante 3 h y, posteriormente con los inhibidores LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (250 nM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0.1$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.001$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

#### 4.1.5. Efecto de los DAMPs producidos en necroptosis sobre sobre la viabilidad de *L. donovani* LV9 iRFP

La muerte celular inmunogénica ICD (del inglés, *Immunogenic Cell Death*) incluye, entre otras, la apoptosis y la necroptosis. Una de las características de la ICD es que está mediada por DAMPs, citoquinas y quimiocinas. En condiciones normales, estas moléculas se encuentran involucradas en procesos intracelulares fundamentales y, normalmente, no son reconocidas por el sistema inmune. Pero durante la ICD, estas moléculas son liberadas al medio extracelular, donde son reconocidas por sus correspondientes receptores de reconocimiento de DAMPs, generando la activación del sistema inmune innato y adaptativo (Green et al., 2009; Krysko et al., 2012; Catanzaro et al., 2022).

Mientras la muerte celular fisiológica no es inmunógena, la muerte celular inducida por patógenos puede ser inmunogénica y, por lo tanto, es susceptible de desencadenar una respuesta inmunitaria contra los antígenos que se derivan de células en camino de la muerte y ser presentados por las DCs. Por lo tanto, ciertos patógenos intracelulares obligados podrían haber desarrollado estrategias para evitar este tipo de muerte (Kepp et al., 2009).

Actualmente, la ICD se ha convertido en una de las estrategias terapéuticas emergentes de la inmunoterapia contra el cáncer. Fundamentándonos en estos estudios, nuestro objetivo se ha centrado en desarrollar un tratamiento que genere una respuesta inmunogénica frente *Leishmania*. Para activar las DCs, estas células se primaron con lisados de *Leishmania* y con macrófagos tratados con inhibidores de proteínas antiapoptóticas, como algunos integrantes de la familia BCL-2 o las IAPs, con el fin de desencadenar en ellos ICD, provocando la liberación de DAMPs y de citoquinas pro-inflamatorias.

Tras conseguir distintas condiciones de muerte en los macrófagos, tanto en BMDM como en RAW 264.7, quisimos saber si había diferencias entre unos tratamientos y otros a la hora de tratar los explantes infectados con esplenocitos activados con las diferentes combinaciones de compuestos.

Otro aspecto importante que quisimos analizar fue el papel jugado por distintas estirpes de ratón: C57BL/6 y BALB/c. Estas estirpes se emplean comúnmente para estudios de inmunorregulación en varios modelos de enfermedades ya que, en los ratones C57BL/6, la respuesta inmunitaria Th1 y la producción de IFN- $\gamma$  son dominantes, y en los ratones BALB/c existe una polarización de citoquinas de tipo Th2 (Heinzel et al., 1989; Stewart et al., 2002).

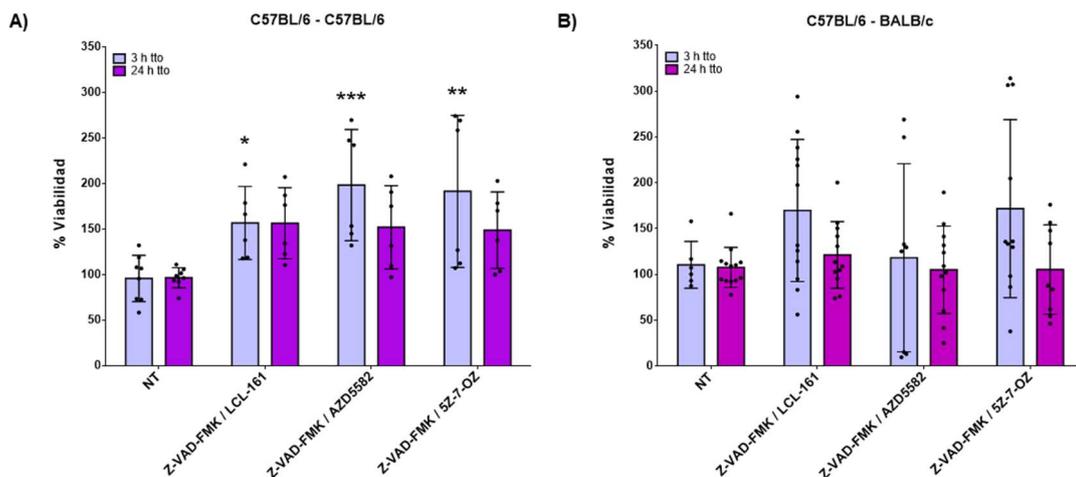
Además de sus distintas respuestas de células T, los macrófagos de estos ratones ejercen diferentes reacciones en respuesta a diferentes estímulos. La evidencia reciente indica que el equilibrio entre los macrófagos M1/M2 y los linfocitos Th1/Th2 es crucial para la resolución de muchas enfermedades infecciosas, incluida la leishmaniasis (Mills et al., 2000).

La modificación genética introducida en *Leishmania* para que exprese la proteína iRFP nos permitió medir la fluorescencia infrarroja emitida por el explante infectado, proporcionándonos así los datos necesarios para el cálculo de la viabilidad de los parásitos.

#### 4.1.5.1. DAMPs producidos durante la necroptosis en BMDM

El objetivo de este apartado era conocer el efecto de las DAMPs procedentes de BMDM inducidas a la ICD por compuestos que producen necroptosis sobre la supervivencia de amastigotes intramacrofágicos de *L. donovani* LV9 iRFP. Para ello, esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos se cultivaron con un lisado de amastigotes y BMDM tratados con inductores de necroptosis (LCL-161, AZD5582 y 5Z-7-OZ en presencia de un inhibidor pancaspasa) a las concentraciones y tiempos indicados (**FIGURA 61**), tras lo cual, se añadieron a un cultivo de esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 o BALB/c infectados con la cepa infrarroja de *Leishmania*.

Los resultados de la **FIGURA 61A** muestran los cambios significativos en la viabilidad de los amastigotes intracelulares del explante infectado de ratones C57BL/6 cuando fueron expuestos a los DAMPs procedentes de BMDM inducidos a ICD durante 3 y 24 h, donde los valores obtenidos son superiores a los del control NT. Sin embargo, los resultados de estas combinaciones en la viabilidad de los amastigotes intracelulares de explantes infectados de ratones BALB/c (**FIGURA 61B**) no mostraron ningún cambio significativo con respecto al control.



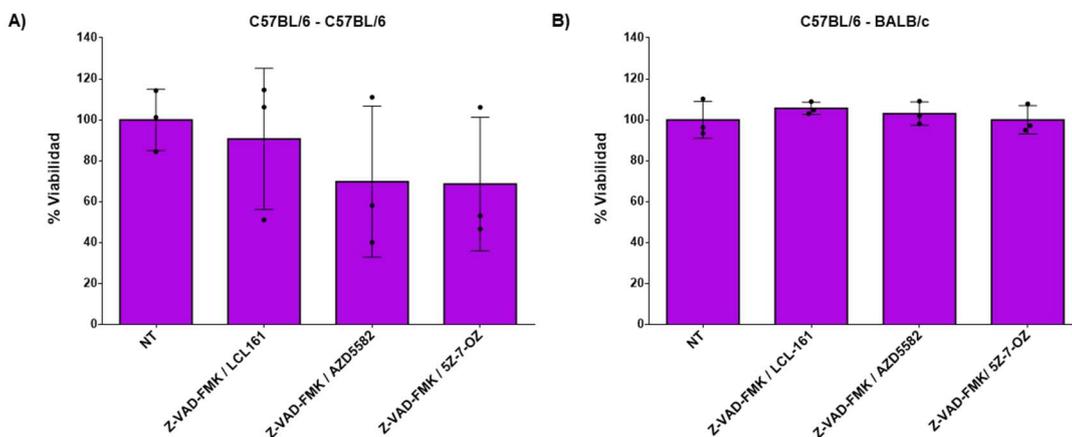
**FIGURA 61 | Viabilidad (% RFU) de amastigotes de *L. donovani* LV9 iRFP procedentes de explantes de bazo de ratones infectados.** Los esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos fueron pre-estimulados con un lisado de amastigotes de la cepa *L. donovani* LV9, P3C (500 ng/mL) y BMDM tratados con compuestos inductores de necroptosis. Los BMDM fueron pre-tratados con Z-VAD-

FMK (25  $\mu$ M) durante 3 h y, posteriormente con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (TAK) (250 nM) durante 24 h. Los esplenocitos fueron co-cultivados con explantes infectados de ratones **(A)** C57BL/6 o **(B)** BALB/c. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples.

#### 4.1.5.2. DAMPs producidos durante la necroptosis en RAW 264.7

Alternativamente, utilizamos células RAW 264.7 inducidas a la ICD por compuestos como estímulo a los esplenocitos sanos (**FIGURA 62**). De la misma manera que en los experimentos anteriores, el cultivo RAW 264.7 fue tratado durante 24 h con inductores de necroptosis (AZD5582 y 5Z-7-OZ en presencia de un inhibidor pan-caspasa) a las concentraciones y tiempos indicados en la **FIGURA 62**, junto con un lisado de amastigotes, se cocultivaron con esplenocitos procedentes de ratones sanos de la cepa C57BL/6. Finalmente, estas células se cocultivaron con explantes de ratones C57BL/6, o BALB/c, infectados con *L. donovani* LV9 iRFP, y se midió la fluorescencia infrarroja como medida de la viabilidad del patógeno.

En la **FIGURA 62A**, se muestra que los DAMPs proporcionados por RAW 264.7 añadidos a esplenocitos C57BL/6 procedentes de ratones sanos, no alteraron significativamente la viabilidad de los amastigotes intracelulares de los esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 con respecto a los controles sin tratar.



**FIGURA 62 | Viabilidad (% RFU) de amastigotes de *L. donovani* LV9 iRFP procedentes de explantes de bazo de ratones infectados.** Los esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos fueron pre-estimulados con un lisado de amastigotes de la cepa *L. donovani* LV9, P3C (500 ng/mL) y células RAW 264.7 tratadas con compuestos inductores de necroptosis. Las células RAW 264.7 fueron pre-tratadas con Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M) durante 3 h y, posteriormente con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (TAK) (250 nM) durante 24 h. Los esplenocitos fueron co-cultivados con explantes infectados de ratones **(A)** C57BL/6 o **(B)** BALB/c. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples.

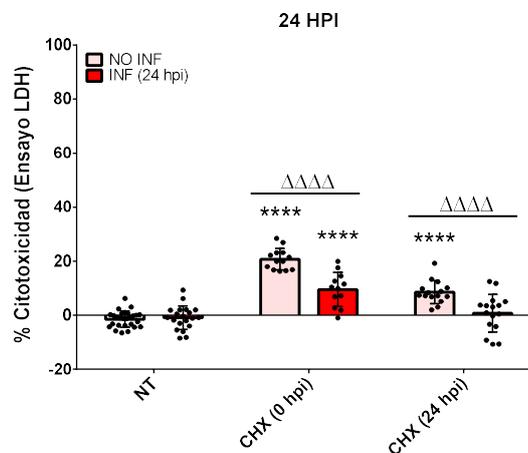
Por su parte, en la **FIGURA 62B** se observa que, de la misma manera que en ratones C57BL/6 infectados, los DAMPs proporcionados por RAW 264.7 añadidos a esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos, no se producían cambios en la viabilidad de los amastigotes intracelulares de *L. donovani* LV9 iRPF presentes en esplenocitos de ratones BALB/c, medidos por la emisión de fluorescencia infrarroja.

## 4.2. CAPÍTULO II: APOPTOSIS INTRÍNSECA.

Según el estudio de Vince y col. en 2018, las proteínas antiapoptóticas BCL-XL y MCL-1 restringen la activación pro-inflamatoria de IL-1 $\beta$  inducida por BAX/BAK (Vince et al., 2018). BAX/BAK son proteínas que forman parte de la familia BCL-2 y son uno de los reguladores principales de la ruta intrínseca de la apoptosis. Tras un estímulo apoptótico, BAX y BAK son activadas y se oligomerizan en la membrana mitocondrial externa para mediar su permeabilización, la cual es considerada uno de los pasos clave en la apoptosis (Peña-Blanco & García-Sáez, 2018). Por consiguiente, si BCL-XL y MCL-1 se encuentran inhibidas, BAX/BAK pueden desencadenar un proceso apoptótico intrínseco mediado por caspasa 8, la cual escinde y activa a IL-1 $\beta$  (Vince et al., 2018).

### 4.2.1. Inducción a la apoptosis intrínseca por CHX en BMDM

La CHX (Actidiona) es un antibiótico producido por *Streptomyces griseus* (Baliga et al., 1969). Su efecto fue estudiado por primera vez por Kerridge en 1958, que demostró que la CHX inhibía la síntesis de proteínas en levaduras (Kerridge, 1958). La CHX se usó como inductor de referencia de la apoptosis, tanto en combinación con TNF- $\alpha$ , o por sí sola, mediante un mecanismo dependiente de FADD (Tang et al., 1999). Se ha observado además que la muerte producida por CHX es dependiente de las proteínas proapoptóticas BAX/BAK, ya que es capaz de producir una reducción en los niveles de MCL-1 (Goodall et al., 2016). Al inducir con CHX, nos basamos en el estudio de Giri y col., donde las células infectadas con *L. donovani* se trataban con actinomicina D a distintos tiempos de infección. Se observó que las células infectadas a 0 h eran sensibles a la actinomicina D, pero se volvían resistentes a las 2 h (Giri et al., 2016). Por ello, BMDM fueron tratadas con CHX tras 0 y 24 h de infección (**FIGURA 63**).



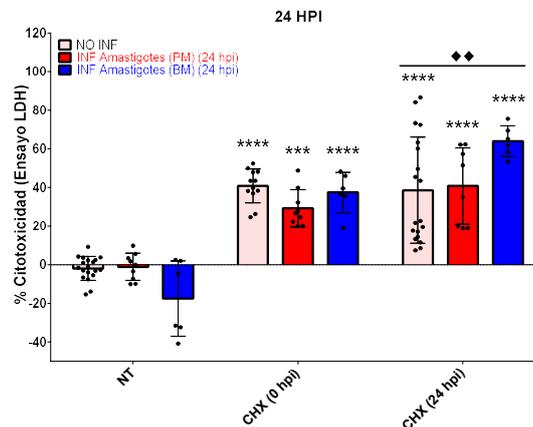
**FIGURA 63 | Citotoxicidad producida por el tratamiento de BMDM con CHX (10  $\mu$ g/mL) mediante el ensayo LDH. Las células fueron tratadas durante 24 h, tras 0 y 24 h de infección con *L. infantum*.**

Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

A las 24 h, las células infectadas mostraban una mayor resistencia a la muerte, presentando valores de citotoxicidad próximos al control negativo. Tras 0 h de infección, se vio que la muerte celular era mayor que a las 24 h post-infección, por lo que la presencia del parásito podría estar retrasando la muerte del macrófago, confirmándose así lo establecido en el estudio anterior (Giri et al., 2016).

#### 4.2.2. Inducción a la apoptosis intrínseca por CHX en RAW 264.7

De la misma manera que con cultivos BMDM, se indujo la apoptosis por exposición a CHX en las mismas condiciones y tiempos que en el cultivo primario. La **FIGURA 64** muestra que tras añadir a un cultivo de células RAW 264.7 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CHX se produjeron unos valores de citotoxicidad significativos en comparación con las células no tratadas. Sin embargo, se observó que la citotoxicidad tras el tratamiento a las 0 h de infección no varió sustancialmente con respecto al de las 24 h post-infección. Asimismo, cabe destacar que los macrófagos infectados con amastigotes (BM) eran más susceptibles a la muerte que los infectados con amastigotes (PM).



**FIGURA 64 | Citotoxicidad producida por el tratamiento de RAW 264.7 con CHX (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mediante el ensayo LDH.** Las células fueron tratadas durante 24 h tras 0 y 24 h de infección con amastigotes (PM) o amastigotes (BM) de *L. infantum*. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Se compararon los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectados y no infectados con amastigotes (PM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\blacklozenge\blacklozenge$  ( $p < 0.01$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectadas y no infectadas con amastigotes (BM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

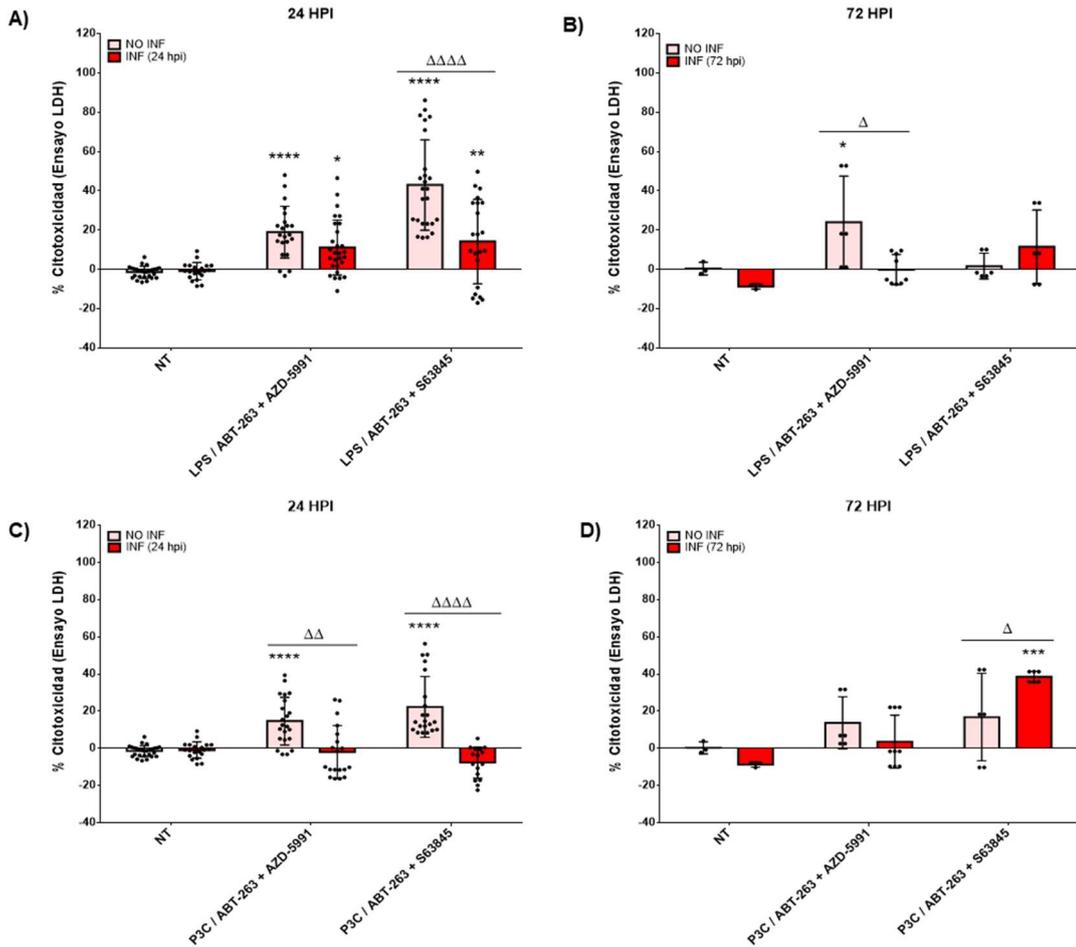
En comparación con los resultados obtenidos en células primarias (20%) (**FIGURA 63**), la línea celular RAW 264.7 presentó valores citotoxicidad >40% tras el tratamiento con CHX.

#### 4.2.3. Inducción a la apoptosis intrínseca por inhibidores en BMDM

En el caso de macrófagos murinos, a diferencia de otras células como los neutrófilos y los macrófagos humanos diferenciados de monocitos, la inhibición de MCL-1 no es suficiente para inducir muerte celular, y al menos se requiere una señal adicional para disparar MOMP. Esto se vio reflejado en estudios con macrófagos procedentes de ratones que presentaban una deficiencia en la expresión de la proteína MCL-1, los cuales mostraron una supervivencia normal, además de un aumento de la expresión de las proteínas BCL-2 y BCL-XL. Sin embargo, en macrófagos y neutrófilos humanos en los que se había inhibido la expresión de MCL-1 mediante oligonucleótidos antisentido, se inducía apoptosis (Dzhagalov et al., 2007). Esto fue observado de la misma manera por Vince et al. en 2018, donde tanto MCL-1 como BCL-XL eran requeridas para la supervivencia de los macrófagos, ya que BMDM tratados con el mimético BH3 ABT-737 no eran susceptibles a la muerte. Sin embargo, cuando el tratamiento consistía en una combinación de este compuesto con inhibidores de MCL-1, como CHX, sí se producía un proceso apoptótico mediado por la activación de caspasas (Vince et al., 2018).

Por lo tanto, para inducir apoptosis intrínseca en BMDM, se combinó un inhibidor de la proteína BCL-XL, ABT-263 (Tse et al., 2008), con dos inhibidores de MCL-1, AZD-5991 (Tron et al., 2018) y S63845 (Kotschy et al., 2016) (**FIGURA 65**) en cultivos de BMDM infectados o no con amastigotes de *L. infantum*.

Previamente al tratamiento de BMDM con las distintas combinaciones de compuestos, las células se primaron con LPS (Vince et al., 2018) (**FIGURA 65A y B**) y con el lipopéptido sintético bacteriano P3C (**FIGURA 65C y D**), que es reconocido por el TLR2/1 de los macrófagos. En varios estudios, se ha relacionado TLR2 con *Leishmania* (Murray et al., 2013; Jafarzadeh et al., 2019). Este receptor tiene diversos roles ya que, dependiendo de la especie de *Leishmania*, el tropismo tisular de la infección y el reclutamiento de ciertos intermediarios de señalización puede generar una respuesta protectora del hospedador o generar una exacerbación de la enfermedad. Concretamente, TLR2 parece mostrar una función protectora contra la expansión de *L. infantum* en los órganos diana infectados (Jafarzadeh et al., 2019).

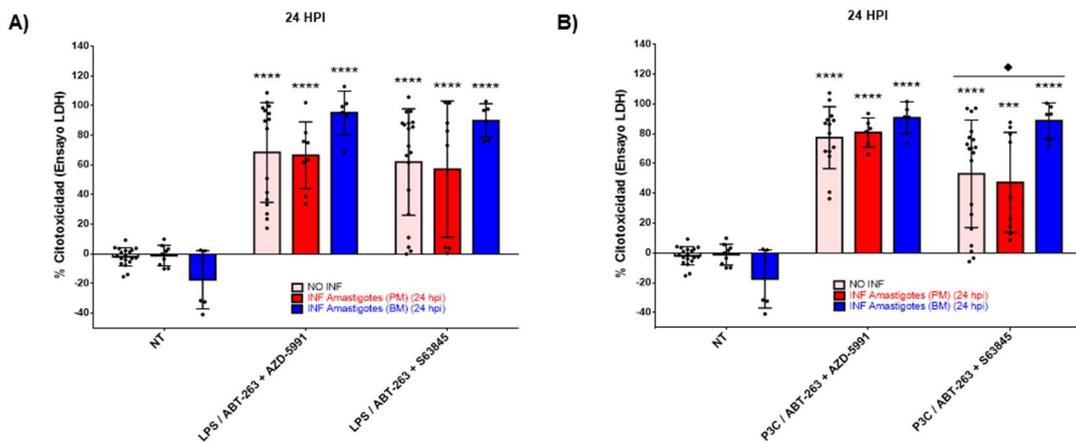


**FIGURA 65 | Citotoxicidad observada en cultivos BMDM mediante el ensayo LDH tras el tratamiento con compuestos inductores de apoptosis intrínseca, 24 h (A, C) y 72 h (B, D) después de la infección con amastigotes de *L. infantum*.** Las células fueron pre-tratadas durante 3 h con 50 ng/mL de LPS (A-B) o 500 ng/mL de P3C (C-D) y, posteriormente, los BMDM fueron tratados con el inhibidor ABT-263 (1  $\mu$ M) en combinación con AZD-5991 (10  $\mu$ M) o S63845 (10  $\mu$ M) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0.1$ );  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.01$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

Las combinaciones de tratamientos se probaron en células BMDM infectadas durante 24 h (FIGURA 65A y C) y 72 h (FIGURA 65B y D). Los porcentajes de citotoxicidad – medida como liberación de LDH – en las células infectadas durante 72 h eran ligeramente más bajos que en las células infectadas durante 24 h y, como ocurría anteriormente, las células infectadas presentaban valores de citotoxicidad menores que las células no infectadas. Estas dos variables nos hacen suponer que la infección por *L. infantum* genera más resistencia al efecto citotóxico de los compuestos.

#### 4.2.4. Inducción a la apoptosis intrínseca por inhibidores en RAW 264.7

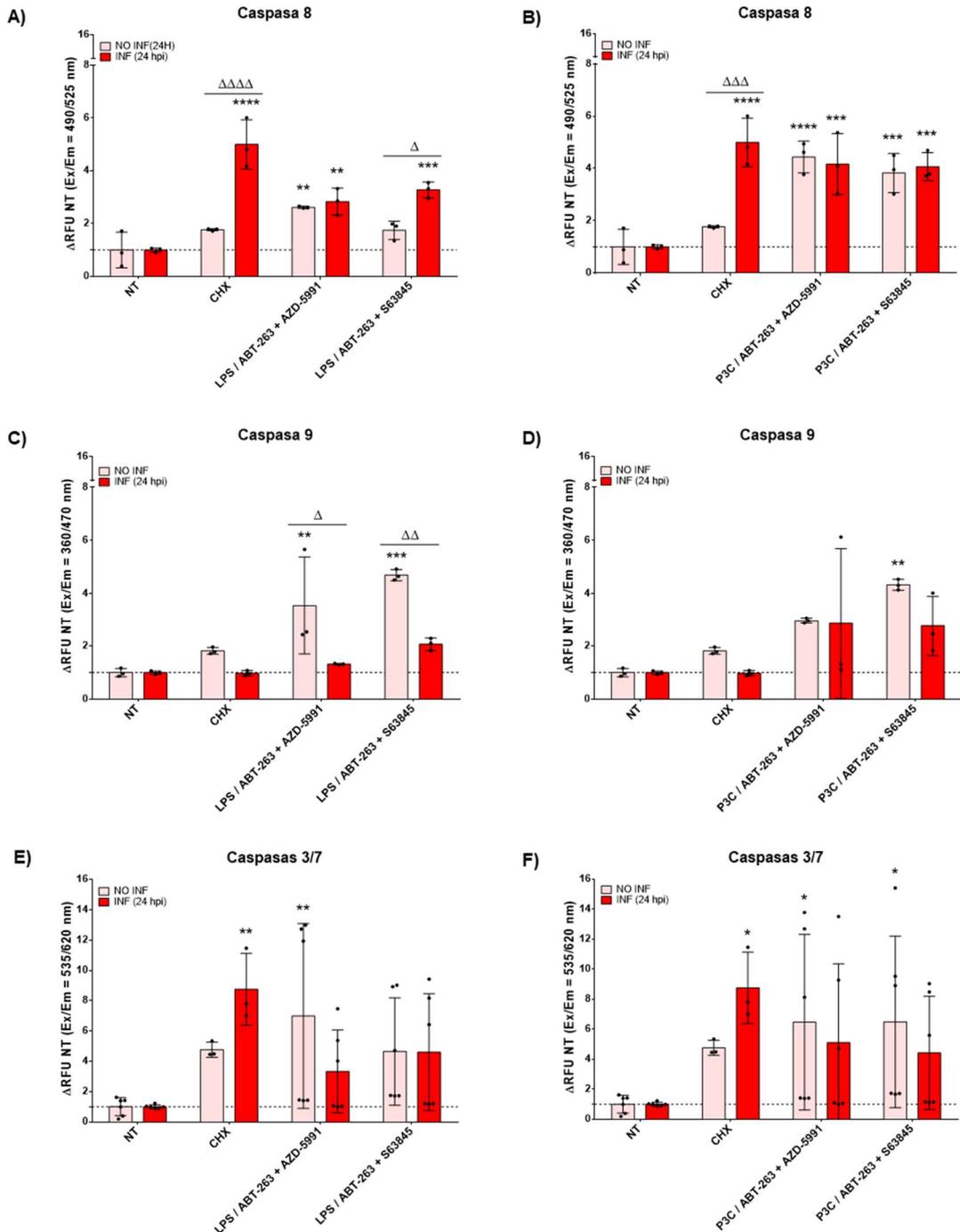
Para estudiar la apoptosis intrínseca, los macrófagos RAW 264.7 fueron tratados con ABT-263 (Tse et al., 2008) en combinación con AZD-5991 (Tron et al., 2018) o S63845 (Kotschy et al., 2016) (**FIGURA 66**). Las células fueron primadas con LPS (**FIGURA 66A**) o con P3C (**FIGURA 66B**). Los porcentajes de citotoxicidad obtenidos para RAW 264.7 tras 24 h de tratamiento fueron mayores (50-80%) a los obtenidos con BMDM (20-40%). En este caso, no se observaron diferencias significativas entre las células no infectadas y las células infectadas con amastigotes (PM), aunque sí cabe destacar que las células infectadas con los amastigotes (BM) presentaron valores más altos que las no infectadas o las infectadas con amastigotes (PM). Asimismo, el efecto del ABT-263 combinado con el AZD-5991 produjo mayores tasas de muerte que cuando se combinó con el S63845. No se observaron diferencias significativas al primar los macrófagos con LPS o con P3C.



**FIGURA 66 | Citotoxicidad observada en cultivos RAW 264.7 mediante el ensayo de LDH tras el tratamiento con compuestos inductores de apoptosis intrínseca, 24 h después de la infección con amastigotes (PM) o amastigotes (BM) de *L. infantum*.** Las células fueron pre-tratadas durante 3 h con 50 ng/mL de LPS (**A**) y 500 ng/mL de P3C (**B**) y, posteriormente tratadas con ABT-263 (1  $\mu$ M) combinado con AZD-5991 (10  $\mu$ M) o S63845 (10  $\mu$ M) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Se compararon los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectados o no, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. Los símbolos ♦ ( $p < 0,1$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectadas o no con amastigotes (BM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

#### 4.2.5. Evaluación de la activación de caspasas en la apoptosis intrínseca

Tras realizar los diferentes tratamientos para generar apoptosis intrínseca en macrófagos BMDM, se midió la actividad de las caspasas iniciadoras y ejecutoras (**FIGURA 67**).



**FIGURA 67 | Determinación de las actividades caspasa 8 (A, B), caspasa 9 (C, D) y caspasas 3/7 (E, F), tras el tratamiento de BMDM con las combinaciones de inductores de apoptosis intrínseca a las 24 h de infección con *L. infantum*. Las células BMDM fueron pretratados durante 3 h con 50 ng/mL LPS (A, C, E) y 500 ng/mL de P3C (B, D, F) y, posteriormente se añadió el inhibidor ABT-263 (1 μM) en combinación con AZD-5991 (10 μM) o S63845 (10 μM) durante 24 h. Como control positivo de apoptosis, se trataron las células con 10 μg/mL CHX durante 24 h a las 24 h post-infección con *L. infantum*. Cada barra del histograma representa la Media ± SD \* (p < 0.1); \*\* (p < 0.01); \*\*\* (p < 0.001); \*\*\*\* (p < 0.0001) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos Δ (p < 0.1); ΔΔ (p < 0.01); ΔΔΔ (p < 0.001); ΔΔΔΔ (p < 0.0001) resultan de comparar el incremento sobre el NT de Unidades Relativas de Fluorescencia (ΔRFU) de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.**

En general, se pudo observar una inducción generalizada de los tres tipos de caspasas como consecuencia de los tratamientos con CHX, LPS y P3C. Cuando las células no infectadas fueron primadas con LPS (**FIGURA 67A**), los niveles de caspasa 8 fueron significativamente mayores en la combinación de ABT-263 con AZD-5991, pero no con S63845. Sin embargo, el pretratamiento con P3C (**FIGURA 67B**), generó siempre valores significativamente mayores con respecto al control. No hubo grandes diferencias entre las células infectadas y las no infectadas, salvo en la combinación de LPS, ABT-263 y S63845, ya que las células infectadas producen una activación de la caspasa 8 mayor que las células no infectadas.

En las **FIGURA 67C** y **D** se observa cómo la actividad de la caspasa 9 aumentó significativamente con respecto al control no tratado, confirmándose así su papel en la vía intrínseca de la apoptosis (Li et al., 2017). Cabe resaltar que las diferencias entre células infectadas y no infectadas fueron significativamente mayores cuando las células eran primadas con LPS, pero no con P3C, por lo que la infección parece bloquear la activación de la caspasa 9.

La activación de las caspasas 3/7 (**FIGURA 67E** y **F**) fue mayor después del tratamiento con las dos combinaciones de inhibidores estudiadas. Los valores de actividad fueron similares o ligeramente superiores a los del control con CHX. En este caso, las células infectadas presentaron menor activación de las caspasas en comparación con las células no infectadas, pero no suponían diferencias significativas.

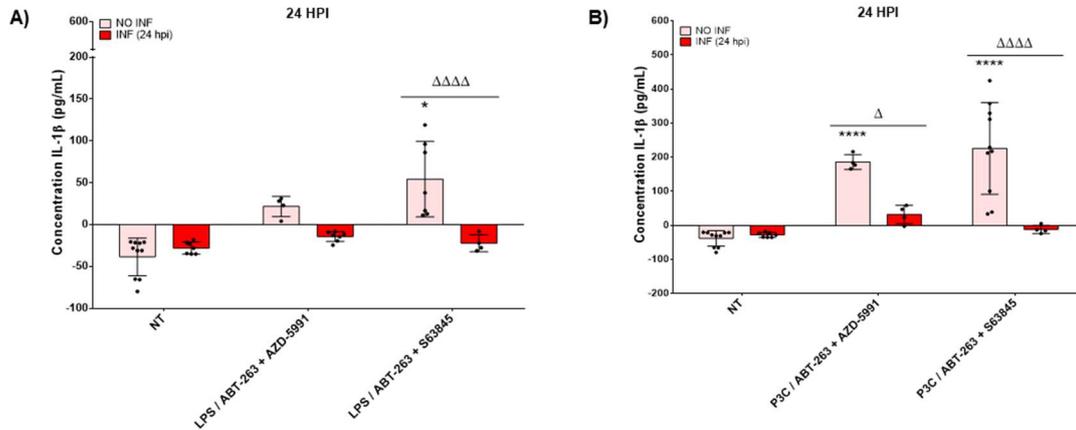
#### 4.2.6. Evaluación de la producción de IL-1 $\beta$ en la apoptosis intrínseca

La apoptosis está considerada como un tipo de muerte celular inmunológicamente silenciosa (Poon et al., 2014). Sin embargo, varias investigaciones han indicado que la apoptosis puede ser un potente mediador de la inflamación, tanto *in vitro* como *in vivo* (Faouzi et al., 2001; Bossaller et al., 2012). Existen varios estudios que confirman que la apoptosis intrínseca puede disparar la señalización pro-inflamatoria a través de la maduración de IL-1 $\beta$  (England et al., 2014; Chauhan et al., 2018; Vince et al., 2018).

Los miméticos de BH3, como ABT-263, AZD-5991 y S63845, son capaces de desencadenar la producción de IL-1 $\beta$  a través de las proteínas pro-apoptóticas BAX/BAK. BAX/BAK son capaces de activar las caspasas 3 y 7 y éstas, a su vez, pueden llevar a cabo la escisión de la caspasa 8, provocando su activación. Además, la caspasa 8 es la proteasa principal para catalizar la maduración de IL-1 $\beta$  durante la apoptosis intrínseca (England et al., 2014; Chauhan et al., 2018; Vince et al., 2018).

Los niveles de IL-1 $\beta$  obtenidos tras generar condiciones de apoptosis intrínseca se recogen en la **FIGURA 68**. La concentración de IL-1 $\beta$  obtenida con la combinación de ABT-263 con S63845 fue superior a la obtenida combinando ABT-263 con AZD-5991, tanto en el pretratamiento con LPS (**FIGURA 68A**) como con P3C (**FIGURA 68B**). Sin embargo, los

niveles alcanzados con P3C fueron superiores a los obtenidos con LPS. Cabe destacar que las células infectadas con *Leishmania* presentaron valores de IL-1 $\beta$  significativamente inferiores a los de las células no infectadas, excepto en la combinación de LPS, ABT-263 y AZD-5991, donde los valores son similares al control.



**FIGURA 68 | Niveles de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes de cultivos BMDM, infectados o no con *Leishmania*, tras el tratamiento durante 24 h con las combinaciones de compuestos inductores de apoptosis intrínseca.** Las células BMDM fueron pretratadas durante 3 h con 50 ng/mL de LPS (A) y 500 ng/mL de P3C (B) y, posteriormente, se les añadió ABT-263 (1  $\mu$ M) en combinación con AZD-5991 (10  $\mu$ M) o S63845 (10  $\mu$ M) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0.1$ )  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

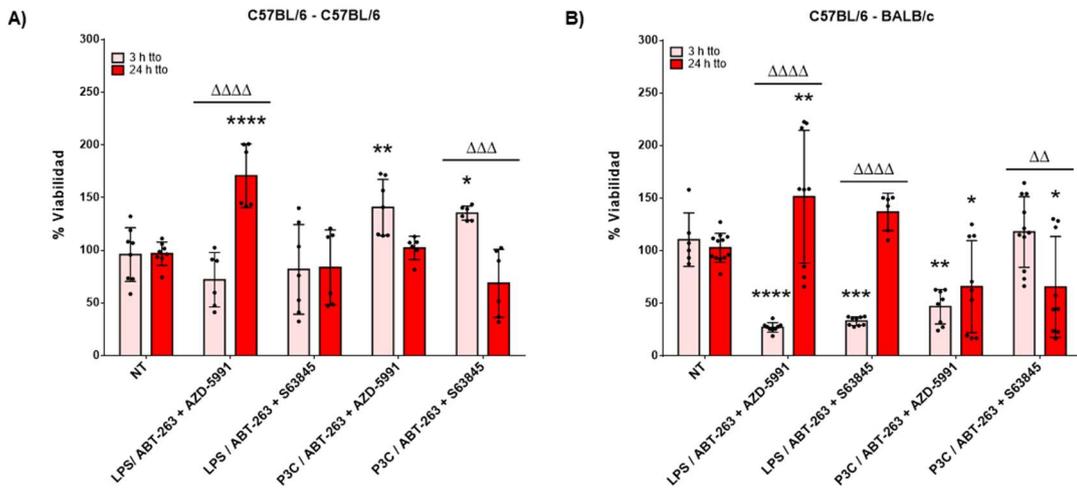
#### 4.2.7. Efecto de los DAMPs producidos en el proceso de apoptosis intrínseca sobre la viabilidad de *L. donovani* LV9 iRFP

##### 4.2.7.1. DAMPs producidos durante la apoptosis intrínseca en BMDM

Siguiendo una aproximación semejante, se ha estudiado el efecto de los DAMPs procedentes de BMDM inducidos a la apoptosis intrínseca sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *L. donovani* LV9 iRFP (FIGURA 69). De la misma manera que en los experimentos anteriores, la apoptosis intrínseca en BMDM se indujo con LPS o P3C en presencia de ABT-263 y AZD-5991 o S63845, durante un periodo de 3 o 24 h. Los BMDM camino de la muerte se cultivaron con explantes de bazo sanos de ratones C57BL/6, midiéndose el efecto letal sobre la fluorescencia emitida por esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 (FIGURA 69A) o BALB/c (FIGURA 69B) infectados con *L. donovani* LV9 iRFP.

Los resultados de la FIGURA 69A, demuestran que no hubo diferencias en los porcentajes de viabilidad de los amastigotes cuando la estirpe de esplenocitos murinos

estimulados con BMDM a los que se había inducido ICD era la misma que la estirpe receptora infectada con *Leishmania* (C57BL/6). Sí se observaron ciertas diferencias significativas entre los distintos tiempos de tratamiento, excepto en la combinación de LPS, ABT-263 y S63845, en la que no se observó alteración alguna en la mortalidad de los parásitos, sino más bien al contrario, su viabilidad estaba incrementada con respecto al control No Tratado (NT).



**FIGURA 69 | Viabilidad (% RFU) de amastigotes de *L. donovani* LV9 iRFP procedentes de explantes de bazo de ratones infectados.** Los esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos fueron pre-estimulados con un lisado de amastigotes de la cepa *L. donovani* LV9, P3C (500 ng/mL) y BMDM tratados con inductores de apoptosis intrínseca. Los BMDM fueron pre-tratados con LPS (50 ng/mL) o con P3C (500 ng/mL) durante 3 h y, posteriormente con ABT-263 (1  $\mu$ M) en combinación con AZD-5991 (10  $\mu$ M) o S63845 (10  $\mu$ M) durante 3 h y 24 h. Los esplenocitos fueron co-cultivados con explantes infectados de ratones **(A)** C57BL/6 o **(B)** BALB/c. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.01$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.001$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de viabilidad de BMDM tratadas durante 3 h y 24 h mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

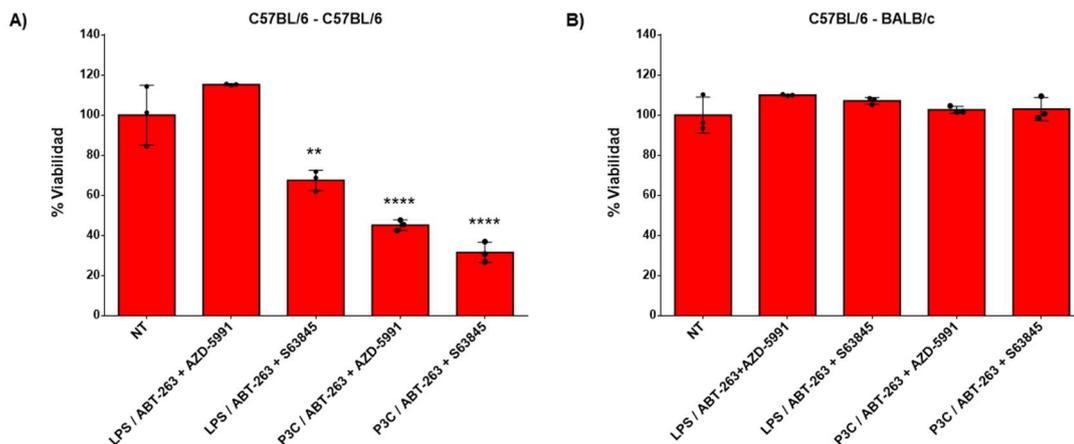
Sin embargo, si los esplenocitos de C57BL/6 estimulados con BMDM apoptóticos por vía intrínseca eran cocultivados con explantes infectados procedentes de ratones BALB/c, se producían cambios importantes en la viabilidad de los amastigotes (**FIGURA 69B**). En general, las células pre-tratadas con LPS, produjeron una mayor reducción de la fluorescencia emitida por los explantes que las células pre-tratadas con P3C. El tiempo de incubación de los BMDM con AZD-5991 y S63845 era también importante sobre la viabilidad de *Leishmania* ya que, a tiempos cortos de apenas 3 h, la viabilidad se reducía en más del 75% (ABT-263 + AZD-5991) y de alrededor del 70% (ABT-263 + S63845), mientras que a las 24 h las mismas combinaciones superaban el crecimiento de los controles no tratados (NT). Esto podría ser debido a que las células tratadas durante 24 h estarían en un estado de muerte muy avanzado en el momento en el que se co-cultivaban con los esplenocitos. De esta forma, muchos de los DAMPs y citoquinas que hubieran sido liberadas al medio de cultivo durante su proceso de muerte se pierden, ya que ese medio de cultivo se descartaba al contener también los inhibidores. Este razonamiento justificaría porqué el tratamiento de 3 h era más efectivo, ya

que las células se encontrarían en un proceso de muerte menos avanzado y aún estarían a tiempo de liberar gran cantidad de DAMPs y citoquinas al medio extracelular, donde podrían servir como activadores de las DCs presentes en el explante de bazo procedente de ratones sanos.

Como hemos dicho antes, las células pre-tratadas con P3C fueron menos eficaces en reducir la fluorescencia infrarroja, siendo la combinación más eficaz (ABT-263 + AZD-5991) que produjo una reducción de la viabilidad <50% a las 3 h.

#### 4.2.7.2. DAMPs producidos durante la apoptosis intrínseca en RAW 264.7

Hemos estudiado igualmente el efecto de los DAMPs procedentes de células RAW 264.7 inducidas a la ICD por compuestos que producen apoptosis intrínseca sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *L. donovani* LV9 iRFP (**FIGURA 70**). En este caso, los esplenocitos procedentes de ratones sanos de la estirpe C57BL/6 se cultivaron con un lisado de amastigotes y células RAW 264.7 tratadas con inductores de la apoptosis intrínseca por LPS o P3C en presencia de ABT-263 en combinación con AZD-5991 o S63845, a las concentraciones y tiempos indicados. Los esplenocitos sanos procedentes de ratones C57BL/6, estimulados con macrófagos RAW 264.7 apoptóticos, se cocultivaron con esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 o BALB/c infectados con *L. donovani* LV9 iRFP. En la **FIGURA 70A**, se muestra que los DAMPs proporcionados por las células RAW 264.7 producían una disminución de la viabilidad de los amastigotes de explantes infectados de ratones C57BL/6 cuando las células eran pre-tratadas con P3C, pero no con LPS (**FIGURA 70A**), alcanzándose valores de viabilidad de apenas el 30% en la combinación de ABT-263 y S63845.



**FIGURA 70 | Viabilidad (% RFU) de amastigotes de *L. donovani* LV9 iRFP procedentes de explantes de bazo de ratones infectados.** Los esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos fueron pre-estimulados con un lisado de amastigotes de la cepa *L. donovani* LV9, P3C (500 ng/mL) y células RAW 264.7 tratadas con inductores de apoptosis intrínseca. Las células RAW 264.7 fueron pre-tratadas con LPS (50 ng/mL) o con P3C (500 ng/mL) durante 3 h y, posteriormente, con ABT-263 (1  $\mu$ M) en combinación con AZD-5991 (10  $\mu$ M) o S63845 (10  $\mu$ M) durante 24 h. Los esplenocitos fueron cocultivados con explantes infectados de ratones (A) C57BL/6 o (B) BALB/c. Cada barra del histograma

representa la Media  $\pm$  SD \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples.

Sin embargo, cuando los macrófagos RAW 264.7 inducidos a ICD y el explante obtenido de ratones C57BL/6 sanos, eran colocados sobre cultivos de esplenocitos BALB/c infectados con *L. donovani* LV9 iRFP, no se observaron cambios en la viabilidad de los amastigotes con respecto al control no tratado con ninguno de los tratamientos utilizados (**FIGURA 70B**).

### 4.3. CAPÍTULO III: APOPTOSIS EXTRÍNSECA

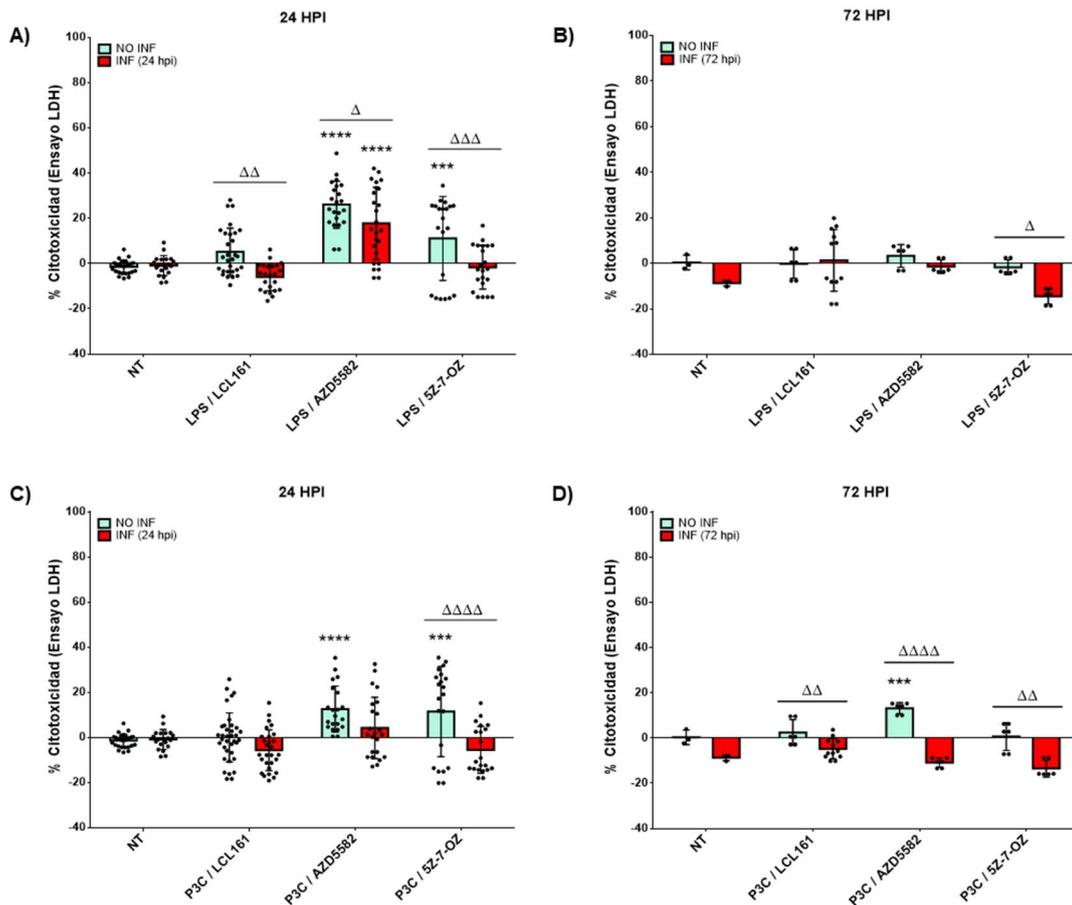
#### 4.3.1. Inducción a la apoptosis extrínseca en BMDM

Según Lawlor y col., los miméticos de SMAC y BH3 y los inhibidores de TAK1 promueven la muerte celular inflamatoria dependiente de caspasas 8 o 9 y la activación del inflamasoma NLRP3 (Lawlor et al., 2017). Asimismo, los miméticos de SMAC y los inhibidores de TAK1 son capaces de inducir el ensamblaje del ripoptosoma que activa la caspasa 8 (Vince et al., 2012; Dondelinger et al., 2013; Lawlor et al., 2015). Además, la pérdida conjunta de XIAP y cIAP generaba mayor activación de IL-1 $\beta$  que si se inhibía la acción de cada uno de ellos de forma individual. Esto era debido a que la falta de estas proteínas antiapoptóticas disparaba una muerte celular dependiente de RIPK3 y caspasa 8, produciendo la activación de IL-1 $\beta$ , de manera directa o a través de su escisión por la caspasa 1 (**FIGURA 36**) (Lawlor et al., 2017). Asimismo, la inhibición de cIAP1/2 y XIAP en células cancerígenas podría conducir a mecanismos de muerte celular por necroptosis dependiente de RIPK1/RIPK3 (Wang et al., 2018).

La producción de IL-1 $\beta$  podría estar involucrada en la infección de *Leishmania*. Los resultados de varios grupos de investigación han revelado que *Leishmania* es capaz de bloquear la expresión del inflamasoma, inhibiéndose así la maduración de IL-1 $\beta$  desde su proforma inactiva, por un mecanismo dependiente de caspasa 1 (Hatzigeorgiou et al., 1996; von Stebut et al., 2003; Kautz-Neu et al., 2011; Karam et al., 2013; Hartley et al., 2018). En macrófagos infectados por *L. donovani*, se demostró que el parásito era capaz de disminuir los niveles de activación de la caspasa 1. La inhibición de la maduración de la caspasa 1 tenía como consecuencia la disminución de los niveles de las formas maduras de IL-1 $\beta$  e IL-18, aumentando de esta manera el índice de infección de los macrófagos (Saha et al., 2019). En un ensayo clínico en pacientes con leishmaniasis visceral aguda, en el cual se administraban diferentes regímenes terapéuticos, se demostró el importante papel que presenta IL-1 $\beta$  en la resolución de la enfermedad. Se observó que la producción *in vitro* de IL-1 $\beta$ , y de TNF- $\alpha$ , se recuperaba como consecuencia de la curación de los pacientes tras recibir una terapia frente a la leishmaniasis aguda (Ho et al., 1992). Por lo tanto, la producción de IL-1 $\beta$  es clave para generar una respuesta inmune protectora contra *Leishmania*. Basándonos en estos trabajos, la generación de una muerte celular que produjera IL-1 $\beta$  en última instancia, podría suponer un posible mecanismo para reducir la carga parasitaria.

Basándonos en los estudios que habíamos realizado previamente, las células BMDM se infectaron con *L. infantum* durante 24 o 72 h (**FIGURA 71**). Posteriormente los cultivos fueron primados con 100 ng/mL LPS (**FIGURA 71A y B**) o 500 ng/mL P3C (**FIGURA 71C y D**), y tratados con LCL161, AZD5582 y 5Z-7-OZ (Lawlor et al., 2017; Chen et al., 2019). Mientras que la combinación de LCL161 con LPS o P3C no generó valores significativos de citotoxicidad con respecto al control, el empleo de los inhibidores AZD5582 y 5Z-7-OZ sí

produjo valores de muerte significativos en las células tratadas. Cabe señalar la protección producida por los amastigotes de *Leishmania* a la muerte, tanto en células primadas con LPS como con P3C.

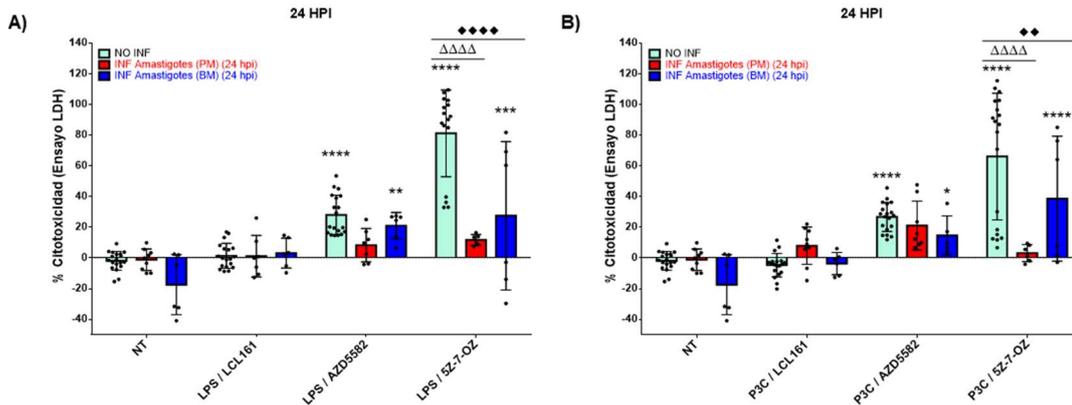


**FIGURA 71 | Citotoxicidad observada en cultivos BMDM mediante el ensayo LDH tras el tratamiento con compuestos inductores de apoptosis extrínseca, 24 h después de la infección con amastigotes (A, C) o 72 h (B, D) de infección con *L. infantum*. Las células fueron pre-tratadas durante 3 h con 100 ng/mL de LPS (A-B) y 500 ng/mL de P3C (C-D) y, posteriormente, los BMDM fueron tratados con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (250 nM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD de los diferentes tratamientos. Los símbolos  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.01$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.**

Asimismo, si comparamos los valores de citotoxicidad obtenidos en cultivos BMDM infectados a diferentes tiempos (24 y 72 h), observamos que las células infectadas durante 72 h con amastigotes de *L. infantum* (FIGURA 71B y D) fueron más resistentes a la muerte por apoptosis que las infectadas solo durante 24 h (FIGURA 71A y C). Por lo que, nuevamente, se confirma que la infección retrasa la muerte de sus células hospedadoras. Igualmente pudo observarse que el efecto citotóxico de AZD5582 era superior al de LCL161, probablemente debido a su capacidad de inhibir simultáneamente tres IAPs.

### 4.3.2. Inducción a la apoptosis extrínseca en RAW 264.7

Para producir apoptosis extrínseca, la línea celular RAW 264.7 fue primada con 100 ng/mL LPS (**FIGURA 72A**) o con 500 ng/mL P3C (**FIGURA 72B**) y, a continuación, tratada con LCL161 (Pemmaraju et al., 2021), AZD5582 (Moon et al., 2015) o 5Z-7-OZ (Ninomiya-Tsuji et al., 2003). Después de 24 h de exposición, medimos la citotoxicidad de las combinaciones mediante el ensayo LDH.



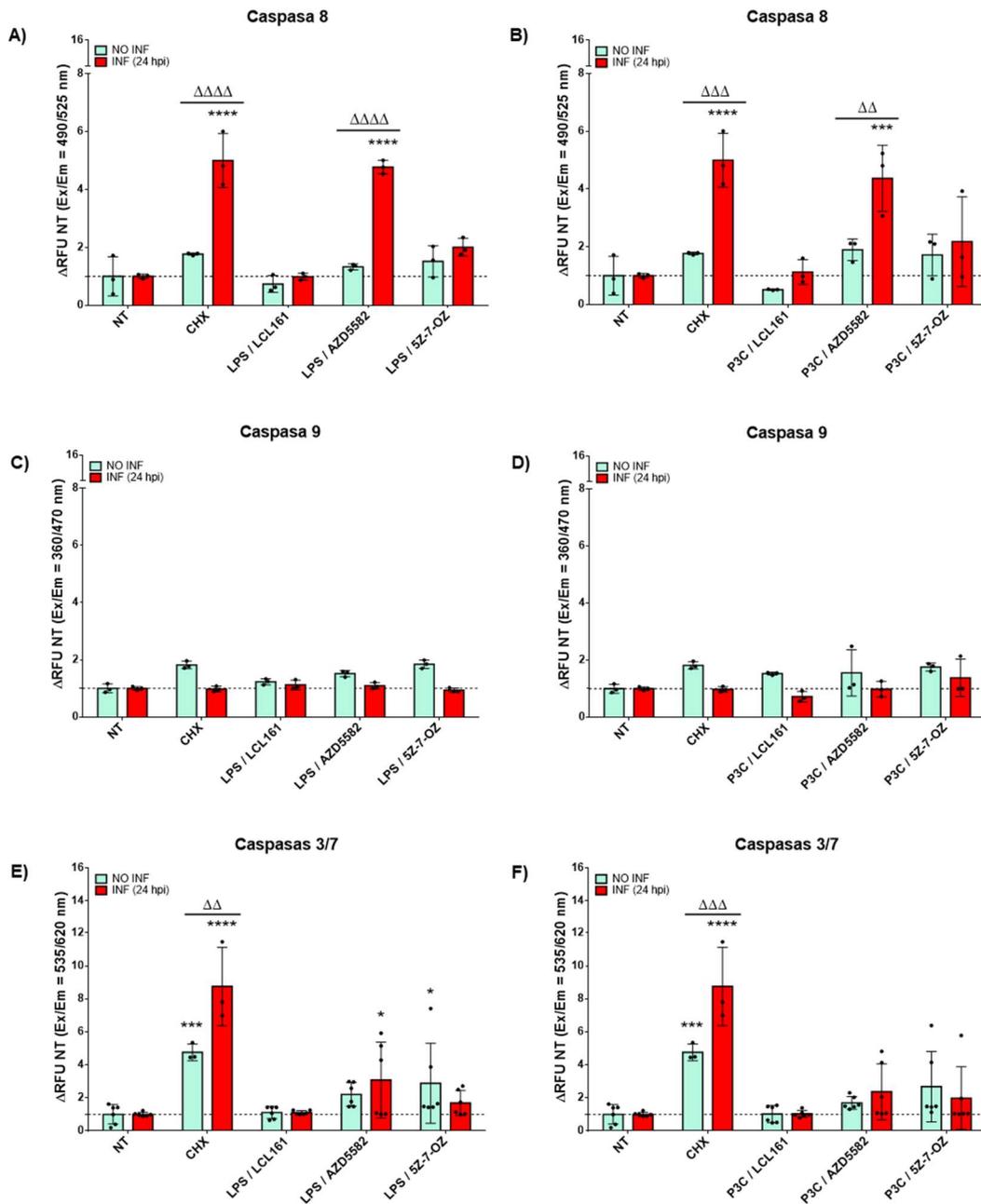
**FIGURA 72 | Citotoxicidad observada en RAW 264.7 mediante el ensayo LDH tras el tratamiento con compuestos inductores de apoptosis extrínseca, 24 h después de la infección con amastigotes (PM) o amastigotes (BM) de *L. infantum*.** Las células fueron pre-tratadas durante 3 h con 100 ng/mL LPS (**A**) o con 500 ng/mL P3C (**B**). A continuación, las células RAW 264.7 fueron tratadas con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (250 nM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectados y no infectados con amastigotes (PM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de RAW 264.7 infectadas y no infectadas con amastigotes (BM), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

Si comparamos los resultados obtenidos en RAW 264.7 con los obtenidos en BMDM, los porcentajes de citotoxicidad obtenidos con LCL161 y AZD5582 fueron muy similares entre ambos tipos celulares. Sin embargo, los porcentajes de muerte obtenidos en células RAW 264.7 con 5Z-7-OZ, tanto en células primadas con LPS como con P3C, fueron mucho mayores en RAW 264.7 (70-80%) que en BMDM (~10%). Estos resultados contrastan, con los obtenidos por Wang y col. en 2015 que no encontraron diferencias de citotoxicidad en células BMDM y RAW 264.7 tratadas con 5Z-7-OZ (Wang et al., 2015). En la mayoría de los casos, las células infectadas presentan una mayor resistencia al efecto de los compuestos, ya que presentan porcentajes de citotoxicidad menores que las células no infectadas. Además, las células infectadas con amastigotes (BM) eran más susceptibles a la muerte por apoptosis extrínseca que las células infectadas con amastigotes (PM). No se observaron

diferencias significativas entre primar con LPS o con P3C, excepto en el caso del tratamiento con 5Z-7-OZ, donde el pretratamiento con LPS parece ser más efectivo que con P3C.

### 4.3.3. Evaluación de la activación de caspasas en la apoptosis extrínseca

Los cultivos de BMDM tratados con las combinaciones de compuestos del apartado anterior sirvieron para determinar las actividades de las caspasas 8, 9 y 3/7 (**FIGURA 73**) en células inducidas a la apoptosis por LPS y P3C.



**FIGURA 73 |** Determinación de las actividades caspasa 8 (A, B), caspasa 9 (C, D) y caspasas 3/7 (E, F), tras el tratamiento de BMDM con las combinaciones de inductores de apoptosis extrínseca

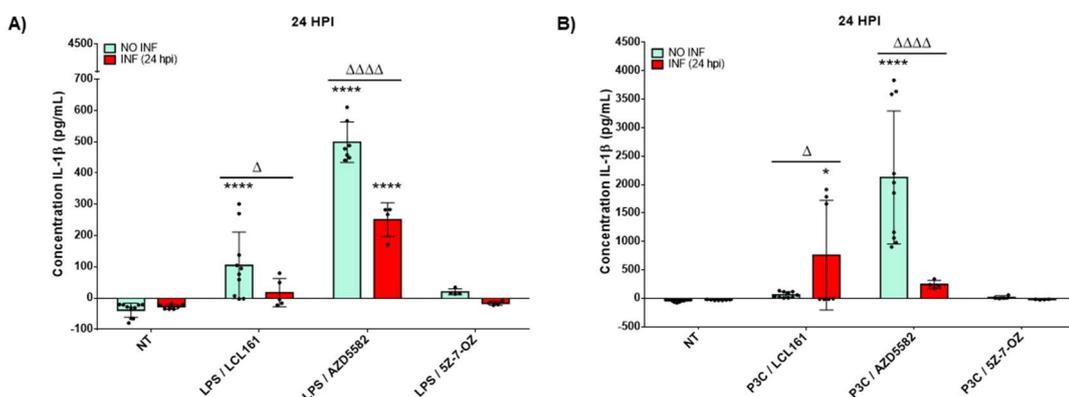
a las 24 h de infección con *L. infantum*. Las células BMDM fueron pretratados durante 3 h con 100 ng/mL de LPS (**A, C, E**) y 500 ng/mL de P3C (**B, D, F**) y, a continuación, con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (TAK) (250 nM) durante 24 h. Como control positivo de apoptosis, se trató a las células durante 24 h con 10  $\mu$ g/mL CHX tras 24 h post-infección (hpi) con *L. infantum*. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0,1$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta$  ( $p < 0,01$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,001$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar el incremento sobre el NT de Unidades Relativas de Fluorescencia ( $\Delta$ RFU) de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

Los valores de activación de las caspasas tras el tratamiento con CHX se corresponden a los ya citados en el apartado 4.1.3.

En las **FIGURA 73C y D**, se puede observar que la caspasa 9 no presentó ninguna modificación en los valores de activación con respecto a los controles lo que, como era de esperar, demuestra el escaso papel de la apoptosis intrínseca en estos ensayos. Por su parte, el tratamiento con AZD5582, bien sea en combinación con LPS o con P3C, provocó una activación significativa de la caspasa 8 en las células infectadas con respecto a las no infectadas. Por otro lado, los valores de actividad observados en las caspasas 3/7 (**FIGURA 73E y F**), son ligeramente más elevados que los controles. No existieron grandes diferencias en los valores de caspasas entre el pretratamiento de las células con LPS o P3C.

#### 4.3.4. Evaluación de la producción de IL-1 $\beta$ en la apoptosis extrínseca

Las IAPs se encuentran bloqueando al complejo RIPK3/Caspasa-8, por lo que su inhibición desbloquea esta ruta celular, cuyo fin es la activación de IL-1 $\beta$  y la muerte celular (Lawlor et al., 2017). Según Lawlor y col., la pérdida de XIAP y cIAP genera una mayor activación de la IL-1 $\beta$  que la pérdida únicamente de XIAP (Lawlor et al., 2017). Por ello, se midieron los niveles de IL-1 $\beta$  tras el tratamiento con los inhibidores de IAPs y TAK1 (**FIGURA 74**).



**FIGURA 74 | Niveles de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes de cultivos BMDM, infectados o no con *Leishmania*, tras el tratamiento durante 24 h con las combinaciones de compuestos inductores**

**de apoptosis extrínseca.** Cultivos de BMDM fueron pretratados durante 3 h con 100 ng/mL de LPS (**A**) y 500 ng/mL de P3C (**B**) y, posteriormente, con LCL161 (1  $\mu$ M), AZD5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (250 nM) durante 24 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$  ( $p < 0.1$ );  $\Delta\Delta$  ( $p < 0.01$ );  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de citotoxicidad de BMDM infectados y no infectados, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

Los niveles de IL-1 $\beta$  producidos por el compuesto LCL161 en células no infectadas fueron mayores cuando las células se encontraban primadas con LPS (**FIGURA 74A**). Es importante destacar que la concentración de IL-1 $\beta$  en células infectadas era inferior en comparación con las células no infectadas, pero en la combinación de LCL161 y P3C (**FIGURA 74B**), la producción de IL-1 $\beta$  fue superior en las células infectadas.

Si se comparan los niveles de IL-1 $\beta$  producidos por estos tres inhibidores, el mayor inductor de IL-1 $\beta$  fue AZD5582 bajo el pretratamiento con P3C. Esto podría ser debido a que este compuesto es capaz de inhibir las tres IAPs (XIAP, cIAP1 y cIAP2) (Lawlor et al., 2017). También observamos que las células infectadas producían niveles significativamente menores de esta citoquina, observándose una vez más la influencia del parásito sobre la célula hospedadora.

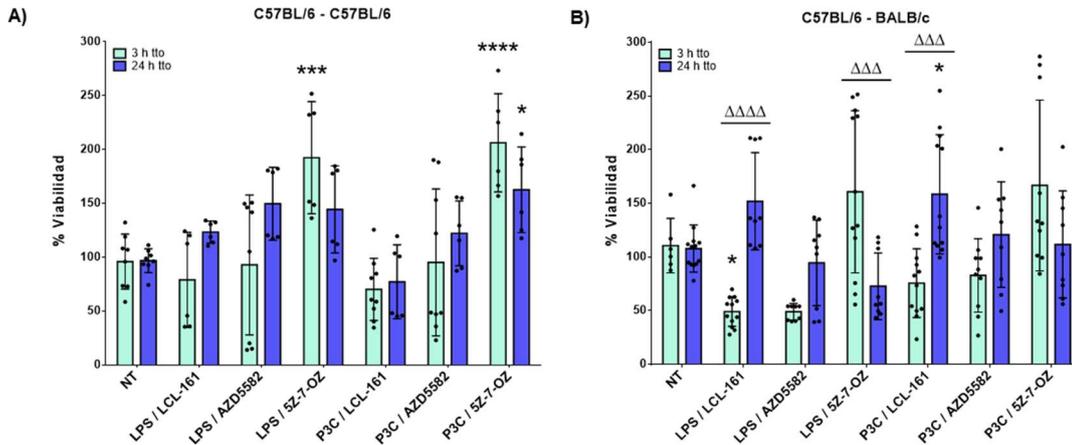
A diferencia de LCL161 y AZD5582, el inhibidor de TAK1 no generó cantidades significativas de IL-1 $\beta$  en comparación con las células no tratadas. En estudios previos, se ha comprobado que el inhibidor de la proteína TAK1, 5Z-7-OZ, facilitaba la transformación de la forma inactiva de IL-1 $\beta$  a la forma madura en macrófagos THP-1 (Singh et al., 2021). La inhibición de TAK1 por 5Z-7-OZ en macrófagos induce una muerte celular espontánea y la activación de la caspasa 1, la cual se encarga de procesar la citoquina IL-1 $\beta$  hacia su forma madura (Malireddi et al., 2018). Sin embargo, las concentraciones de IL-1 $\beta$  obtenidas con 5Z-7-OZ fueron muy bajas en comparación con las obtenidos con LCL-161 y AZD5582.

#### 4.3.5. Efecto de los DAMPs producidos en la apoptosis extrínseca sobre la viabilidad de *L. donovani* LV9 iRFP

##### 4.3.5.1. DAMPs producidos durante la apoptosis extrínseca en BMDM

Como en experimentos anteriores, se evaluó el papel de BMDM apoptóticos por vía extrínseca sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *L. donovani* LV9 iRFP tanto en ratones C57BL/6 (**FIGURA 75A**) como en BALB/c (**FIGURA 75B**). Cuando la estirpe de los ratones infectados era C57BL/6, no se observó ninguna reducción en la viabilidad de los amastigotes del explante infectado, incluso bajo ciertas condiciones la viabilidad aumentó,

como fue el caso de los tratamientos con 5Z-7-OZ, inducidos tanto con LPS como con P3C. Con respecto a los distintos tiempos de tratamiento de los macrófagos, no existieron diferencias significativas, salvo en la combinación de LPS y LCL-161 o AZD5582, donde el porcentaje de parásitos vivos aumentó con el tratamiento de 24 h (**FIGURA 75A**).



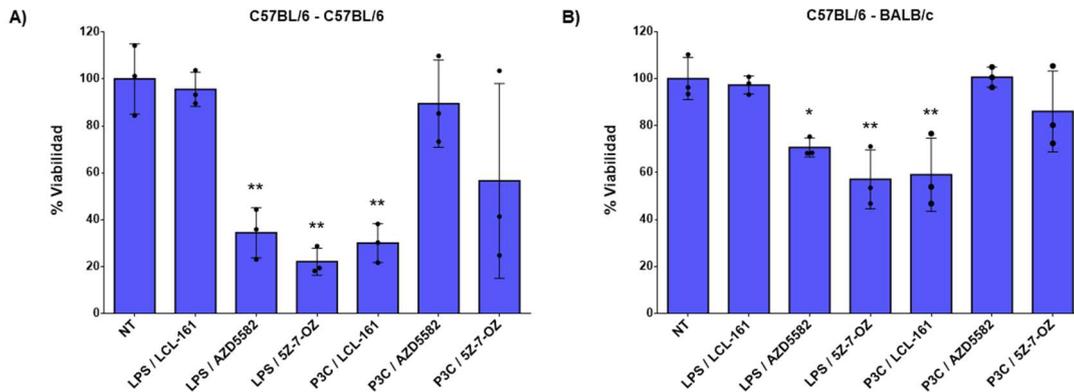
**FIGURA 75 | Viabilidad (% RFU) de amastigotes de *L. donovani* LV9 iRFP procedentes de explantes de bazo de ratones infectados.** Los esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos fueron pre-estimulados con un lisado de amastigotes de *L. donovani* LV9, P3C (500 ng/mL) y BMDM tratados con inductores de la apoptosis extrínseca. Los BMDM fueron pre-tratados con LPS (100 ng/mL) o con P3C (500 ng/mL) durante 3 h y, posteriormente con LCL-161 (1  $\mu$ M), AZD-5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (TAK) (250 nM) durante 3 y 24 h. Los esplenocitos fueron co-cultivados con explantes infectados de ratones **(A)** C57BL/6 o **(B)** BALB/c. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.001$ );  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0.0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de viabilidad de BMDM tratadas durante 3 h y 24 h mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Sidak's para comparaciones múltiples.

Seguidamente, realizamos co-cultivos de esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 con BMDM apoptóticos por vía extrínseca y estudiamos la viabilidad de los amastigotes de explantes infectados con *L. donovani* LV9 iRFP en ratones BALB/c (**FIGURA 75B**). En este caso, pudimos observar que LCL161 y AZD5582 fueron los compuestos más efectivos reduciendo la viabilidad de los parásitos, obteniéndose valores de viabilidad menores en las células pre-tratadas con LPS (<50%) que con P3C (~70%). En ambos casos, el tratamiento durante 3 h fue más efectivo que el de 24 h. Esto podría ser debido a lo mencionado anteriormente con respecto al estado de muerte que podrían tener los macrófagos en el momento previo al co-cultivo con los esplenocitos. Sin embargo, en los resultados obtenidos con 5Z-7-OZ, tanto en la inducción con LPS como con P3C, se obtuvieron mejores resultados en el tratamiento durante 24 h.

#### 4.3.5.2. DAMPs producidos durante la apoptosis extrínseca en RAW 264.7

Finalmente, se realizaron experimentos conducentes a comprobar el papel de los DAMPs procedentes de células RAW 264.7 inducidas a la ICD por compuestos que producen

apoptosis extrínseca sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *L. donovani* LV9 iRFP (**FIGURA 76**). El co-cultivo de esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos con RAW 264.7 tratadas con inductores de la apoptosis extrínseca (LCL-161, AZD5582 y 5Z-7-OZ) durante 3 h, produjo cambios significativos en la viabilidad de los amastigotes del explante de ratones C57BL/6 infectados con *L. donovani* LV9 iRFP (**FIGURA 76A**). En las células pre-tratadas con LPS, los compuestos que mayor efecto tuvieron en la reducción de la viabilidad fueron el AZD5582 y 5Z-7-OZ, alcanzándose reducciones en la RFU de hasta el 80%. Sin embargo, en las células pre-tratadas con P3C, el compuesto que fue más efectivo fue el LCL161, con valores de reducción de la RFU del 70%.



**FIGURA 76 | Viabilidad (% RFU) de amastigotes de *L. donovani* LV9 iRFP procedentes de explantes de bazo de ratones infectados.** Los esplenocitos de ratones C57BL/6 sanos fueron pre-estimulados con un lisado de amastigotes de *L. donovani* LV9, P3C (500 ng/mL) y células RAW 264.7 tratadas con inductores de la apoptosis extrínseca. Las células RAW 264.7 fueron pre-tratadas con LPS (100 ng/mL) o con P3C (500 ng/mL) durante 3 h y, a continuación, con LCL-161 (1  $\mu$ M), AZD-5582 (500 nM) y 5Z-7-OZ (TAK) (250 nM) durante 24 h. Los esplenocitos fueron co-cultivados con explantes infectados de ratones **(A)** C57BL/6 o **(B)** BALB/c. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \* ( $p < 0.1$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples.

Se realizaron experimentos semejantes conducentes a comprobar el papel de la ruta extrínseca en RAW 264.7 apoptóticas en combinación con esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 sanos sobre la viabilidad de los amastigotes de explantes infectados de ratones BALB/c (**FIGURA 76B**). En estas condiciones, fueron las células pre-tratadas con LPS combinadas con AZD5582 y 5Z-7-OZ las que tuvieron mayor efecto en la reducción de la RFU emitida por los amastigotes, aunque nunca superó el 40%. Sin embargo, en las células pre-tratadas con P3C, el compuesto más efectivo fue el LCL161, con una reducción del 40% con respecto al control sin tratar.

Tras comparar todos los resultados, las combinaciones más efectivas fueron: i) la combinación de células RAW 264.7 apoptóticas por vía intrínseca y extrínseca, con esplenocitos C57BL/6 co-cultivados con explante de bazo infectado procedente de ratones C57BL/6 y ii) la combinación de BMDM apoptóticas por vía intrínseca con esplenocitos C57BL/6 co-cultivados con explante de bazo infectados de ratones BALB/c. Esto puede ser debido al perfil pro-inflamatorio Th1 que muestra la estirpe C57BL/6 (Heinzel et al., 1989;

Stewart et al., 2002). De esta forma, los esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 liberarían una mayor cantidad de señales y citoquinas pro-inflamatorias que actuarían sobre el bazo infectado, disminuyendo la viabilidad de los parásitos. Parece ser necesaria la presencia de las dos estirpes de ratón, ya que combinando BMDM, esplenocitos y explante de bazo infectado procedentes de C57BL/6 no produjeron una reducción significativa de la viabilidad de *Leishmania*.

## 4.4. CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS Y FENOTIPADO DE DCs ESPLÉNICAS

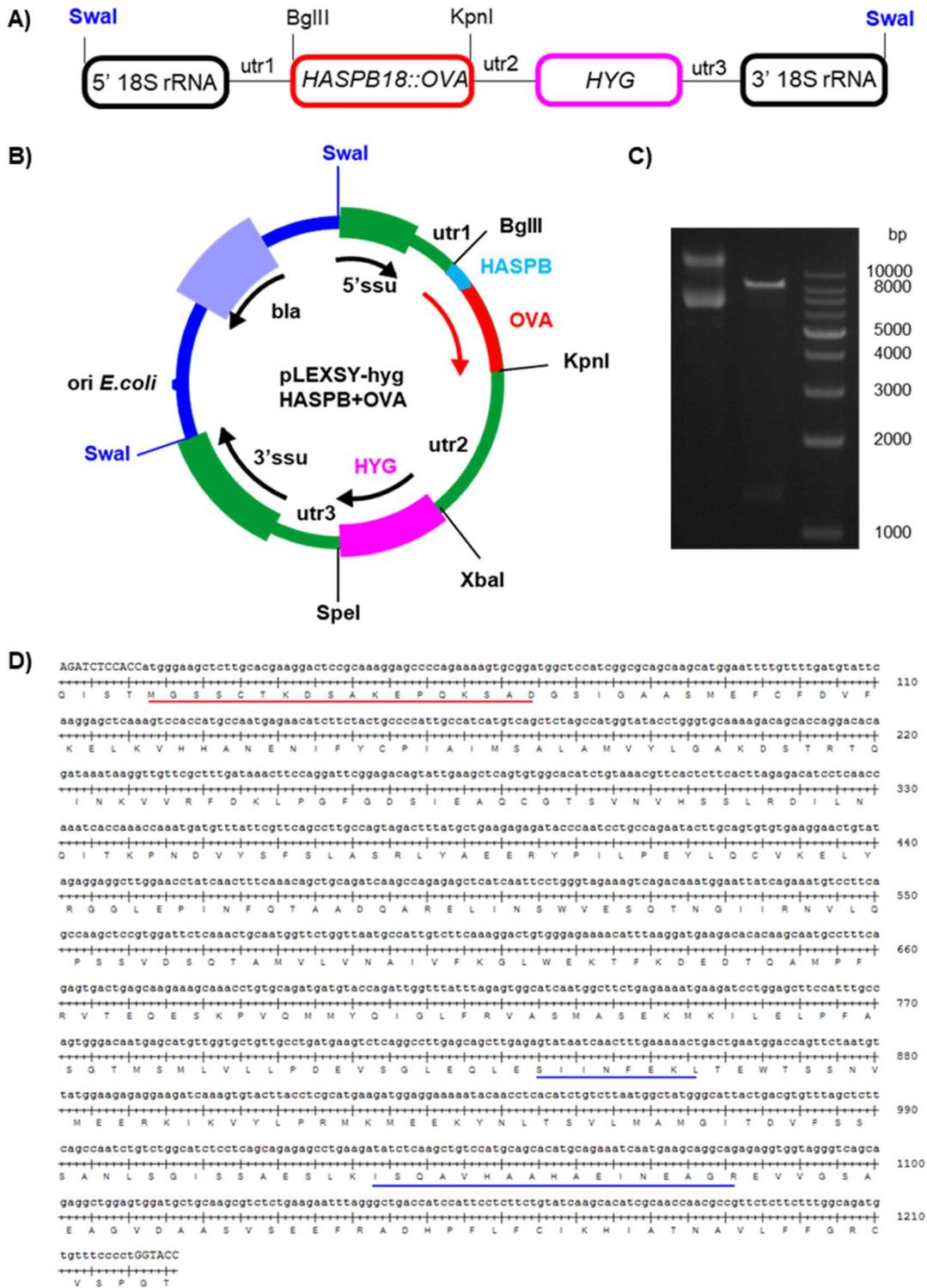
### 4.4.1. Generación de cepas de *L. infantum* que producen OVA en la superficie de la membrana plasmática

La ovalbúmina (OVA) es una proteína modelo muy utilizada en los estudios de presentación antigénica debido a su capacidad para inducir respuestas inmunitarias específicas y bien caracterizadas (Yewdell & Bennink, 1999; Nair-Gupta et al., 2014). Concretamente, varios estudios han demostrado que la OVA puede ser utilizada como un modelo antigénico para investigar la presentación cruzada de antígenos en la infección por *Leishmania*, suponiendo así una herramienta útil para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y vacunas contra esta enfermedad (Bertholet et al., 2005; Khouili et al., 2020).

El primer objetivo de este trabajo fue modificar genéticamente la cepa *L. infantum* 2713 para que produjera de forma estable la proteína OVA. Para ello se utilizó el vector pLEXY que permite, mediante recombinación homóloga, la integración de la secuencia de ADN de interés en el locus del gen que codifica el ARN ribosómico 18S lo que permite alcanzar niveles de expresión en todos los estadios del ciclo del parásito. La importancia del sitio de localización del antígeno en los patógenos es importante para generar una respuesta eficaz de los linfocitos.

En los estadios infectivos de *Leishmania* se encontró una familia de proteínas de superficie aciladas e hidrofílicas denominadas (HASPs) que contienen señales para la N-miristoilación, y la palmitoilación que les permite dirigirse a la cara externa de la membrana plasmática (Denny et al., 2000). Utilizando una secuencia de 18 aminoácidos (aa) del extremo amino-terminal de HASPB fusionados a OVA, Bertholet et al., generaron una cepa de *L. major* capaz de producir OVA anclada en la cara externa de la membrana plasmática (Bertholet et al., 2005). Esta localización es un requerimiento imprescindible para su reconocimiento por las células T específicas para OVA (Prickett et al., 2006) y, por lo tanto, para su inmunogenicidad, siendo un factor importante cuando se considera la posible candidatura de antígenos vacunales para inducir inmunidad dependiente de células T.

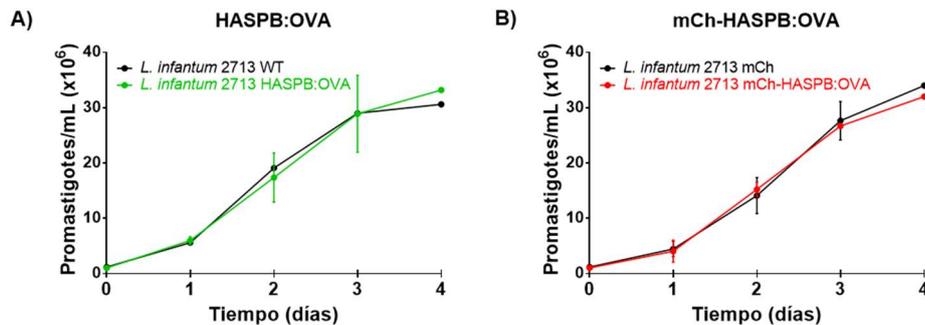
En este trabajo, se generó el vector pLEXY-hyg2.1 HASPB:OVA (GeneCust), que contiene la fusión de la secuencia codificante para los 18 aa del extremo amino terminal de HASPB junto al ORF de la proteína OVA (**FIGURA 77**). Además, la proteína OVA contiene los residuos específicos para el reconocimiento por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) H2-k<sup>b</sup> (257-SIINFEKL-264) y de tipo II (MHC-II)I-Ab (323-ISQAVHAAHAEINEAGR-339) (**FIGURA 77D**), que pueden ser usados para el testado de la respuesta celular específica de antígeno T CD8 y T CD4, respectivamente.



**FIGURA 77 | Generación del plásmido pLEXSY-hyg2.1 HASPB:OVA.** **A)** Vector plasmídico linealizado por la digestión con la enzima de restricción *Swal* para la expresión de la proteína de fusión HASPB:OVA en *Leishmania*. **B)** Vector pLEXSY-hyg2.1 conteniendo la construcción HASPB:OVA tras el proceso de síntesis. **C)** Resultados de la electroforesis tras la digestión del plásmido pLEXSY-hyg2.1 con las enzimas de restricción *KpnI/BglIII* (control de calidad enviado por GeneCust). Tamaño esperado: 1224/8600 bp. **D)** Secuencia del gen que codifica la proteína de fusión HASPB:OVA. **Rojo:** HASPB (18 aa); **Azul:** secuencias de los péptidos derivados de OVA reconocidos por MHC-I (SIINFEKL) y MHC-II (ISQAVHAAHAEINEAGR).

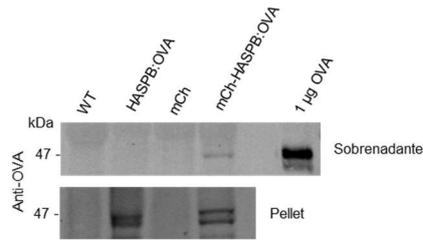
El vector pLEXSY-hyg2.1 HASPB:OVA se linearizó con *Swa*I, generando un fragmento de 6.971 bp que contenía el gen de interés (HASPB-OVA), el que confería resistencia a higromicina (HYG) y las secuencias del promotor del ARN ribosómico 18S para su integración en el genoma de *L. infantum* 2713 por recombinación homóloga (**FIGURA 77A**). El fragmento de ADN fue electroporado tanto en la cepa salvaje (WT) de *L. infantum* 2713, como en una cepa homóloga modificada previamente que producía la proteína fluorescente mCherry (mCh), generando respectivamente *L. infantum* HASPB:OVA y *L. infantum* mCh-HASPB:OVA.

En primer lugar, comprobamos que la modificación genética no alteraba el patrón de crecimiento de las cepas generadas. Para ello, los clones de ambas líneas se cultivaron *in vitro* tras su primer paso por ratones BALB/c, mostrando tasas de crecimiento y perfiles de diferenciación equivalentes en comparación con la cepa salvaje de *L. infantum* 2713 (**FIGURA 78**). También se analizó la virulencia de ambas líneas usando promastigotes metacíclicos diferenciados para infectar ratones BALB/c.



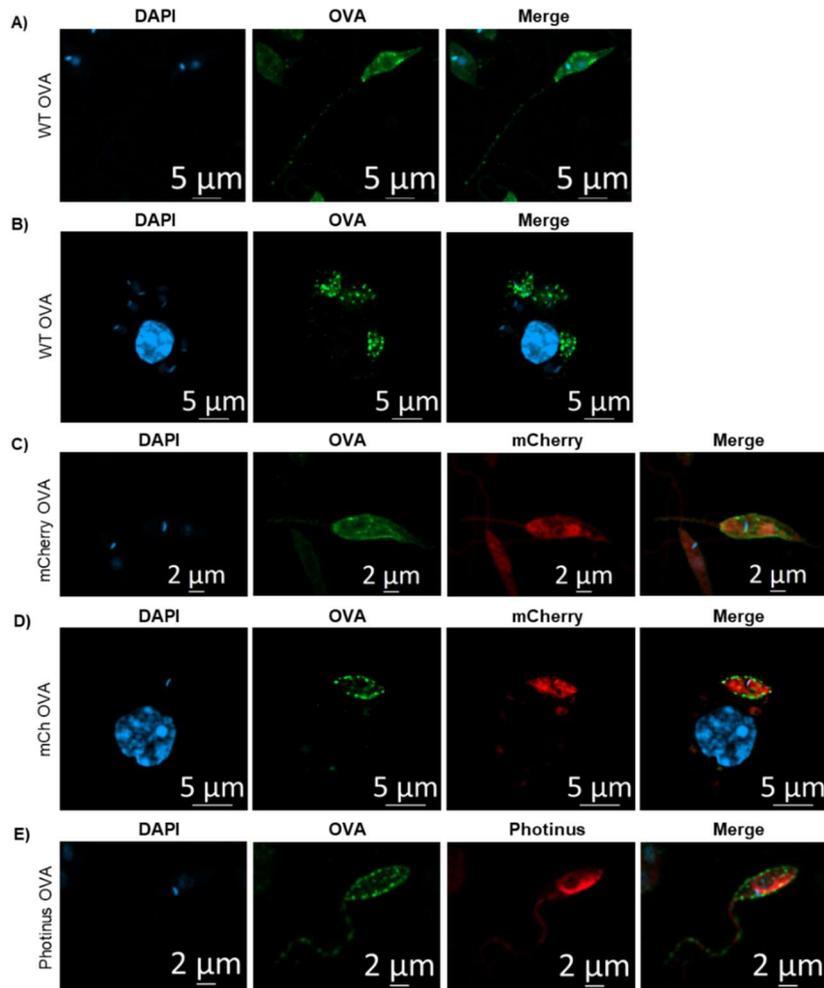
**FIGURA 78 | Curvas de crecimiento de promastigotes de *L. infantum* 2713 transfectados con el vector pLEXSY-hyg2.1 HASPB:OVA. A) *L. infantum* 2713 HASPB:OVA. B) *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA.**

La proteína de fusión producida por los promastigotes fue testada usando geles de SDS-PAGE e inmunodetección usando un anticuerpo 1° frente a OVA de pollo fabricado en ratón y un anticuerpo 2° frente a ratón conjugado con IRDye 800. Los promastigotes electroporados expresaron una proteína de aproximadamente 47 kDa consistente con el tamaño esperado de la fusión HASPB:OVA, que fue detectada en la fracción enriquecida en membranas, pero no en el sobrenadante (citósol), lo cual confirmó su anclaje a la membrana plasmática de los parásitos (**FIGURA 79**). Los parásitos no transfectados, no mostraron reacción alguna con el anticuerpo. La escasa presencia que se puede detectar en la fracción del sobrenadante podría corresponder a isoformas citoplasmáticas que aún no han sufrido modificaciones post-traduccionales para su correcta translocación a la membrana plasmática.



**FIGURA 79 | Análisis por Western Blot de los lisados y sobrenadantes de promastigotes de las cepas de *L. infantum* 2713 transfectadas con el plásmido pLEXSY-hyg2.1 HASPB:OVA, usando como control negativo las cepas *L. infantum* 2713 WT y *L. infantum* 2713 mCh. La proteína OVA purificada fue usada como control positivo (47 kDa).**

Para definir la localización de OVA en los parásitos, utilizamos microscopía confocal de fluorescencia y un anticuerpo conjugado a FITC frente a OVA (**FIGURA 80**).



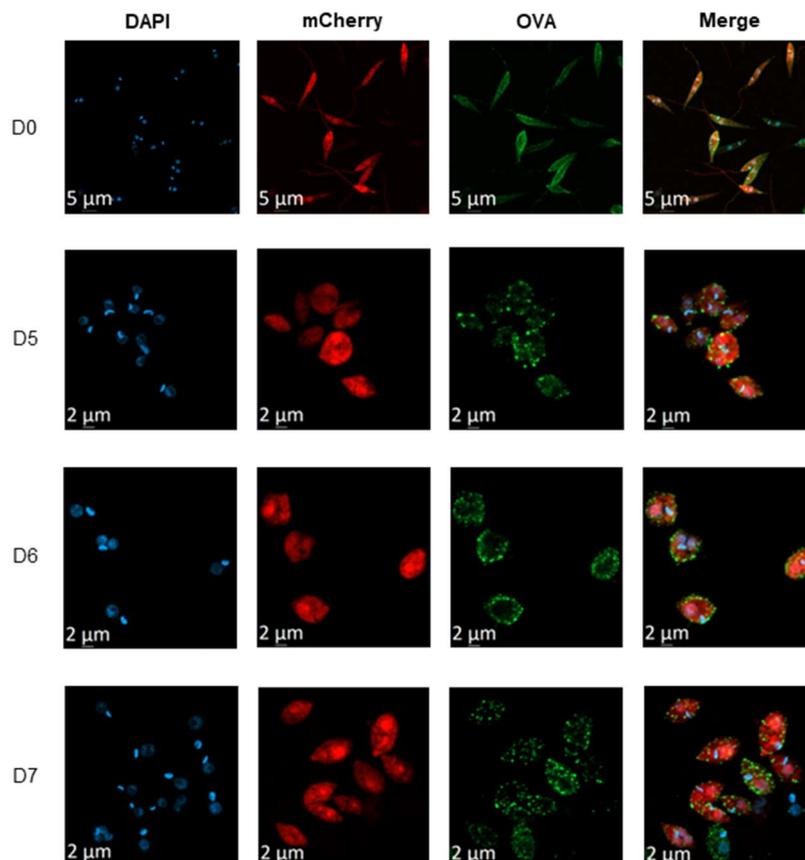
**FIGURA 80 | Imágenes representativas de microscopía confocal de las distintas cepas de *Leishmania* transfectadas con el vector pLEXSY-hyg2.1 HASPB:OVA. A) Promastigotes de *L. infantum* 2713 HASPB:OVA. B) BMDM de un ratón BALB/c infectados *in vitro* (MOI = 10:1) durante 72 h con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA. C) Promastigotes de *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA. D) BMDM de un ratón BALB/c infectados *in vitro* (MOI = 10:1) durante 72 h con *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss LSM800. Para el**

marcaje de OVA, se empleó el anticuerpo anti-OVA marcado con FITC (1:500); para el marcaje de los núcleos se empleó el colorante DAPI (1:1000).

La proteína de fusión pudo ser observada en los promastigotes de *L. infantum* HASPB:OVA en forma de puntos verdes en la superficie de la membrana plasmática, el flagelo y la bolsa flagelar, correspondientes al marcaje de la OVA (**FIGURA 80A**). Por el contrario, la fluorescencia emitida por la proteína mCherry en *L. infantum* mCh-HASPB:OVA es citoplasmática (**FIGURA 80C**).

También observamos la localización de estas proteínas en amastigotes intracelulares mediante microscopía confocal en infecciones de macrófagos BMDM. Previamente, la infectividad de las cepas de *Leishmania* fue recuperada mediante pase por ratón. Los macrófagos infectados fueron fijados con 4% PFA y permeabilizados con Tween-20. Las **FIGURA 80B** y **C** muestran que los parásitos recuperados de ratón eran infectivos, y los amastigotes mantenían la expresión de la proteína de fusión HASPB:OVA como punteado verde sobre la membrana plasmática.

Asimismo, y tras realizar un seguimiento diario durante 7 d mediante microscopía confocal, se pudo confirmar la presencia de OVA en amastigotes durante su proceso de diferenciación a partir de promastigotes (**FIGURA 81**).



**FIGURA 81** | Imágenes representativas de microscopía confocal de la diferenciación de promastigotes a amastigotes de *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA durante 7 d. Las imágenes

fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss LSM800. Para el marcaje de OVA, se empleó el anticuerpo anti-OVA marcado con FITC (1:500); para el marcaje de los núcleos se empleó el colorante DAPI (1:1000).

Al igual que ocurría en los promastigotes, la proteína fluorescente mCherry presentó una distribución citoplasmática y la proteína OVA se observó como un punteado verde en la membrana plasmática del parásito.

#### 4.4.2. Inducción a la apoptosis por irradiación UV de RAW 264.7

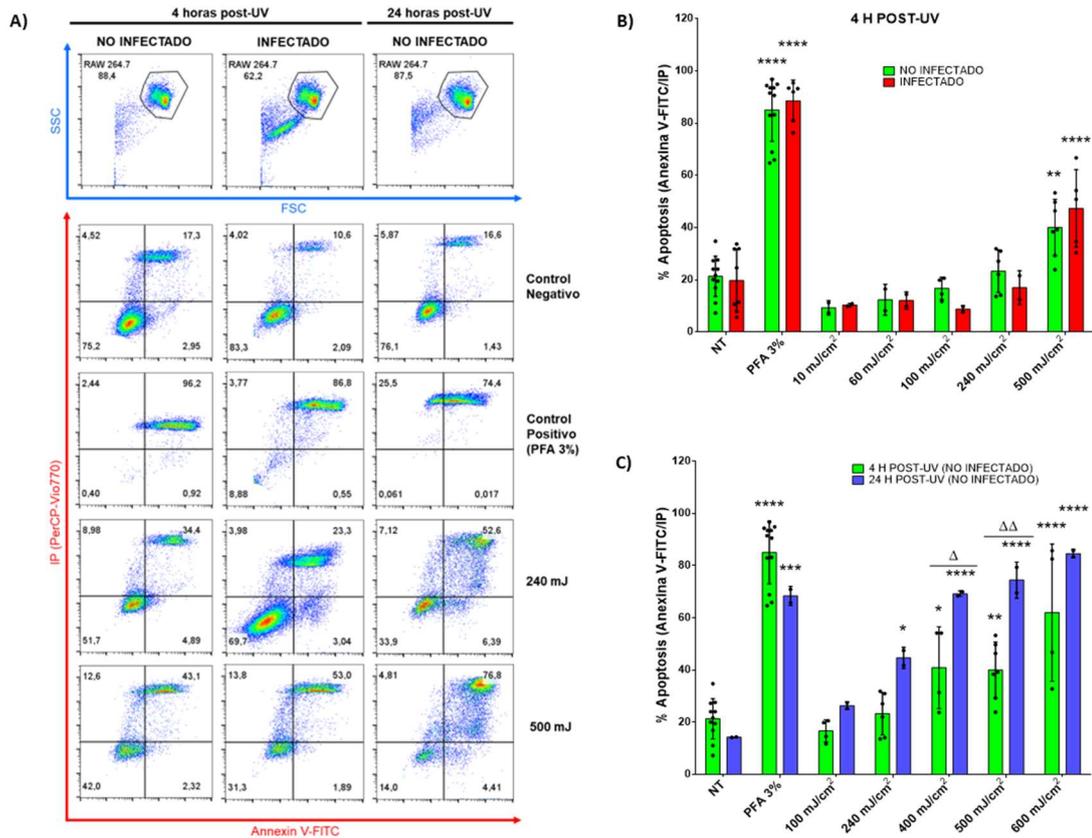
Uno de los primeros pasos que se llevaron a cabo para producir ICD fue tratar a los macrófagos con UV, con el fin de provocar un proceso de muerte celular. La radiación UV presenta una gran variedad de efectos biológicos y fisiológicos en los organismos, incluyendo la transformación hacia células malignas, supresión del sistema inmune y daños en el ADN, que provocan el inicio de una serie de mecanismos que implican la activación de vías de respuesta al daño en el ADN, arresto del ciclo celular y apoptosis (Gentile, 2003; Srivastava & de Larrea, 2008). La inducción de la apoptosis tras la irradiación UV puede ser un mecanismo protector importante ya que asegura la eliminación de células dañadas y potencialmente cancerosas de forma irreversible (Srivastava & de Larrea, 2008).

Los valores de energía empleados para irradiar las células estaban basados en un estudio anterior, donde los BMDM se irradiaban con energías de 10, 50 y 100 mJ/cm<sup>2</sup> y se evaluaba la generación de apoptosis mediante el ensayo MTT y el fraccionamiento del ADN (Srivastava & de Larrea, 2008).

Quisimos ver si la UV era capaz de producir apoptosis en células RAW 264.7 (**FIGURA 82**). En la parte superior del panel de la **FIGURA 82A**, se encuentra representado el tamaño (FSC) frente a la complejidad (SSC) (FSC/SSC), donde se puede apreciar la población de RAW 264.7. En el gráfico de los infectados, también se observa una segunda población con un tamaño y una complejidad menor, que corresponde a los promastigotes de *L. infantum* que no han sido internalizados. En las siguientes filas se pueden observar los porcentajes de los cuatro cuadrantes generados tras enfrentar el Yoduro de Propidio (IP), detectado por el canal del PerCP-Vio770, frente a la Anexina-V, marcada con el fluorocromo FITC. Como control negativo se emplearon células sin irradiar, donde se encontraron unos porcentajes basales de apoptosis tardía en torno al 15%. Como control positivo, se trató a las células con PFA al 3%, lo que generó unos porcentajes en torno al 85% de apoptosis tardía. En los dos últimos gráficos del panel, se muestran los resultados de las irradiaciones con energías de 240 y 500 mJ/cm<sup>2</sup>. Estos valores de energías fueron los elegidos para su uso en posteriores experimentos, ya que producían unos porcentajes intermedios de apoptosis tardía. Además, la integridad de las células se mantenía, lo que facilitaba el análisis por citometría, ya que valores mayores de radiación provocaban la pérdida de la integridad celular.

En la **FIGURA 82B**, se muestran los porcentajes de apoptosis tardía generados por los distintos valores de energía empleados, desde 10 mJ/cm<sup>2</sup> hasta 500 mJ/cm<sup>2</sup>, tanto en células infectadas como no infectadas, durante 4 h de tratamiento post-UV. Se puede apreciar que los porcentajes de apoptosis aumentaron proporcionalmente al aumento de la radiación, alcanzándose unos valores máximos de en torno al 45%. No se vieron diferencias significativas entre las células infectadas y no infectadas, probablemente debido a que la radiación también afectó a los parásitos, y su eficiencia para retrasar la muerte en las células hospedadoras se vio alterada (Hodgkinson & Herman, 1980; Giri et al., 2016).

En la **FIGURA 82C**, se muestran los porcentajes obtenidos tras el tratamiento con distintos valores de energía, desde 100 mJ/cm<sup>2</sup> a 600 mJ/cm<sup>2</sup>, tras 4 y 24 h post-UV. Se puede observar que los valores de apoptosis tardía a las 24 h post-tratamiento con UV fueron superiores a los obtenidos tras 4 h post-UV. Esto puede ser debido a que, al aumentar el tiempo transcurrido tras la irradiación, el proceso de apoptosis se encuentre más avanzado, por lo que habrá una mayor exposición de fosfatidilserina, permitiendo una mayor unión de la Anexina V, y una mayor permeabilización de las membranas, permitiendo una mayor entrada de IP, dando lugar a más células positivas a IP y Anexina V (Jo et al., 2014; Malhotra et al., 2018).



**FIGURA 82 | Análisis del efecto de la radiación UV en la apoptosis de macrófagos RAW 264.7.** A) Evaluación de la apoptosis por citometría de flujo mediante la tinción con Annexin V-FITC/IP. En la parte superior del panel se representan las gráficas (FSC/SSC) de las distintas poblaciones de células, tanto infectadas como no infectadas, y a los distintos tiempos de tratamiento. Debajo del FSC/SSC, se

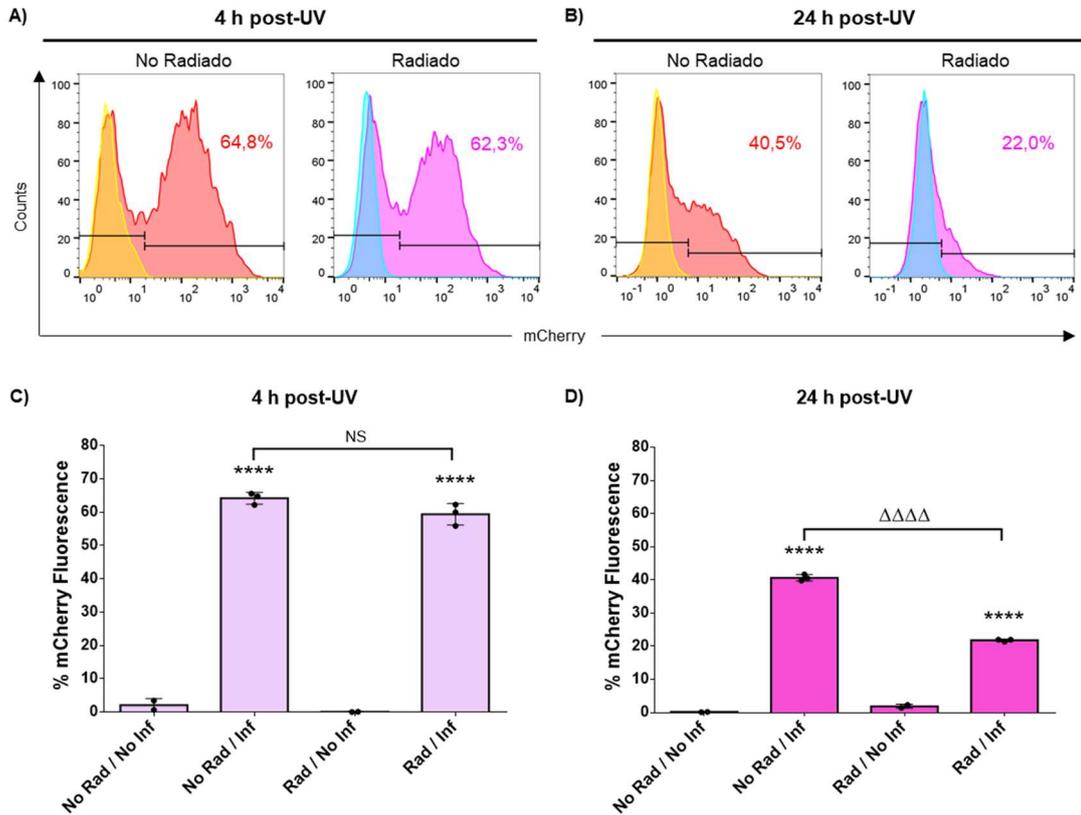
muestran las gráficas representativas tras la tinción con Annexin V-FITC/IP de macrófagos RAW 264.7, infectados o no infectados, cultivados durante 4 y 24 h tras el tratamiento con diferentes energías de irradiación ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ), incluyendo el porcentaje de células apoptóticas tardías (cuadrante superior derecho). **B)** Apoptosis tardía (Media  $\pm$  SD) obtenida en macrófagos RAW 264.7 infectados con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA tras 4 h post-tratamiento con energías crecientes de UV ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ). **C)** Apoptosis tardía (Media  $\pm$  SD) obtenidos en macrófagos RAW 264.7 no infectados, tras 4 y 24 h post-tratamiento con energías crecientes de radiación UV ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ). Como control positivo, se trató a las células con PFA al 3% durante 30 min en hielo. En la parte de abajo del panel, están representadas las gráficas de los dos valores de energía elegidos, 240 y 500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*,  $p < 0,1$  \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado (NT), mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples. Los símbolos  $\Delta$ ,  $p < 0.1$ ;  $\Delta\Delta$ ,  $p < 0.01$  resultan de comparar los porcentajes de apoptosis de RAW 264.7 obtenidos tras 4 y 24 h post-UV mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test Sidak's para comparaciones múltiples.

#### 4.4.3. Cuantificación de la infección por *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA en células RAW 264.7 irradiadas con UV

Tras la elección de la energía de 500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  de radiación UV, se quiso comprobar si las células RAW 264.7 se infectaban correctamente y, en ese caso, cuantificar la infección de *L. infantum* mCh-HASPB-OVA mediante la fluorescencia emitida a 610 nm por mCherry.

La fluorescencia emitida por mCherry procedente de células RAW 264.7 infectadas con *L. infantum* 2713 mCherry HASPB:OVA se muestra en la **FIGURA 83**. Si comparamos los porcentajes de infección de las células sin irradiar, los valores de fluorescencia emitida por los parásitos mCherry se redujeron de un 60% a un 40% cuando comparamos los tiempos post-infección (4 y 24 h, respectivamente).

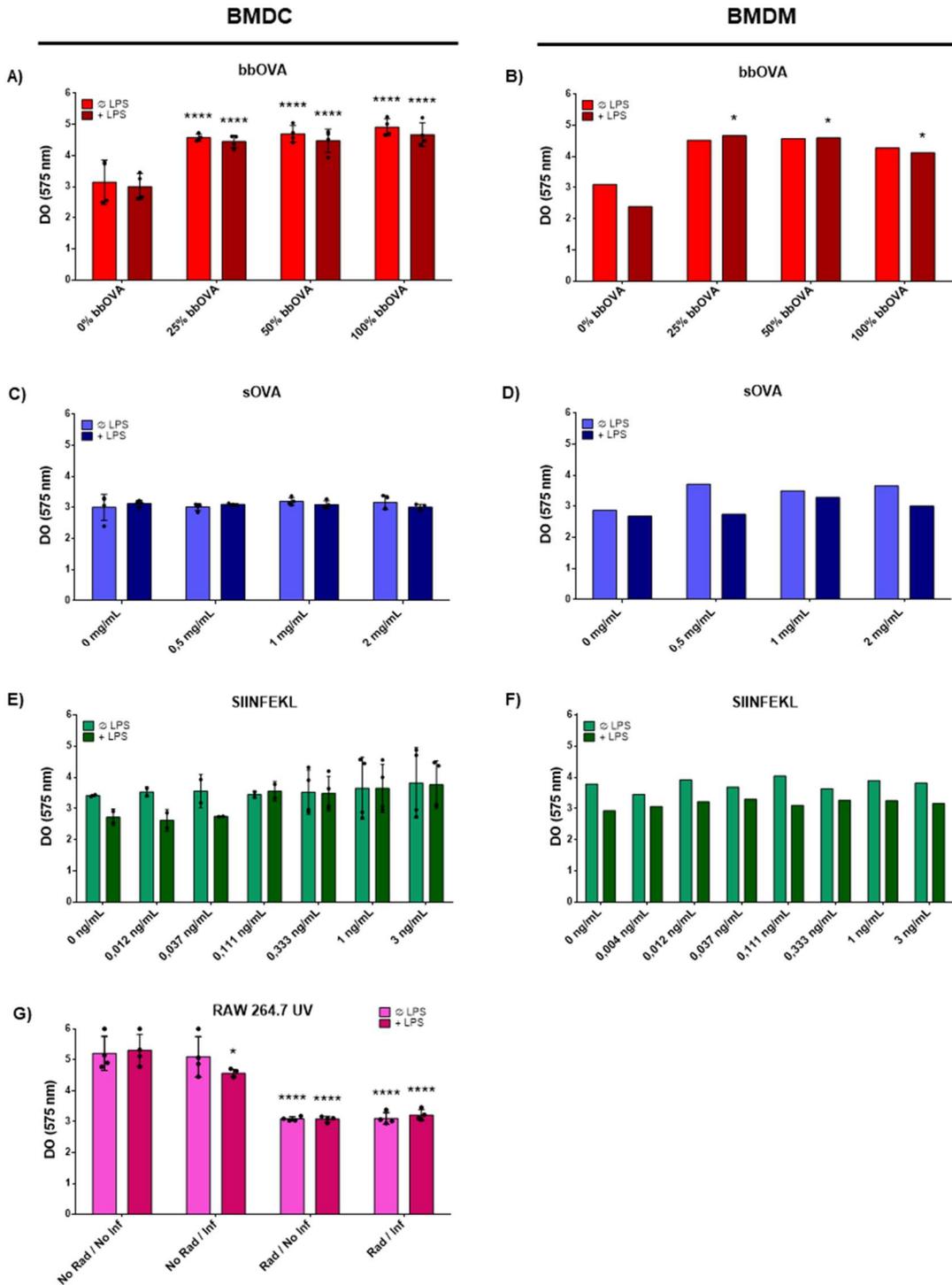
Cuando comparamos los porcentajes de infección entre células infectadas e irradiadas, el valor de fluorescencia de mCherry se mantuvo cuando la medición era realizada tras 4 h post-UV (valores en torno al 60%) (**FIGURA 83A y C**), pero esto no se mantuvo en la medida realizada tras 24 h post-UV (**FIGURA 83B y D**), ya que los valores de fluorescencia se reducían de un 40 a un 20%, por lo que la radiación parece estar afectando a la expresión de la proteína fluorescente mCherry.



**FIGURA 83 | Cuantificación del porcentaje de infección de las células RAW 264.7 tras la medición de la fluorescencia emitida por mCherry por citometría de flujo.** Las células RAW 264.7 fueron infectadas con la *L. infantum* 2713 mCherry HASPB:OVA e irradiadas con 500 mJ/cm<sup>2</sup>. La fluorescencia emitida por mCherry fue cuantificada tras **(A y C)** 4 h post-UV y **(B y D)** 24 h post-UV. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes tratamientos con respecto a su control No Infectado (No Inf) mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Tukey's para comparaciones múltiples. Los símbolos NS (No Significativo);  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $p < 0,0001$ ) resultan de comparar los porcentajes de fluorescencia mCherry de RAW 264.7 irradiados o no, mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Tukey's para comparaciones múltiples.

#### 4.4.4. Ensayo de presentación cruzada con células B3Z

Para evaluar la eficacia de la presentación cruzada antigénica, se emplearon células dendríticas (BMDC) y macrófagos BMDM como APCs y células del hibridoma B3Z como fuente de linfocitos T CD8 (Alloatti et al., 2015, 2016). Para ello, las APCs fueron primadas con LPS y cebadas con OVA, que se encontraba tanto adherida a bolas (bbOVA), en formato soluble (sOVA), utilizando el péptido SIINFEKL o en células RAW 264.7 infectadas con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA e irradiadas con UV. Posteriormente, las APCs activadas y cebadas eran co-cultivadas con las células B3Z, las cuales, al detectar la OVA cargada en el MHC-I mediante su TCR, generaban  $\beta$ -galactosidasa. Esta enzima es capaz de transformar CPRG en un producto coloreado. La medida del cambio de absorbancia que se produjo en las diferentes condiciones nos permitió obtener los datos mostrados en la **FIGURA 84**.



**FIGURA 84 | Evaluación de la eficiencia de la presentación cruzada a través de la cuantificación de la absorbancia generada en la activación del hibridoma de células T B3Z tras su co-cultivo con (A, C, E, G) BMDC y (B, D, F) BMDM. Las células fueron incubadas durante 16 h en presencia (+ LPS) o ausencia (Ø LPS) de 100 ng/mL de LPS y, posteriormente, fueron cultivadas con (A, B) bbOVA y (C, D) sOVA durante 4 h, con (E, F) SIINFEKL durante 30 min y con (G) células RAW 264.7 durante 24 h. Las células RAW 264.7 fueron irradiadas con 500 mJ/cm<sup>2</sup> de UV e infectadas con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA. Cada barra del histograma representa la Media ± SD \* (p < 0,1); \*\*\*\* (p < 0,0001) de los diferentes tratamientos con respecto al control No Tratado, mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples.**

En las **FIGURA 84A** y **B**, se muestran los valores de absorbancia obtenidos cuando BMDC y BMDM, respectivamente, eran cebadas con bbOVA recubiertas con diferentes concentraciones de OVA. Tanto en las BMDC como en las BMDM, las bbOVA eran capaces de producir cambios significativos en la absorbancia con respecto al control. Esto ocurría tanto en las BMDC estimuladas con LPS como en las no estimuladas. Por el contrario, en las BMDM, solo había un aumento significativo de la absorbancia en el caso de las células estimuladas con LPS. Si comparamos los resultados de absorbancia obtenidos en BMDC y BMDM, los valores son ligeramente superiores en BMDC, concretamente en la condición donde las bolas están recubiertas con el 100% de OVA (100% bbOVA).

En las **FIGURA 84C** y **D**, se recogen los valores de absorbancia obtenidos tras el cebado de las APCs con sOVA. En este caso no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control, pero en el caso de las BMDM sin estimular con LPS, los valores eran ligeramente superiores a los obtenidos en el control.

Cuando el cebado de BMDC y BMDM se realizó con el péptido SIINFEKL (**FIGURA 84E** y **F**), no se observaron diferencias significativas con respecto al control. Si comparamos el efecto del LPS sobre las APCs, no hubo grandes diferencias entre las células estimuladas y las no estimuladas, pero los valores eran ligeramente mayores en las células no estimuladas.

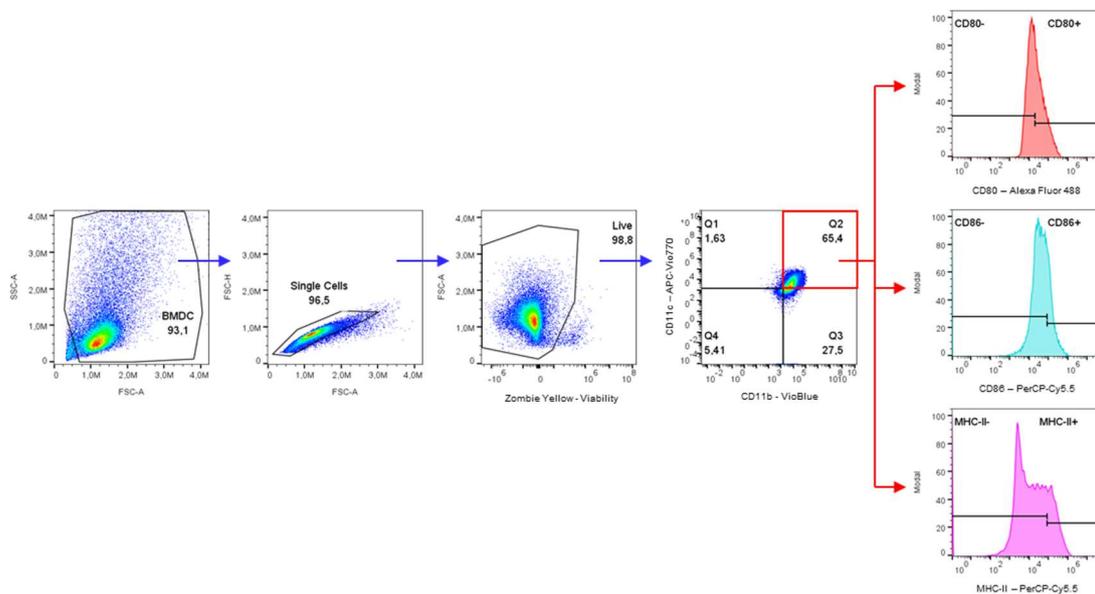
Al haber obtenido mejores resultados en las BMDC que en las BMDM, se cebó a las DCs con macrófagos RAW 264.7 infectados con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA e irradiados con una energía de 500 mJ/cm<sup>2</sup> de UV durante 24 h (**FIGURA 84G**). La radiación UV se empleó como primera estrategia para generar DAMPs a partir de una ICD, ya que se ha visto que este tratamiento físico causa daño en el ADN e inicia una serie de mecanismos que implican la activación de vías de respuesta frente a daño de ADN, arresto del ciclo celular y apoptosis (Gentile, 2003). Se quiso comprobar si la liberación de DAMPs por parte de células RAW 264.7 irradiadas y la presencia de PAMPs y OVA asociados a *Leishmania* eran capaces de promover la activación de las DCs y, por consiguiente, realizar adecuadamente la presentación cruzada antigénica y la activación de las células B3Z. Se pudo comprobar que los valores de absorbancia obtenidos con RAW 264.7 irradiadas e infectadas eran inferiores a los obtenidos en células RAW 264.7 no radiadas y no infectadas.

#### 4.4.5. Evaluación de la activación de BMDC

Tras la diferenciación de BMDC mediante el cultivo con el factor Flt3L, el cual controla la supervivencia y la expansión de las DCs uniéndose al receptor tirosina quinasa Flt3 presente en estas células (Matthews et al., 1991), se quiso cuantificar la expresión de moléculas coestimuladoras, como CD80, CD86, y la molécula MHC-II, cuya expresión aumenta en el proceso de maduración de las DCs, tras la estimulación con LPS. En DCs quiescentes y sin estimular, las moléculas anteriormente mencionadas son expresadas a

bajos niveles en la superficie celular. Tras la estimulación y la activación de las DCs, la expresión de CD80, CD86 y MHC-II aumenta significativamente (Sadiq et al., 2020).

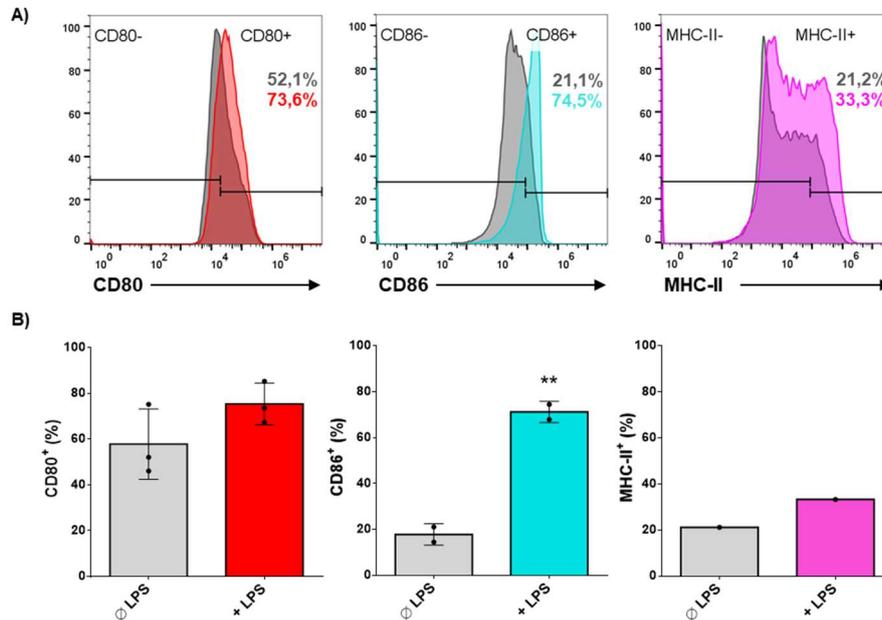
En la **FIGURA 85**, se muestra la estrategia de citometría de flujo seguida para caracterizar a las DCs y cuantificar la expresión de CD80, CD86 y MHC-II. En primer lugar, se seleccionó la población de BMDC en función de su FSC/SSC, descartando la fracción correspondiente a restos celulares. A continuación, enfrentando el área (FSC-A) y la altura (FSC-H) del FSC, se seleccionan las células individualizadas (*Single Cells*), descartando los agregados de células. Consecutivamente, se seleccionaron las células vivas negativas a la tinción Zombie Yellow (Zombie Yellow<sup>-</sup>). A continuación, se seleccionaron las células que eran positivas a los marcadores de DCs, CD11c y CD11b, obteniéndose un porcentaje de células CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> en torno al 65%. A partir de esta población, se obtuvieron los porcentajes de expresión de cada una de las moléculas de interés: CD80, CD86 y MHC-II.



**FIGURA 85 | Estrategia de citometría de flujo seguida para cuantificar la expresión de las moléculas CD80, CD86 y MHC-II en BMDC tras el tratamiento con LPS.** Se seleccionó la población de células de interés mediante el FCS/SSC y, a continuación, se tomó la población viva (Zombie Yellow<sup>-</sup>) positiva a CD11c y CD11b (CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>) y positiva a cada uno de los marcadores de interés (CD80, CD86 y MHC-II).

En la **FIGURA 86A**, aparecen los histogramas de citometría de flujo y la proporción de CD80, CD86 y MHC-II (**FIGURA 86B**) tras la estimulación de BMDC con LPS durante 8 h. En las BMDC no estimuladas se apreciaron ciertos niveles de expresión de estos marcadores, que aumentó tras la estimulación con LPS. De esta manera, la proporción de células CD80<sup>+</sup> en células no estimuladas era del 50%, proporción que aumentaba hasta el 73% al añadir LPS. Estos valores aumentaban muy significativamente en el caso de las células CD86<sup>+</sup> cuya proporción pasaba del 21 a casi el 75% con el tratamiento con LPS. Sin embargo, atendiendo

a los valores de MHC-II, no se apreciaron diferencias significativas entre las células estimuladas y no estimuladas con LPS.



**FIGURA 86 | Resultados de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y MHC-II en BMDC tras su estimulación con LPS. A)** Histogramas representativos obtenidos a partir de las BMDCs CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> que muestran la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 (rojo), CD86 (azul) y MHC-II (rosa) en BMDC no estimuladas (gris) frente a las BMDC estimuladas con LPS (100 ng/mL) durante 8 h. **B)** Porcentaje de expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y MHC-II en BMDC no estimuladas (Ø LPS) y BMDC estimuladas con LPS (100 ng/mL) (+ LPS) durante 8 h. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\* ( $p < 0,01$ ) de los porcentajes de expresión de cada molécula coestimuladora tras la estimulación con LPS con respecto al control no estimulado, mediante un análisis estadístico t de Student para muestras independientes.

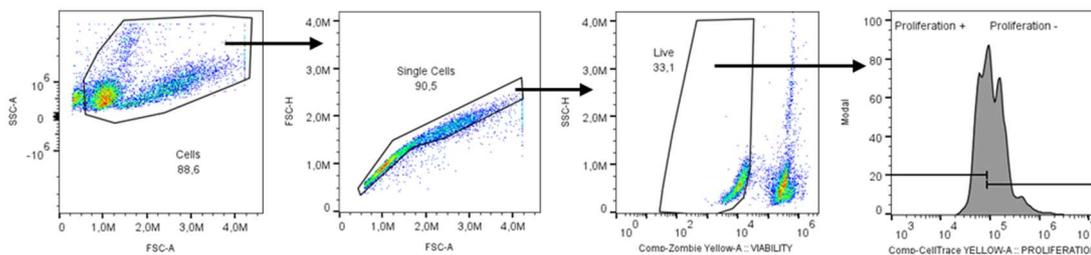
#### 4.4.6. Ensayo de presentación cruzada con células OT-I

Tras los resultados obtenidos en el experimento del co-explante, los dos tratamientos que mejor funcionaron frente *Leishmania* fueron el pretratamiento con LPS combinado con ABT-263 + AZD-5991 (FIGURA 69 y FIGURA 70), y con LCL161 (FIGURA 75 y FIGURA 76). Por esta razón, se quiso comprobar si estos tratamientos, junto con amastigotes de *L. infantum* 2713 HASPB:OVA irradiados con UV, podrían inducir una respuesta de linfocitos T procedentes de ratones OT-I marcados con CellTrace Yellow para que su proliferación sea cuantificable mediante citometría de flujo. Las células OT-I son linfocitos T CD8 purificados a partir de bazo procedentes de ratones de la estirpe OT-I, que se caracterizan por producir un TCR transgénico diseñado para reconocer el péptido SIINFEKL en la molécula MHC-I (Hogquist et al., 1994; Clarke et al., 2000).

Los diferentes tratamientos fueron realizados en RAW 264.7, que sirvieron como carga para las DCs. La finalidad del tratamiento de las células RAW 264.7 era generar unas

condiciones de ICD que provocaran la liberación de DAMPs y, por consiguiente, la activación de las DCs (Krysko et al., 2012; Gallo & Gallucci, 2013).

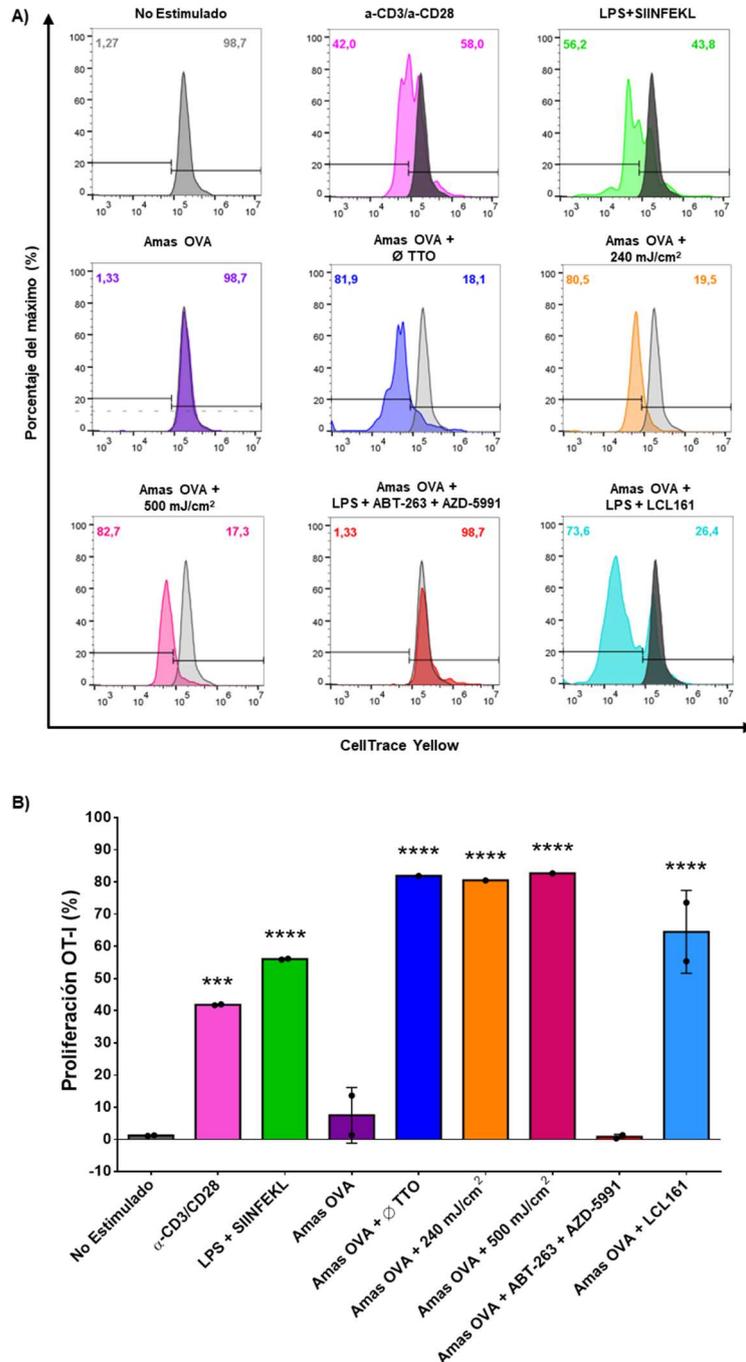
En la **FIGURA 88**, se muestra la estrategia seguida en citometría de flujo para medir la proliferación de las células OT-I. En primer lugar, se enfrentó FSC/SSC para seleccionar la población correspondiente a las células de interés, descartando la parte correspondiente a restos celulares. Seguidamente, se enfrentaron las variables de área (FSC-A) y altura (FSC-H) del FSC, para descartar los agregados de células y quedarnos únicamente con las células individualizadas (*Single Cells*). Posteriormente, se seleccionaron las células vivas Zombie Yellow<sup>+</sup>. Una vez seleccionadas las células vivas, se cuantificó su señal de fluorescencia del CellTrace Yellow.



**FIGURA 87 | Estrategia seguida en citometría de flujo para cuantificar la proliferación de células T CD8.** Se seleccionó la población de células de interés mediante el FCS/SSC y, a continuación, se tomó la población viva (Zombie Yellow<sup>+</sup>) negativa a CellTrace Yellow (células OT-I proliferadas).

En la **FIGURA 88A**, se encuentran representados los resultados de fluorescencia del CellTrace Yellow mediante citometría de flujo correspondientes a los porcentajes de proliferación de la **FIGURA 88B**. Exceptuando el control sin estimular y los controles positivos, las DCs siempre fueron cultivadas en presencia de amastigotes de *L. infantum* 2713 HASPB:OVA irradiados con UV. Como control negativo se emplearon células OT-I cocultivadas con DCs sin carga. Al no haber presencia de OVA, el control negativo nos permite establecer la máxima fluorescencia emitida por el CellTrace Yellow ya que, en este caso, las células OT-I no han proliferado y, por lo tanto, no existe dilución del colorante. Se emplearon dos controles positivos: los anticuerpos  $\alpha$ -CD3/CD28 y DCs cargadas con el péptido SIINFEKL. El control de  $\alpha$ -CD3/CD28 sirve para la estimulación del TCR sin necesidad de la existencia de MHC-I cargado con SIINFEKL. Esto es debido a que estos anticuerpos actúan como activadores de los receptores CD3 y CD28. El CD3 forma parte del complejo al que pertenece el TCR y, al activarse, proporciona una señal de activación inicial. Sin embargo, la proliferación depende de una segunda señal coestimuladora, llevada a cabo normalmente por la molécula CD28 (Trickett & Kwan, 2003). Estas dos señales enviadas por el CD3 y el CD28 corresponderían a las mismas señales que generaría la unión del MHC-I con el TCR. En las **FIGURA 88A** y **B**, se puede observar que el control positivo  $\alpha$ -CD3/CD28 era capaz de provocar la proliferación de un 42% de las células OT-I. Por otro lado, el control de SIINFEKL

nos permite comprobar que las DCs están realizando una presentación cruzada óptima, observándose la proliferación de un 56% de las células OT-I. Por lo tanto, ambos controles positivos generan unos valores de proliferación significativos con respecto al control no estimulado.



**FIGURA 88 | Evaluación de la eficiencia de la presentación cruzada antigénica mediante la cuantificación de la proliferación de células T CD8 (OT-I) mediante citometría de flujo, empleando el ensayo de dilución del CellTrace Yellow. Células OT-I co-cultivadas durante 48 h con DCs que habían sido cebadas con distintos cargos: amastigotes irradiados de la cepa *L. infantum* 2713 HASPB:OVA; RAW 264.7 sin tratamiento; RAW 264.7 irradiadas con energías de 240 o 500 mJ/cm<sup>2</sup> de radiación UV; RAW 264.7 pretratadas con LPS y tratadas con ABT-263 (1 µM) + AZD-5991 (10 µM), o con LCL161 (1 µM). Como control negativo se emplearon células OT-I co-cultivadas con DCs sin cargo. Como controles positivos se emplearon los anticuerpos anti-CD3 (2 µg/mL) y anti-CD28 (0,5 µg/mL), y DCs cebadas con**

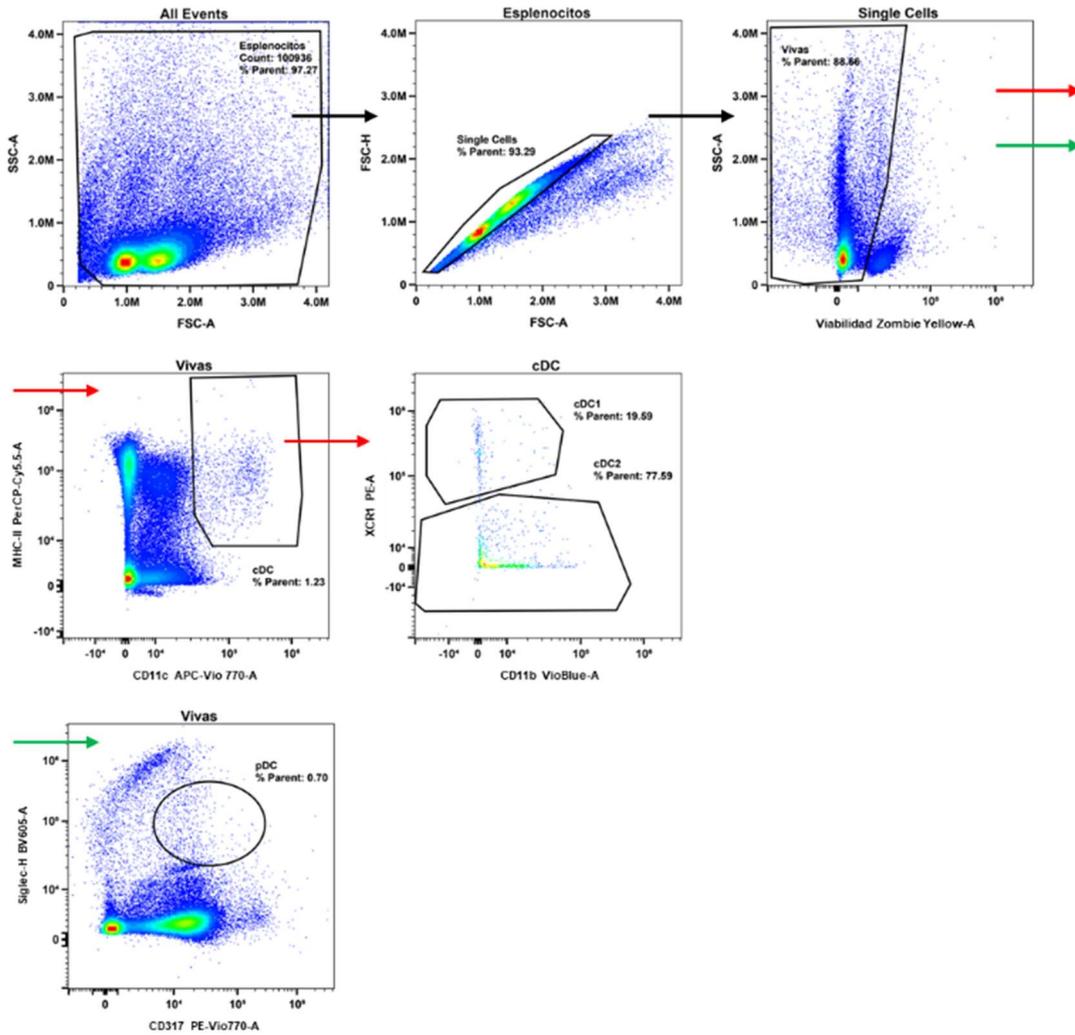
LPS (100 ng/mL) + SIINFEKL (2  $\mu$ M). **A)** Histogramas representativos que muestran la dilución de CellTrace Yellow en células OT-I. **B)** Porcentajes de proliferación de células OT-I basados en la dilución del CellTrace Yellow. Cada barra del histograma representa la Media  $\pm$  SD \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ) de los diferentes cargos con respecto al control No Estimulado, mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples.

Cuando el cargo de DCs consistió únicamente en amastigotes irradiados de la cepa *L. infantum* 2713 HASPB:OVA, no se produjo una proliferación significativa de las células OT-I (<2%). En cambio, cuando los amastigotes se combinaron con células RAW 264.7 sin tratar, la proliferación llegó a ser >80%, una proporción semejante al de células OT-I DCs cebadas con células RAW 264.7 irradiadas con una energía de 240 o 500 mJ/cm<sup>2</sup>. Finalmente, cuando el cargo de las DCs eran células RAW 264.7 tratadas con ABT-263 + AZD-5991, no se produjo proliferación de las células OT-I, a diferencia de cuando las DCs fueron cebadas con amastigotes irradiados y con células RAW 264.7 tratadas con LCL161, donde se alcanzaron porcentajes de proliferación >70%.

#### 4.4.7. Fenotipado de DCs esplénicas en ratones infectados por *L. infantum* 2713 HASPB:OVA

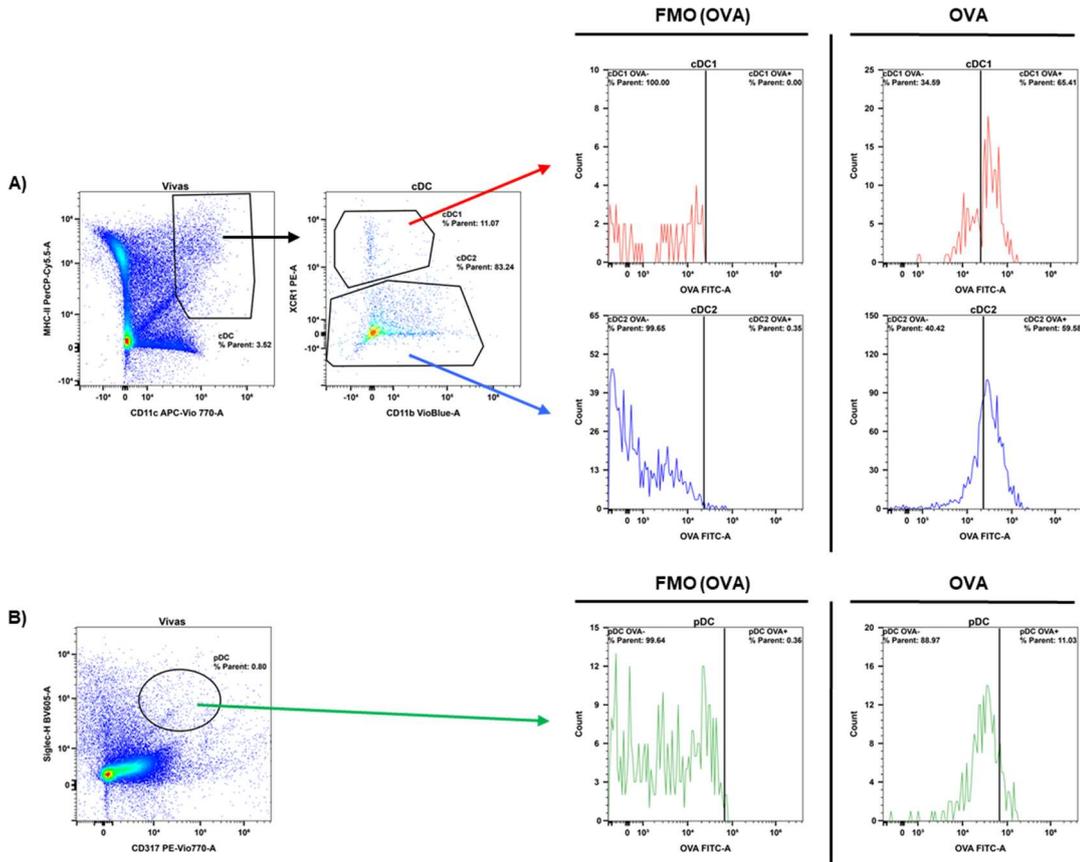
Se ha realizado el fenotipado del bazo de ratones sanos e infectados con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA. El objetivo de estos experimentos fue comprobar si la infección modificaba la frecuencia de las distintas subpoblaciones existentes de DCs en el bazo y su tasa de infección. Se ha visto que *Leishmania* es capaz de alterar las funciones de las DCs mediante la reducción de la expresión de moléculas coestimuladoras presentes en las DCs, como son el MHC-II, CD80, CD86 o el CD40 (von Stebut et al., 1998; Muraille et al., 2003; Figueiredo et al., 2012; Feijó et al., 2016).

Para ello, ratones BALB/c fueron infectados con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA y sacrificados a distintos tiempos post-infección (3, 8 y 16 semanas). La estrategia para el análisis de las poblaciones de DCs en bazos sanos se muestra en la **FIGURA 89**. A partir de las células vivas, se generaron dos gráficos, un primer panel para la detección de las DCs convencionales (cDCs) y un segundo panel para la detección de las DCs plasmocitoides (pDCs). Para definir la población de cDCs, se empleó una tinción doble positiva para MHC-II y CD11c (MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>). Se obtuvo un valor de cDCs de 1,23% del total de células vivas de un bazo sano. A partir de las cDCs, se realizó de nuevo un marcaje doble, pero en esta ocasión para XCR1 y CD11b. La población XCR1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> corresponde a las cDC1, las cuales tuvieron una frecuencia del 20%. Las células definidas por ser negativas a XCR1 y positivas a CD11b (XCR1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>) se corresponden con las cDC2, que representaron el 77% del total de cDCs. El segundo panel sirvió para identificar la subpoblación de pDCs, las cuales se identifican por ser doble positivas a Siglec-H y CD317 (Siglec-H<sup>+</sup>CD317<sup>+</sup>) y representaron un 0,7% del total de células vivas de un bazo sano.



**FIGURA 89 | Estrategia seguida en citometría de flujo para el fenotipado de un bazo no infectado para la determinación de la proporción de las distintas subpoblaciones de DCs.** En el primer gráfico se muestra el FSC/SSC, seguido de la selección de las células individualizadas (*Single Cells*), enfrentando el área (FCS-A) y la altura (FSC-H) del FSC. A continuación, en el tercer gráfico se escoge la población viva (Zombie Yellow<sup>+</sup>). A partir de las células vivas, se generan dos gráficos, uno marcado con la flecha roja y otro con la flecha verde. (→) Se enfrenta el MHC-II con el CD11c, los cuales son marcadores para cDCs (MHC-II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>), a partir de las cuales se generan dos subpoblaciones: cDC1 (XCR1<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>) y cDC2 (XCR1<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>). (→) Se enfrenta el Siglec-H con CD317 para seleccionar la población de pDC.

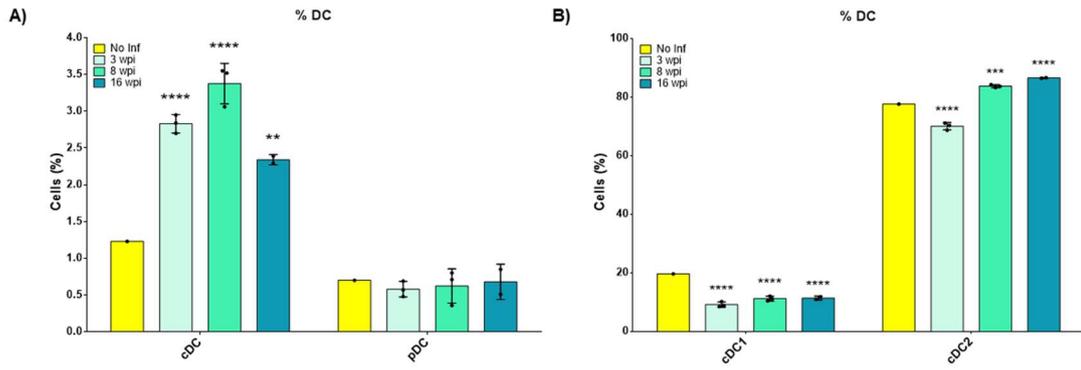
Paralelamente, se ideó la estrategia para la detección de las distintas poblaciones de DCs presentes en un bazo infectado mediante citometría de flujo (**FIGURA 90**). Asimismo, se puede ver la estrategia seguida para determinar el porcentaje de DCs infectadas en el análisis por citometría de flujo de la fluorescencia emitida por FITC conjugado al anticuerpo frente a OVA. Con la ayuda del control FMO (*Fluorescence Minus One*) para el anticuerpo FITC OVA, se consiguió fijar el límite superior para la señal de fondo del fluorocromo emitido.



**FIGURA 90 | Estrategia seguida en citometría de flujo para el fenotipado de un bazo infectado con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA para obtener la proporción de las distintas subpoblaciones de DCs y su porcentaje de infección. A) Obtención de la proporción de cDC1 y cDC2 a partir de las cDC totales en un bazo infectado, y sus porcentajes de infección correspondientes. B) Obtención de la frecuencia de las pDCs en un bazo infectado, y su porcentaje de infección. Los porcentajes de infección fueron obtenidos tras la detección de la fluorescencia del anticuerpo FITC OVA. Se realizó el control FMO (*Fluorescence Minus One*) para el anticuerpo FITC OVA para establecer el límite superior para la señal de fondo en el fluorocromo omitido.**

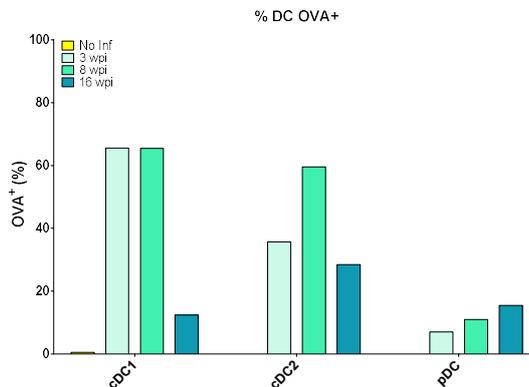
En la **FIGURA 91A**, se encuentran recogidos los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de DCs presentes en bazo. Partiendo de que en un bazo no infectado las cDCs representaban un 1,23% (**FIGURA 89**), se puede observar que las cDCs aumentaron significativamente cuando el bazo procede de un ratón infectado con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA (**FIGURA 91A**). Es a partir de la semana 8 de infección cuando el aumento se vuelve más significativo, alcanzándose un valor de 3,4%. Sin embargo, el porcentaje de las pDCs del bazo infectado se mantuvo prácticamente invariante con respecto al bazo no infectado (**FIGURA 91A**).

Dentro de la población de cDCs, encontramos que las cDC1 disminuyeron su representación en casi la mitad en comparación con los resultados obtenidos en el bazo sano hasta tener un valor del 11%, a diferencia de las cDC2 que empezaron reduciendo su representación porcentual en la semana 3 de infección, para aumentar en las semanas 8 y 16, alcanzando valores de hasta un 83% (**FIGURA 91B**).



**FIGURA 91 | A) Proporción de las poblaciones de cDCs y pDCs halladas en el bazo de ratones No Infectados (No Inf) y de ratones infectados durante 3, 8 y 16 semanas (wpi – semanas post-infección) tras el análisis por citometría de flujo. B) Proporción de las poblaciones cDC1 y cDC2 a partir de la población total de cDCs.** Cada barra del histograma representa la Media ± SD \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) de los diferentes porcentajes de células de los ratones infectados con respecto al ratón no infectado mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples.

En la **FIGURA 92**, se representan los porcentajes de infección de las distintas subpoblaciones de DCs obtenidos tras la cuantificación de la fluorescencia emitida por el anticuerpo FITC OVA, tal y como se muestra en la **FIGURA 90**.

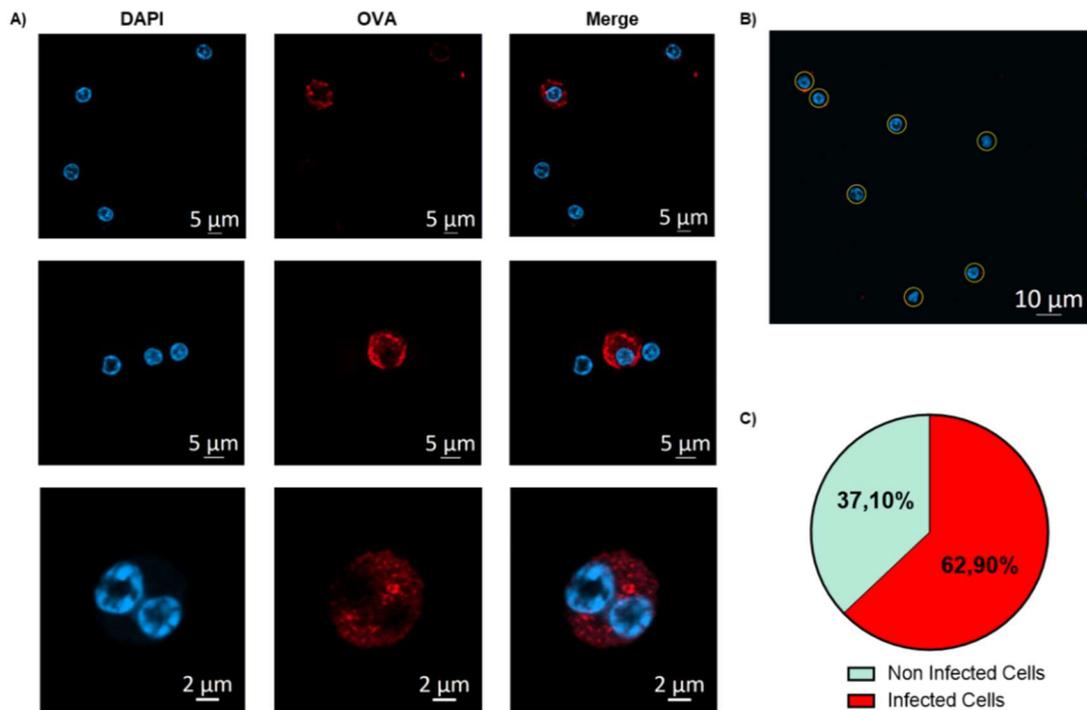


**FIGURA 92 | Porcentaje de infección de cada subtipo de DCs tras la detección de OVA por citometría de flujo.** Cada barra del histograma representa la Media ± SD de los diferentes porcentajes de células de los ratones infectados con respecto al ratón no infectado mediante un análisis estadístico ANOVA de doble vía y un test de Dunnett's para comparaciones múltiples.

Las cDC1 mostraron una tasa de infección cercana al 65% en las semanas 3 y 8 de infección, pero se produjo una gran disminución en la semana 16, con valores del 12%. Las cDC2 presentaron porcentajes de infección del 35% en la semana 3, pero en la semana 8, los valores aumentaron hasta un 60%. Sin embargo, en la semana 16 de infección, el porcentaje de infección cayó hasta un valor del 28%. Cabe destacar que la tasa de infección en las pDCs era mucho más reducida con respecto a las tasas de infección obtenidas en las

poblaciones de cDCs. Los porcentajes aumentaron ligeramente a medida que aumentaba el tiempo de infección, alcanzando valores cercanos al 11%.

Para comprobar la infección de las DCs de bazo por microscopía confocal, se aislaron PanDCs, las cuales incluyen las cDC1, cDC2 y pDC, del bazo de un ratón BALB/c infectado con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA, y se tiñeron con un anticuerpo 1º frente a OVA de pollo fabricado en rata y un anticuerpo 2º frente a rata conjugado con Alexa Fluor 647. La **FIGURA 93A** muestra que las células eran positivas a OVA, ya que se podía observar la fluorescencia roja correspondiente al anticuerpo frente a OVA en el interior de las PanDCs. En las imágenes de la parte superior, se aprecian varias DCs de las cuales no todas estaban infectadas. Las dos filas de imágenes restantes del panel muestran una visión más detallada de las células, donde se puede observar un punteado en el citoplasma, correspondiente a la detección de OVA expresada por los amastigotes intracelulares.



**FIGURA 93 | A)** Imágenes representativas de microscopía confocal de PanDCs purificadas del bazo de un ratón BALB/c infectado con la cepa *L. infantum* 2713 HASPB:OVA. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss LSM800. Para la identificación de OVA, se empleó el anticuerpo anti-OVA conjugado con Alexa Fluor 647 (4 µg/mL); para la identificación de los núcleos se empleó DAPI (1:1000). **B)** Ejemplo del recuento manual de PanDCs realizado sobre una imagen de microscopía confocal basado en el conteo de núcleos (rodeados en amarillo). **C)** Porcentajes de infección de PanDCs obtenidos tras el recuento manual aleatorio de células infectadas y no infectadas realizado en imágenes adquiridas por microscopía confocal.

En la **FIGURA 93C**, se muestran los porcentajes de PanDCs infectadas y no infectadas tras un recuento manual (**FIGURA 93B**) de las células captadas en treintinueve fotografías tomadas de forma aleatoria por microscopía confocal. De un contaje total de 248

células, 156 de ellas (62,90%) se encontraban infectadas, ya que eran positivas a OVA (presentaban señal de fluorescencia emitida por el anticuerpo frente a OVA conjugado con Alexa Fluor 647), por lo que se confirma que *Leishmania* es capaz de infectar DCs.

## **5. DISCUSIÓN**

### 5.1. MUERTE CELULAR INMUNOGÉNICA (ICD)

La necroptosis ha surgido como un nuevo mecanismo natural de resistencia frente a patógenos, incluyendo el caso de *Leishmania* (Barbosa et al., 2018). Con el fin de reproducir las condiciones clásicas de necroptosis, inducimos un proceso de muerte celular en el que se encontrara inhibida la caspasa 8, ya que ésta es capaz de suprimir la actividad de RIPK1 y RIPK3, ambas implicadas en el proceso de necroptosis (Legarda & Ting, 2018). Para ello, se pretrataron las células con el inhibidor pan-caspasa Z-VAD-FMK y, a continuación, con diferentes concentraciones de LPS. Estos autores usaron BMDM una concentración fija no tóxica de Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M) antes de estimularlos con diferentes concentraciones de LPS como inductor de la necroptosis. En estas condiciones, la citotoxicidad del LPS, analizada por citometría de flujo, era dependiente de la concentración. Simultáneamente, la viabilidad celular disminuía a medida que la concentración de LPS aumentaba (Legarda et al., 2016; Legarda & Ting, 2018).

El LPS es un agonista del TLR4 que, en presencia de Z-VAD-FMK, conduce a una muerte celular necrótica en macrófagos dirigida por un complejo formado por RIPK1-RIPK3, seguido de la activación del receptor de TNF (TNFR) (Kaiser et al., 2013). Otros autores también fueron capaces de inducir condiciones de necroptosis en macrófagos tras el empleo de la combinación de Z-VAD-FMK y LPS, confirmando que estas señales necróticas convergían en RIPK3 (He et al., 2011). El LPS empleado a bajas dosis (1 ng/mL) indujo la producción autocrina de TNF, provocando necroptosis en las células de manera dependiente de TNF (auto-necroptosis inducida por TLR4). Por el contrario, el LPS a altas dosis (100 ng/mL) provocaba directamente necroptosis independiente de TNF y, en este caso, la contribución de la necroptosis inducida por TNF-autocrina quedaba enmascarada (Legarda et al., 2016).

Un estudio reciente demostró que existían diferencias en la respuesta producida frente a LPS entre macrófagos primarios, como BMDM o macrófagos peritoneales, y líneas celulares establecidas, como RAW 264.7. En estos estudios se podía observar que la cinética de fosforilación de NF- $\kappa$ B y la translocación nuclear inducida por LPS en macrófagos primarios era mucho más rápida que la existente en líneas celulares de macrófagos (Bagaev et al., 2019).

En otros estudios de necroptosis, se combinaron TNF y Z-VAD-FMK para reproducir este tipo de muerte celular independiente de caspasas (Giampazolias et al., 2017; Alturki et al., 2018). La complejidad de la ruta de señalización TNF-TNFR1-TNFR2 es de especial importancia en macrófagos, ya que este tipo celular no solo expresa TNFR1, sino también TNFR2, produciendo altas cantidades de TNF tras la estimulación de varios receptores, incluyendo PRRs. El TNF no sólo regula las actividades proinflamatorias y de producción de citoquinas, sino que también media de modo autocrino la viabilidad y el estado de activación

## 5. DISCUSIÓN

de los macrófagos. Un ejemplo muy estudiado de este proceso es la muerte de macrófagos alveolares y derivados de monocitos infectados por *Mycobacterium tuberculosis*. En este caso, la muerte ha sido atribuida a la activación de la caspasa 8 inducida por TNFR1, junto con la activación de la apoptosis mediada por ROS inducidas por TNFR1 (Wajant & Siegmund, 2019).

Además, para comprobar que las condiciones de muerte se correspondían a un proceso necroptótico, se emplearon los inhibidores de RIPK1 y RIPK3, GSK547 y HS-1371, respectivamente. Efectivamente, el efecto producido por la combinación del Z-VAD-FMK con LPS se revertía, por lo que pudimos confirmar que estaba ocurriendo un proceso necroptótico. Giampazolias y col. emplearon el inhibidor de RIPK1 denominado Necrostatina-1 (Nec-1) para investigar si la necroptosis estaba ocurriendo en células tratadas con TNF/Z-VAD-FMK. En este caso, los valores de muerte celular se reducían cuando las células eran tratadas con el inhibidor de RIPK1 (Giampazolias et al., 2017). En otro estudio donde las células eran tratadas con LPS y Z-VAD-FMK, los valores de necroptosis se revertían tras el empleo de Nec-1 como inhibidor de RIPK1 (McComb et al., 2014). Por su parte, Alturki y col. emplearon el inhibidor de RIPK3, GSK872 para revertir la necroptosis inducida por LPS, o TNF $\alpha$ , en combinación con Z-VAD-FMK (Alturki et al., 2018). Todos estos resultados confirmaban que, tanto RIPK1 como RIPK3, estaban implicados en el proceso de necroptosis.

Una vez que se habían establecido las condiciones del control Z-VAD-FMK y LPS, se quisieron generar condiciones alternativas de necroptosis mediante el uso de inhibidores de IAPs, como el mimético de SMAC, SM-164. La proteína SMAC es una de las proteínas mitocondriales liberadas en respuesta a estímulos apoptóticos, que actúa como un inhibidor endógeno de varios miembros de la familia de las IAPs. Tras su liberación al citoplasma, el extremo N-terminal de SMAC se rompe, descubriendo una región que se une a los dominios BIR de XIAP. Esta interacción interfiere con la habilidad de las caspasas de unirse eficazmente a las IAPs, quedando las caspasas desplazadas y libres para ejecutar la apoptosis (Hennessy et al., 2013). McComb y col. estudiaron el efecto de SM-164 en BMDM procedentes de C57BL/6 a distintas concentraciones encontrando que, a partir de 1  $\mu$ M, las células comenzaban a reducir su viabilidad (McComb et al., 2012), por lo que fijamos esta concentración para realizar nuestros estudios.

Nuestros resultados demostraron que la combinación de Z-VAD-FMK con SM-164 en BMDM de C57BL/6 provocaba una reducción de la viabilidad celular por debajo del 20%, al igual que ocurría en otros estudios (He et al., 2011). Sin embargo, el tratamiento con los inhibidores de RIPK1 y RIPK3 – GSK547 y HS-1371 – aumentaba la viabilidad celular en torno al 60-80%, por lo que de nuevo se confirmaba que las condiciones de necroptosis habían quedado establecidas. Estos resultados coincidían con otros previamente publicados, donde al tratar a las células con TNF- $\alpha$ , Z-VAD-FMK y BV6 (inhibidor de IAPs) con el inhibidor de RIPK1 GSK'963, se observaba el bloqueo de la necroptosis al disminuir la muerte celular (Seo et al., 2020).

## 5. DISCUSIÓN

Cada vez existen más estudios que justifican la interrelación de las rutas de muerte celular (Chen et al., 2019; Legrand et al., 2019). Para constatar este hecho, combinamos dos inhibidores de proteínas antiapoptóticas, uno implicado en la apoptosis intrínseca (ABT-263) y el otro implicado en la extrínseca (SM-164). La inhibición de las proteínas antiapoptóticas BCL-2 y BCL-XL por parte del ABT-263, desencadenaría una alteración de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, liberándose SMAC al citoplasma. Al ser la proteína SMAC un antagonista endógeno de las IAPs, el empleo de SM-164 (un mimético de SMAC) debería de tener una actividad potenciadora con el SMAC liberado de forma natural en la apoptosis generada por ABT-263. En estas condiciones, y en presencia de Q-VD-OPh y Z-VAD-FMK (inhibidores pan-caspasa), estudiamos la necroptosis en BMDM de C57BL/6 en presencia de RIPK1 y RIPK3. Efectivamente, la presencia de GSK547 y HS-1371 previno la muerte de BMDM, lo que justificaba el establecimiento de las condiciones de necroptosis. Sin embargo, no podemos explicar por qué la reversión de los valores de muerte no fue tan significativa cuando el inhibidor de caspasas usado era Z-VAD-FMK.

Los resultados obtenidos con la combinación de Z-VAD-FMK y SM-164 confirmaban la inducción de la necroptosis, por lo que se quiso inducir ICD empleando otros inhibidores de las IAPs (XIAP, cIAP1/2, cIAP2) y de la proteína TAK1. Para ello, se emplearon los compuestos LCL161, AZD5582 y 5Z-7-OZ. Se ha visto que los antagonistas sintéticos de IAPs aumentan la eficacia de la quimioterapia y suprimen la supervivencia de las células tumorales (Moon et al., 2015). LCL161 es un mimético de SMAC, capaz de inhibir conjuntamente a XIAP y cIAP1 (Arnt et al., 2002). El mecanismo de acción de LCL161 está relacionado con la alteración de la señalización de supervivencia mediada por NF- $\kappa$ B, al inducir la degradación de cIAP1 en presencia de TNF $\alpha$ , promoviendo la formación de DISC y la inducción de la apoptosis (Pemmaraju et al., 2021). Este compuesto se ha empleado para tratar células tumorales de carcinoma hepatocelular en combinación con paclitaxel (Tian et al., 2014), o contra carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, en combinación con radioterapia (L. Yang et al., 2019). LCL161 también se ha utilizado como un mimético oral de SMAC en pacientes con mielofibrosis, donde se vio que era capaz de unirse y degradar cIAP1 y, en menor medida, cIAP2 y XIAP (Pemmaraju et al., 2021). LCL161 mostró efectos variables en la tumorigénesis dependiendo de la expresión endógena de BCL-2 ya que células de carcinoma hepatocelular con bajos niveles de expresión de BCL-2, fueron sensibles a LCL161, mientras que las que las sobreproductoras eran resistentes a este compuesto (Chen et al., 2012; Tian et al., 2014).

Se ha descrito que la administración intravenosa de AZD5582 a ratones xenotransplantados con células MDA-MB-231 de cáncer de mama, reducía rápidamente los niveles de cIAP1 y, por consiguiente, originaba una significativa actividad antitumoral a dosis bajas (Hennessy et al., 2013). En otro estudio en el que empleaba el inhibidor AZD5582 contra el cáncer de páncreas, se detectó una muerte celular apoptótica a través de la degradación

## 5. DISCUSIÓN

de cIAP1 dependiente de TNF $\alpha$ . Además, AZD5582 reprimía la expresión del gen que codifica para la proteína MCL-1 antiapoptótica de la familia BCL-2 (Moon et al., 2015).

Por su parte, TAK1 participa en rutas celulares de señalización proinflamatorias, induciendo la activación transcripcional de NF- $\kappa$ B (Ninomiya-Tsuji et al., 1999). Por consiguiente, la inhibición de TAK1 podría ser efectiva al prevenir la inflamación y la destrucción de tejidos promovidos por citoquinas proinflamatorias (Ninomiya-Tsuji et al., 2003).

La necroptosis inducida en BMDM de ratones C57BL/6 no modificó la producción de IL-1 $\beta$  con respecto a los cultivos no inducidos. Esto podría deberse a que la generación de la forma activa de la IL-1 $\beta$  es dependiente de las caspasas 1 y 8 (Dhuriya & Sharma, 2018). La interleucina IL-1 $\beta$  se sintetiza como un precursor citosólico que requiere ser escindido para ser biológicamente activo. Tras su maduración, la IL-1 $\beta$  se libera al espacio extracelular para desempeñar sus funciones, proceso que depende comúnmente de los complejos macromoleculares conocidos como inflamomas (Broz & Dixit, 2016). La activación de caspasa 1 se produce a través de dos vías distintas dependientes de RIPK3: una mediada por caspasa-8 y la otra mediada por NLPR3, que conduce a la formación de los inflamomas. Tras la activación de caspasa 1, ésta es capaz de escindir la IL-1 $\beta$  en su forma madura (Man et al., 2013). Esto demuestra que la participación de las caspasas es necesaria para la activación de la IL-1 $\beta$ . Por lo tanto, en las condiciones de necroptosis en las que hemos trabajado, donde todas las caspasas se encontraban inhibidas por el tratamiento con el inhibidor de pan-caspasa Z-VAD-FMK (Smith et al., 1980; Van Noorden, 2001), no se podía generar la forma activa de la IL-1 $\beta$ , justificándose así los bajos niveles obtenidos de esta molécula. Asimismo, otros estudios han confirmado que la necroptosis provoca el procesamiento y la liberación de IL-1 $\alpha$  independientemente del procesamiento y liberación de IL-1 $\beta$ . Esto sugiere que el mecanismo a través del cual una célula muere dicta el mecanismo inflamatorio que sigue, sirviendo esto como guía para la búsqueda de tratamientos de las enfermedades, orientando de una manera selectiva los mecanismos de muerte celular (England et al., 2014).

La CHX fue empleada como inductor de referencia de la apoptosis. Se ha observado que su mecanismo de acción es dependiente de las proteínas proapoptóticas BAX/BAK, ya que es capaz de producir una reducción en los niveles de MCL-1 (Goodall et al., 2016), proteína implicada en la ruta intrínseca de apoptosis. Sin embargo, se ha demostrado que el tratamiento con CHX genera la activación de las caspasas 3 y 8 (Irisarri et al., 2000), las cuales están implicadas en la ruta extrínseca de apoptosis. En el estudio de Tang y col. se demostró que el mecanismo de muerte llevado a cabo por la CHX en células T humanas era dependiente de FADD. Además, demostraron que el tratamiento con CHX producía la escisión de las pro-caspasas 3 y 8 a sus formas activas (Tang et al., 1999). Estos resultados se confirmaron en BMDM (Vince et al., 2018), pero no en células humanas HL-60 donde la CHX inhibió la activación de las pro-caspasas 3 y 8 (Cho et al., 2009a).

## 5. DISCUSIÓN

Seguidamente, creamos una situación de muerte por ICD implicando a la ruta intrínseca. Para ello, se inhibieron simultáneamente las proteínas antiapoptóticas BCL-XL, mediante ABT-263, y MCL-1, con dos inhibidores diferentes: AZD-5991 y S63845. Esto es debido a que, en macrófagos murinos, a diferencia de otras células, como los neutrófilos o los macrófagos humanos diferenciados de monocitos, la inhibición de MCL-1 no es suficiente para inducir muerte celular, y al menos se requiere una señal adicional para disparar MOMP. Esto se vio reflejado en estudios con macrófagos procedentes de ratones defectivos en MCL-1, los cuales mostraron una supervivencia normal, pero sobreproducían las proteínas BCL-2 y BCL-XL. Sin embargo, en macrófagos y neutrófilos humanos en los cuales se había silenciado la expresión del gen codificante de MCL-1, se inducía la apoptosis (Dzhagalov et al., 2007). Estos resultados fueron confirmados por Vince y col. en 2018, donde tanto MCL-1 como BCL-XL eran requeridas para la supervivencia de los macrófagos, ya que los BMDM tratados con el mimético del dominio BH3 ABT-737, en combinación con LPS, no eran susceptibles a la ICD. Sin embargo, cuando el tratamiento consistía en una combinación de este compuesto con inhibidores de MCL-1, como la CHX, sí se producía un proceso apoptótico mediado por la activación de caspasas (Vince et al., 2018).

Efectivamente, la inhibición conjunta de BCL-2, BCL-XL y MCL-1 presentaba un efecto sinérgico en cuanto a la producción de muerte, que llegó a alcanzar valores del 50% cuando se administraban combinados. Lo mismo ocurría al tratar líneas celulares tumorales de linfoma anaplásico de células grandes (Quentmeier et al., 2022) y carcinoma tímico (Müller et al., 2021), donde la combinación del ABT-263 con el AZD-5991 producía un mayor porcentaje de apoptosis y una mayor reducción del crecimiento del tumor (Quentmeier et al., 2022). El compuesto AZD-5991 también ha sido combinado con el Venetoclax, un inhibidor de BCL-2, que tiene actividad sinérgica induciendo la apoptosis en mieloma múltiple humano (Siu et al., 2019). Los valores obtenidos de muerte con la combinación de LPS, ABT-263 y S63845 fueron similares a los obtenidos en el estudio realizado por Chen y col. donde combinaban el inhibidor ABT-737 con S63845 (Chen et al., 2019).

Además de primar la ICD con LPS, los BMDM fueron inducidos a la muerte apoptótica con el lipopéptido sintético bacteriano P3C, ligando del TLR2/1 que ha sido relacionado con *Leishmania* (Murray et al., 2013; Jafarzadeh et al., 2019) por su papel inmunomodulador, semejante al que presenta la proteína SIR2RP1 derivada de *L. infantum*. Cuando SIR2RP1 se une al TLR2 del macrófago, induce la proliferación de células B y aumenta la expresión del MHC-II y de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD86. Asimismo, SIR2RP1 genera la maduración de las DCs, promoviendo la liberación de las proteínas proinflamatorias IL-12 y TNF- $\alpha$  (Silvestre et al., 2007). P3C también actúa como un inmunoestimulador y, por ello, se ha empleado como adyuvante en algunas vacunas frente *Leishmania* (Hewitt & Seeberger, 2001), o en combinación con la miltefosina, buscando una eficacia mejorada del fármaco (Shakya et al., 2012).

## 5. DISCUSIÓN

Tras el tratamiento de BMDM con los inhibidores de las proteínas involucradas en la apoptosis intrínseca, pudimos observar un aumento de la actividad de las caspasas ejecutoras 3/7, y de las caspasas iniciadoras 8 y 9. La activación de la caspasa 9 se debe a que es uno de los iniciadores de la ruta intrínseca de apoptosis (McIlwain et al., 2013). Tamaki y col. observaron que el tratamiento con ABT-263 en células P3C de cáncer de próstata promovía la escisión de las caspasas 3, 8 y 9 (Tamaki et al., 2014), al igual que ocurría en células de carcinomas pancreáticos (Hari et al., 2015). Tras el tratamiento de fibroblastos pulmonares de ratón con ABT-263, se observaron niveles de caspasa 3 activa (Cooley et al., 2023). En otros estudios, vieron que el mimético de BH3, ABT-737 provocaba una activación de las caspasas 3 y 7 (Giampazolias et al., 2017). En estudios con células de cáncer colorrectal, se detectaron altos niveles de caspasa 3 tras el tratamiento con ABT-263 y AZD-5991, tanto en combinación como de manera individualizada (Zhang et al., 2021). La combinación de ABT-263 y AZD-5991 produjo un aumento de la expresión de las caspasas 3, 7 y 9 en células procedentes de carcinomas tímicos (Müller et al., 2021). Asimismo, la combinación de ABT-737 y S63845 producía una escisión de la caspasa 8 en BMDM, provocando su activación (Vince et al., 2018), confirmando que existe una conexión entre el MOMP (vía intrínseca) y la ruta extrínseca de la apoptosis (Lawlor et al., 2017). Sin embargo, AZD-5991 y S63845 no fueron capaces de promover de manera individual la escisión de las caspasas 3 y 8 en células de cáncer colorrectal, pero sí en combinación con inhibidores de BCL-2/BCL-XL (Tron et al., 2018; Yao et al., 2022).

Se ha propuesto que la liberación de DAMPs mitocondriales también podrían provocar la activación del inflammasoma NLRP3 (Shimada et al., 2012; Iyer et al., 2013). La maduración de IL-1 $\beta$  dependiente de inflammasoma es un proceso que requiere de dos señales. La primera sirve como un paso de cebado, requerido para inducir la expresión de pro-IL-1 $\beta$ , y la segunda sirve de estímulo para activar el inflammasoma (Bauernfeind et al., 2009; Juliana et al., 2012). Además de la caspasa 1, se ha demostrado que otras enzimas son capaces de producir la maduración de IL-1 $\beta$  como, por ejemplo, la caspasa 8 (Maelfait et al., 2008; Afonina et al., 2015). La activación de la caspasa 8, a través de la formación del ripoptosoma, desencadenaría la escisión de IL-1 $\beta$  (Vince et al., 2012; Lawlor et al., 2015).

Los valores obtenidos de IL-1 $\beta$  con la combinación de LPS, ABT-263 y S63845 eran bastante similares a los obtenidos previamente (Vince y col., 2018). Estos autores cuantificaron la concentración de IL-1 $\beta$  en el sobrenadante de BMDM primados con LPS y tratados con una combinación de los miméticos de BH3, ABT-737 y S63845. Combinando ambos compuestos, se esperaba una inhibición mayor de las proteínas antiapoptóticas y, por consiguiente, unos niveles de apoptosis intrínseca mayores. Efectivamente, los niveles de IL-1 $\beta$  producidos por la combinación de ambos inhibidores fueron mucho mayores que los obtenidos tras el tratamiento único con S63845 (Vince et al., 2018). Sin embargo, los valores obtenidos de IL-1 $\beta$  por Chen y col. tras combinar ABT-737 y S63845 son ligeramente superiores a los obtenidos por nosotros (Chen et al., 2019). Asimismo, el empleo de los

## 5. DISCUSIÓN

compuestos denominados vioprolides, que son inhibidores de MCL-1 y BCL-2, terminaban desencadenando la maduración de IL-1 $\beta$ . Esto era debido a que la inducción de MOMP dependiente de BAX/BAK provocaba la liberación de factores proapoptóticos que iniciaban la apoptosis intrínseca, así como el agotamiento de las IAPs. La falta de IAPs, a su vez, opera aguas arriba de la formación del riopotosoma, lo que posteriormente da como resultado la maduración de IL-1 $\beta$  dependiente de caspasa-8. Estos resultados establecen al complejo riopotosoma/caspasa-8 como un punto de control pro-inflamatorio que detecta la perturbación de la integridad mitocondrial (Chauhan et al., 2018).

El último paso fue inducir ICD por la ruta extrínseca de apoptosis mediante el empleo de inhibidores de IAPs y TAK1. Los valores de mortalidad celular obtenidos de la combinación de LPS y P3C combinados con LCL161 fueron semejantes a los obtenidos por otros autores (Lawlor et al., 2017; Chen et al., 2019). En el caso del compuesto AZD5582, Chen y col. indujeron a la muerte cultivos de BMDM con TNF previamente al tratamiento con este compuesto, obteniendo valores de citotoxicidad en torno al 30%. Sin embargo, con la combinación de LPS con el inhibidor de TAK1 se llegaron a obtener valores de muerte cercanos al 60% (Chen et al., 2019).

Tras el tratamiento de BMDM con los compuestos inductores de apoptosis extrínseca, se observaron mayores niveles de activación en las caspasas ejecutoras 3/7 y la caspasa efectora 8. Esto correspondería a lo esperado, ya que la caspasa 8 es uno de los iniciadores de la ruta extrínseca de apoptosis (Kominami et al., 2012). Por el contrario, no se observaron cambios significativos en la actividad de la caspasa 9 con respecto a las células no tratadas (McIlwain et al., 2013). Tras administrar LCL161 a líneas celulares de pulmón, no se generaron altos niveles de activación de las caspasas 3 y 8 (C. Yang et al., 2016), mientras que, en líneas tumorales de mieloma, LCL161 aumentó la actividad de las caspasas 3, 8 y 9 (Ramakrishnan et al., 2014). AZD5582 disparó la escisión de las caspasas 8 y 9, provocando, en consecuencia, la activación de las caspasas 3 y 7 (Hao & Tang, 2018). Finalmente, la inhibición de TAK1 es capaz de aumentar la producción de la forma activa de la caspasa 8 (Hughes et al., 2023).

Las ubiquitina-ligasas inhibidoras de apoptosis cIAP1/2 y XIAP impiden la formación del riopotosoma, constituido por RIPK1, FADD y la caspasa 8. Las cascadas de señalización mediadas por TLRs o TNFR provocan la ubiquitinación de RIPK1 por parte de las IAPs, permitiendo que se ancle y se active el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, impidiendo que se forme el riopotosoma (Feoktistova et al., 2011; Tenev et al., 2011). Sin embargo, los factores proapoptóticos liberados de la mitocondria tras generarse MOMP, inician la apoptosis intrínseca y la inhibición de las IAPs, por lo que RIPK1 queda desubiquitinado e inicia la formación del riopotosoma, capaz de activar la caspasa 8, provocándose la escisión de IL-1 $\beta$  (Vince et al., 2012; Lawlor et al., 2015, 2017).

## 5. DISCUSIÓN

La inhibición conjunta de XIAP y cIAP genera una mayor activación de la IL-1 $\beta$  que la pérdida única de XIAP (Lawlor et al., 2017). Esto podría explicar en parte nuestros resultados, donde los mayores valores obtenidos de IL-1 $\beta$  corresponden al compuesto AZD5582, el cual es capaz de inhibir las tres IAPs: cIAP1, cIAP2 y XIAP. Sin embargo, los valores de IL-1 $\beta$  tras el tratamiento con LCL-161 y AZD5582 difieren bastante de los obtenidos en BMDM con el inhibidor denominado Cp. A, que también presenta la capacidad de inhibir las tres IAPs, ya que los valores obtenidos tras 24 h de exposición alcanzaron los 10.000 pg/mL (Lawlor et al., 2017).

El papel de TAK1 consiste en una señalización espontánea inflamatoria, promoviendo la quiescencia y la homeostasis celular. Tras el tratamiento con el inhibidor de TAK1 5Z-7-OZ, se produce una activación espontánea del inflammasoma y la secreción de IL-1 $\beta$  madura en los sobrenadantes celulares. En nuestro trabajo, los niveles de IL-1 $\beta$  obtenidos tras el tratamiento de las células con 5Z-7-OZ fueron similares a los obtenidos por otros autores (Malireddi et al., 2018).

La liberación de DAMPs durante la ICD sirve como mecanismo de activación de las DCs, así como de la liberación de citoquinas proinflamatorias. Basándonos en estudios anteriores realizados con *Leishmania*, esperábamos encontrar que la condición de ICD que produjera mayor cantidad de IL-1 $\beta$ , sería la mejor candidata para destruir al parásito, ya que como hemos comentado anteriormente, esta interleucina era capaz de controlar la infección provocada por *Leishmania* (Patil et al., 2018). Esto explicaría los resultados obtenidos con los inductores de necroptosis, donde la viabilidad de los amastigotes intracelulares de bazos infectados se mantuvo o aumentó con respecto al control, ya que los niveles de IL-1 $\beta$  eran semejantes a los de las células no tratadas. Nuestros experimentos corroboraron que los tratamientos más eficaces en reducir la viabilidad de los amastigotes intracelulares de bazos infectados, fue el tratamiento con los inductores de apoptosis intrínseca (ABT-263 en combinación con AZD-5991 o S63845) y los inductores de apoptosis extrínseca (LCL-161 y AZD5582) tras 3 h de tratamiento, confirmando que el tratamiento durante un tiempo corto era suficiente para inducir la muerte celular y la liberación de IL-1 $\beta$  (Lawlor et al., 2017). Por otro lado, si nos fijamos en la cantidad de IL-1 $\beta$  liberada por las células tratadas durante 24 h, AZD5582 produjo una mayor liberación de IL-1 $\beta$  que LCL161. A la vista de los valores de IL-1 $\beta$  obtenidos en los experimentos anteriores, se podría explicar porqué en el explante infectado, en co-cultivo con bazos sanos estimulados con BMDM inducidos a ICD, la viabilidad de los parásitos tras el tratamiento con AZD5582 durante 24 h era mayor que con LCL161.

En cuanto a los distintos comportamientos obtenidos con células de ratones C57BL/6 y BALB/c, podrían ser atribuidas a las diferentes respuestas de los macrófagos de estas estirpes de ratón al LPS (Mills et al., 2000; Kuroda et al., 2002; Kuroda & Yamashita, 2003), relacionadas con sus diferentes perfiles pro-inflamatorio de tipo Th1 y anti-inflamatorio de tipo Th2, respectivamente (Mills et al., 2000; Watanabe et al., 2004).

## 5. DISCUSIÓN

Cabe destacar que los mejores resultados se obtuvieron con esplenocitos aislados de ratones C57BL/6, estimulados con BMDM de ratones C57BL/6, sobre la base de esplenocitos de BALB/c infectados con *Leishmania*. Esto podría explicarse en base al perfil pro-inflamatorio de la estirpe C57BL/6, que generaría una respuesta de tipo Th1. De esta forma, la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de los esplenocitos C57BL/6, como IL-12, sobre el bazo infectado de BALB/c, además de la generación de linfocitos T CD4 capaces de producir IFN- $\gamma$ , podría estar generando una respuesta frente a los parásitos. Asimismo, si la presentación antigénica de los PAMPs correspondientes a *Leishmania* está ocurriendo de una forma cruzada en las APCs presentes en el bazo sano, los antígenos de *Leishmania* se estarían presentando en moléculas MHC-I, por lo tanto, se generarían linfocitos T CD8 citotóxicos, los cuales podrían sufrir una expansión clonal frente a los antígenos de *Leishmania* presentes en el bazo infectado y generar una respuesta inmune frente a los parásitos.

En un estudio anterior, se afirmaba que para eliminar completamente *Leishmania* eran necesarias células efectoras productoras de INF- $\gamma$ , principalmente células T CD4, que elaboran una respuesta inmunitaria proinflamatoria de tipo Th1 (Bajénoff et al., 2006). La liberación de INF- $\gamma$  puede generar un proceso de señalización en macrófagos infectados, capaz de inducir la expresión de enzimas productoras de NO y ROS, desencadenando la destrucción de los parásitos intracelulares (Bogdan et al., 1990). Se ha comunicado que *Leishmania* es capaz de bloquear la liberación de IL-12 por parte de los macrófagos inflamatorios (von Stebut et al., 1998), además de impedir la activación de los linfocitos T CD4 vírgenes y la estimulación de los linfocitos T CD4 específicos de antígeno (Kima et al., 1996). Sin embargo, este problema se encontraría resuelto al estar empleando esplenocitos procedentes de bazos sanos, los cuales no han estado en contacto con la infección y, por lo tanto, no estarían previamente manipulados por *Leishmania*. De esta manera, podrían liberar adecuadamente estas citoquinas proinflamatorias, y los linfocitos T CD4 presentes en el bazo sano se activarían correctamente.

Si nos fijamos en la mortalidad observada con los distintos métodos empleados, los macrófagos infectados con *Leishmania* presentaban porcentajes de muerte menores que las células no infectadas. Estos resultados coinciden con numerosos estudios que argumentan que las células infectadas con *Leishmania* retrasan la muerte celular (Moore & Matlashewski, 1994; Chen et al., 2000; Gao & Abu Kwaik, 2000; Aga et al., 2002; Akarid et al., 2004; Lisi et al., 2005; Song et al., 2005; Ruhland et al., 2007; Donovan et al., 2009; Giri et al., 2016). La primera demostración de la capacidad de *Leishmania* de inhibir la apoptosis de las células hospedadoras fue llevada a cabo por Moore y Matlashewski en 1994. Estos autores mostraron que BMDM privados del factor de crecimiento M-CSF, no entraban en apoptosis cuando eran infectados con promastigotes o eran incubados con sobrenadantes recogidos de células infectadas. Estos resultados sugerían la existencia de factores solubles, como el LPG, que eran capaces de prevenir la muerte del macrófago (Moore & Matlashewski, 1994). Más tarde,

## 5. DISCUSIÓN

Akarid y col. descubrieron que la infección de BMDM con *L. major* protegía a los macrófagos de la apoptosis causada por el tratamiento con estaurosporina al bloquear la activación de la caspasa 3, la liberación del citocromo c y la inhibición de la ruta del NF- $\kappa$ B (Akarid et al., 2004). Otro de los mecanismos empleados por *Leishmania* tras el tratamiento con actinomicina D, es inhibiendo la escisión de la proteína quinasa C (PKC), implicada en procesos de regulación de la supervivencia y muerte celular durante infecciones intracelulares microbianas (Olivier et al., 1992; Lisi et al., 2005). Ruhland y col. observaron un aumento de la supervivencia tanto en BMDM como en los macrófagos RAW 264.7 infectados, debido a la señalización a través de la vía PI3K/Akt y a la fosforilación e inactivación del regulador proapoptótico de la familia BCL-2, BAD (Ruhland et al., 2007). La infección de la línea celular RAW 264.7 por *L. major* reducía la frecuencia de apoptosis, incluso tras el tratamiento con CHX (Donovan et al., 2009). En el estudio de Giri y col., se demostró cómo *Leishmania* era capaz de aumentar la expresión de MCL-1 en macrófagos infectados, aumentando así la supervivencia de sus células hospedadoras tras el tratamiento con actinomicina D (Giri et al., 2016).

Cabe destacar que las células infectadas tratadas con 5Z-7-OZ presentaban valores de muerte mucho más reducidos que las células no infectadas. Esto podría deberse a la capacidad que presenta el parásito de disminuir los niveles de ROS mediante la inhibición de la proteína TAK1, promoviendo así su supervivencia intracelular. En el estudio llevado a cabo por Saha y col. se vio que los parásitos controlaban la respuesta proinflamatoria de la célula hospedadora mediante la reducción de la producción de ROS en las células infectadas *in vitro* con *Leishmania* mediante la supresión de la proteína TAK1, por lo que podría ser una de las razones por las que los parásitos evaden la respuesta proinflamatoria del hospedador (Saha et al., 2020).

Se ha demostrado que *Leishmania* inhibía la apoptosis inducida por CHX en macrófagos infectados, dependiendo de la especie y la cepa del parásito. Estas diferencias podrían deberse a variaciones en los fosfolípidos del parásito, concretamente del LPG, ya que juegan un papel vital en el establecimiento de la infección de *Leishmania* (Donovan et al., 2009). Asimismo, la producción de proteínas antiapoptóticas, como BCL-XL, está aumentada en las infecciones por *Leishmania*. Esto es debido a que *Leishmania* activa la expresión de NF- $\kappa$ B y, consecuentemente, se sobreproducen BCL-2 y BCL-XL, que impiden la liberación de citocromo c, previniéndose el proceso apoptótico (Chen et al., 2000; Song et al., 2005; Ruhland et al., 2007). Tras obtener los resultados al tratar BMDM con CHX, pudimos ver que los niveles de apoptosis en las células infectadas eran menores que en las no infectadas.

Aunque los macrófagos son considerados las principales células hospedadoras de *Leishmania*, el parásito también puede invadir otras células y manipular sus rutas de muerte, ya que su supervivencia en el interior de éstas tiene una importante repercusión en su ciclo biológico. Los neutrófilos son las primeras células que fagocitan a los promastigotes de *Leishmania*, por lo que constituyen un importante refugio en los primeros momentos de la

## 5. DISCUSIÓN

infección. *Leishmania* es capaz de prolongar la vida media de neutrófilos infectados, tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante un proceso relacionado con la reducción de la caspasa 3 (Aga et al., 2002). *L. mexicana* también tiene la capacidad de inhibir la apoptosis de DCs (Valdés-Reyes et al., 2009).

No solo *Leishmania* tiene la capacidad de alterar los procesos de muerte de sus células hospedadoras, sino que otros patógenos también pueden modular los componentes de las rutas apoptóticas al presentar una gran variedad de estrategias para tomar el control de la célula hospedadora (Gao & Abu Kwaik, 2000). Las bacterias intracelulares *Salmonella* y *Shigella* secretan factores al citoplasma que activan la caspasa 1, provocando la liberación de la forma activa de IL-1 $\beta$  (Hilbi et al., 1998; Hersh et al., 1999). *Yersinia* secreta proteínas solubles al citoplasma de la célula hospedadora que se unen a la proteína MAPKK, bloqueando la activación de la ruta de supervivencia de NF- $\kappa$ B (Schesser et al., 1998; Orth et al., 1999). *Mycobacterium tuberculosis* causa una reducción de la expresión de BCL-2, induciendo la apoptosis dependiente de caspasa 1 (Keane et al., 1997; Klingler et al., 1997). *Chlamydia trachomatis*, causante de infecciones de transmisión sexual, secreta unas proteínas que bloquean la liberación del citocromo c desde la mitocondria y la activación de la caspasa 3, inhibiendo la apoptosis (Fan et al., 1998; Bastidas et al., 2013). Otras bacterias, como *Coxiella burnetii* (Lührmann & Roy, 2007; Voth et al., 2007), *Anaplasma phagocytophilum* (Scaife et al., 2003; Alberdi et al., 2016), *Rickettsia rickettsii* (Clifton et al., 1998; Bechelli et al., 2009) y *Legionella* (Shin & Roy, 2008; Isberg et al., 2009), también presentan la capacidad de inhibir la apoptosis de sus células hospedadoras, como macrófagos y neutrófilos.

Es importante destacar que, en la mayoría de los tratamientos realizados, las concentraciones de IL-1 $\beta$  halladas eran mucho menores en las células infectadas con *Leishmania* con respecto a las no infectadas. En varios estudios, se ha comunicado que la producción de IL-1 $\beta$  podría estar involucrada en la protección del hospedador y la reducción de la carga parasitaria (Hatzigeorgiou et al., 1996; von Stebut et al., 2003; Voronov et al., 2010; Kautz-Neu et al., 2011; Karam et al., 2013; Gupta et al., 2017; Hartley et al., 2018; Saha et al., 2019).

*Leishmania* inhibe la expresión del inflammasoma NLRP3 y, en consecuencia, la maduración de IL-1 $\beta$  mediada por caspasa 1 (Gupta et al., 2017; Hartley et al., 2018). Gupta y col. cuantificaron los niveles de IL-1 $\beta$  tras la infección de células RAW 264.7 y BMDM con *L. donovani*, y pudieron comprobar que la infección disminuía la producción de esta citoquina al inhibir la activación de la caspasa 1. Asimismo, *L. donovani* era capaz de aumentar la producción de A20, una proteína inhibidora del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. De esta forma, el bloqueo de NF- $\kappa$ B impedía la formación del inflammasoma NLRP3 y, en consecuencia, de la pro-forma de IL-1 $\beta$ . Además, *L. donovani* indujo la proteína UCP2, encargada de inhibir el procesamiento de IL-1 $\beta$  mediante ROS, disminuyendo así todos los niveles de IL-1 $\beta$  (Gupta et al., 2017). Otra especie que ha sido descrita como manipuladora de la activación del

## 5. DISCUSIÓN

inflammasoma y como inhibidora de la producción de IL-1 $\beta$  es *L. guyanensis*, a la que se atribuye la sobreexpresión del gen codificante de la proteína A20 (Hartley et al., 2018). La generación de IL-1 $\beta$  puede ser inhibida por el LPG de *Leishmania*, entre cuyas funciones está disminuir la producción de IL-1 $\beta$  inducida por LPS al reducir la estabilidad de su ARNm. Estos resultados proporcionan una explicación para la desactivación de los macrófagos y el defecto de respuesta de células T en pacientes con leishmaniasis (Hatzigeorgiou et al., 1996).

Sin embargo, aunque la activación del inflammasoma pueda servir como un mecanismo de defensa frente *Leishmania*, cuando las células del sistema inmune fallan en la eliminación del parásito de los tejidos, la activación mantenida del inflammasoma promueve una producción descontrolada de IL-1 $\beta$ , con una fuerte infiltración de neutrófilos, los cuales son una fuente de IL-1 $\beta$ , lo que podría conllevar a una destrucción de los tejidos y un empeoramiento de la enfermedad (Zamboni & Sacks, 2019). En varios estudios con *L. major*, la activación del inflammasoma puede contribuir indirectamente al aumento de la carga parasitaria y la persistencia de la infección, debido a la capacidad del eje inflammasoma/IL-1 $\beta$  de promover una respuesta inmune del tipo Th2 (Anderson et al., 2005; Ben-Sasson et al., 2009; Charmoy et al., 2016). De hecho, en los pacientes de leishmaniasis cutánea causada por *L. mexicana*, la alta producción de IL-1 $\beta$  ha sido relacionada con la gravedad de la enfermedad (Fernández-Figueroa et al., 2012).

### 5.2. PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS Y FENOTIPADO DE DCS ESPLÉNICAS

Estudios preliminares en infecciones de *Leishmania*, donde se utiliza la OVA como proteína modelo de estudios de presentación antigénica, mostraron que cuando las APC, concretamente las DCs, estaban infectadas con una cepa de *Leishmania* modificada genéticamente para producir OVA secretada al exterior celular, se generaba una respuesta de células T CD8+ específica frente al parásito, capaz de permitir la proliferación de linfocitos T y la liberación de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, la respuesta de células T CD8+ era menor cuando OVA no era secretada al exterior (Bertholet et al., 2005).

Se han utilizado cepas de *L. major* modificadas para producir OVA anclada a la membrana plasmática para infectar DCs aisladas de bazo de ratones C57BL/6, que eran reconocidas por células T CD4 y CD8 específicas de OVA, tanto *in vitro* como *in vivo* (Bertholet et al., 2005). En un estudio posterior, DCs esplénicas eran capaces de hacer la presentación antigénica a células T específicas de OVA cuando ésta se localizaba en la membrana del parásito, pero no cuando ésta se encontraba en la fracción citosólica (Prickett et al., 2006). La localización celular de OVA fusionada con HASPB en cepas sobreproductoras de *L. infantum* fue confirmada mediante inmunodetección y microscopía confocal, en forma de un punteado fluorescente en la superficie del parásito (Prickett et al., 2006). Para evaluar el fitness de los parásitos modificados, la tasa de crecimiento de los cultivos fue medida diariamente y comparada con las cepas salvajes. Se pudo comprobar que la tasa de crecimiento de los parásitos era semejante tanto en las cepas modificadas como en las cepas salvajes, de la misma manera que han descrito otros autores (Vacchina & Morales, 2014).

La radiación UV puede desencadenar una amplia variedad de efectos biológicos y fisiológicos en los organismos al provocar la activación de determinadas vías de señalización intracelular en respuesta al daño del ADN (Gentile, 2003; Srivastava & de Larrea, 2008). En una primera aproximación, queríamos conocer la energía UV necesaria para producir apoptosis en RAW 264.7. Tras probar energías de radiación UV crecientes, de 10 a 600 mJ/cm<sup>2</sup> se observó que los valores de apoptosis aumentaban proporcionalmente con la radiación. Los valores elegidos para provocar la apoptosis en las células RAW 264.7 tras 24 h de exposición fueron 240 y 500 mJ/cm<sup>2</sup>, responsables de valores de apoptosis del 50 y 80%, respectivamente. Estos valores de radiación son mayores a los descritos por otros autores, en los que la irradiación de BMDM con 50 mJ/cm<sup>2</sup> originaban un 35% de células apoptóticas tras 12 h de incubación post-radiación (Srivastava & de Larrea, 2008). Otros autores evaluaron el efecto de 1 pulso de 100 J en células Jurkat tras 4 h de incubación. La apoptosis fue cuantificada mediante citometría de flujo con 7AAD/Anexina, en el que obtuvieron una media del 40% de apoptosis (Dalboni et al., 2021). Además de apoptosis, la

## 5. DISCUSIÓN

radiación UV de BMDM de ratones C57BL/6 puede generar piroptosis mediada por inflammasoma (Liu et al., 2017).

Cuando evaluamos la apoptosis producida por radiación UV en macrófagos RAW 264.7 infectados con *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA, encontramos que cuando las células se exponían a tiempos de irradiación cortos (4 h), no había diferencias significativas con las células no irradiadas, pero cuando el tiempo de irradiación aumentaba (24 h), la señal de fluorescencia emitida por mCherry disminuía significativamente en comparación con las células no irradiadas. Estos resultados son congruentes con los encontrados por Hodgkinson & Herman en 1980, que observaron que la carga parasitaria del hígado de un ratón infectado con amastigotes irradiados con UV disminuía en comparación con la carga parasitaria del hígado de un ratón infectado con parásitos no irradiados. Esto se debía a que la mayoría de los parásitos irradiados estaban muertos y no tenían capacidad de establecer una infección (Hodgkinson & Herman, 1980).

La eficiencia de la presentación cruzada se puede evaluar mediante el uso de células T CD8+ específicas de antígeno, como el hibridoma B3Z (Karttunen et al., 1992), o las células OT-I, analizando su activación por el marcador CD69 o evaluando su proliferación (Alloatti et al., 2015; Sadiq et al., 2020). Cuando las células B3Z se cocultivan con APCs cargadas con OVA, o directamente con el dominio de OVA que contiene el péptido SIINFEKL, las células B3Z se activan y producen  $\beta$ -galactosidasa, capaz de transformar su sustrato en un producto coloreado (Karttunen et al., 1992). De esta manera, se puede cuantificar el nivel de activación de estas células y, por consiguiente, evaluar la eficiencia de presentación cruzada antigénica. La eficiencia de la presentación cruzada resultó ser mejor en BMDC que en BMDM. Esto puede ser debido a que las DCs son las APCs por excelencia, ya que tienen una mayor capacidad de captar antígenos, de procesarlos y de presentarlos a las células T (Balan et al., 2019). Sin embargo, se sabe que los macrófagos también son capaces de llevar a cabo la presentación cruzada (Muntjewerff et al., 2020).

Cuando las APCs fueron cebadas con bbOVA – bolas de vidrio recubiertas con OVA – hubo una señal de activación de las células B3Z en comparación con el control de bolas sin recubrir, aunque independientemente de la carga de antígeno. Por el contrario, no hubo una activación de la  $\beta$ -galactosidasa cuando las APCs se cebaron con sOVA – OVA soluble – o SIINFEKL, y en ningún caso hubo diferencias significativas entre las APCs estimuladas con LPS y las no estimuladas. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Alloatti y col. al estudiar la presentación cruzada en BMDC estimuladas con LPS y cebadas con SIINFEKL, sOVA y bbOVA. Las absorbancias obtenidas tras la activación de las B3Z mostraban un aumento gradual de la actividad  $\beta$ -galactosidasa a medida que aumentaban las concentraciones de SIINFEKL (Alloatti et al., 2015, 2016). En este caso, el péptido SIINFEKL fue presentando con la misma eficiencia en células estimuladas con LPS y las no estimuladas. Sin embargo, en las BMDC que habían sido cebadas con sOVA y bbOVA, sí existieron diferencias en la eficiencia de la presentación cruzada entre las células tratadas y las no

## 5. DISCUSIÓN

tratadas con LPS, siendo mayor en las células tratadas en comparación con las no tratadas. Al igual que ocurría con los tratamientos anteriores, la estimulación de las B3Z aumentaba a medida que aumentaba la concentración de OVA (Alloatti et al., 2015). En otro experimento de presentación cruzada en células BMDC incubadas con SIINFEKL y OVA como controles positivos, se analizó la capacidad antigénica de una cepa de *L. amazonensis* fotoinactivada que producía OVA, demostrándose que los parásitos modificados activaban a las células B3Z a los mismos niveles que los controles positivos (Dutta et al., 2011).

Sin embargo, cuando estudiamos si las BMDCs cebadas con RAW 264.7 infectadas con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA e irradiadas con UV eran capaces de realizar una presentación cruzada eficiente a las células B3Z, no obtuvimos resultados positivos. El fin de este experimento era la generación de DAMPs tras la inducción de ICD mediante la energía UV, ya que la liberación de DAMPs, y su unión a PRRs presentes en DCs, era capaz de generar una cascada celular que, finalmente, resultó en la activación de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa (Paludan et al., 2019; Gong et al., 2020). Una explicación es que la presentación cruzada de antígenos derivados de células que sufren ICD permite que las DCs presenten proteínas exógenas en moléculas MHC-I a células T CD8. Asimismo, las células en camino de la muerte también proporcionan señales inflamatorias e inmunogénicas que determinan la eficiencia de la presentación cruzada (Yatim et al., 2017).

Se ha demostrado que las APCs activadas poseen una mayor actividad como presentadoras de antígenos. Así, en experimentos con *Toxoplasma gondii* se observó que los esplenocitos infectados poseían una mayor capacidad para activar la respuesta de las células B3Z con respecto a los no infectados (Gubbels et al., 2005). La presentación cruzada también ha sido evaluada empleando como APCs BMDCs y fibroblastos infectados con *Toxoplasma gondii* que expresaba la OVA secretada. Las células infectadas presentaban los antígenos en la molécula MHC-I de una forma más efectiva que las células no infectadas (Dzierszynski et al., 2007).

A continuación, realizamos experimentos de presentación antigénica para comprobar si el mecanismo de acción era debido a una presentación cruzada y una proliferación de linfocitos T CD8. Como paso previo, se realizó el estudio de los marcadores de activación de las DCs que iban a ser empleadas en el experimento. Las DCs inmaduras se caracterizan por una actividad endocítica alta y una baja expresión de moléculas coestimuladoras y citoquinas (Mellman & Steinman, 2001). Sin embargo, cuando las DCs entran en contacto con PAMPs o DAMPs, se activan y se desencadena una cascada de señalización que finaliza con su maduración (Mellman & Steinman, 2001; Fang et al., 2014). El estado de maduración de las DCs afecta negativamente a su capacidad de realizar la presentación cruzada, ya que su capacidad fagocítica se ve disminuida (Blander, 2018). Sin embargo, las DCs maduras pueden estimular la inmunidad adaptativa de una manera más efectiva que las DCs inmaduras. Estas propiedades han inspirado el diseño de varios adyuvantes empleados en vacunas basados en una eficiente activación y una maduración funcional de las DCs

## 5. DISCUSIÓN

(Upchurch et al., 2015; Fu et al., 2016; X. Liu et al., 2016b). Por este motivo, cuando se establece un sistema de presentación cruzada es importante realizar un estudio del estado de maduración de las DCs previo a su uso en experimentos de presentación cruzada. Existen varios métodos para caracterizar el estado de activación de las DCs. Uno de ellos es la cuantificación de las citoquinas pro-inflamatorias, como IL-12, IL-6 y TNF- $\alpha$ , o bien, se puede cuantificar la expresión de marcadores fenotípicos, como pueden ser las moléculas MHC-II, o las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (Dudek et al., 2013).

En primer lugar, para activar las rutas de señalización intracelulares necesarias para la activación y maduración de las DCs, realizamos una estimulación de los TLRs, incubando las DCs con LPS para estimular su maduración y aumentar la expresión de CD80, CD86 y MHC-II. Los resultados se analizaron mediante citometría de flujo donde, tras seleccionar la población doblemente positiva CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, se encontró una mayor expresión de moléculas coestimuladoras en las células que habían sido tratadas con LPS, con una diferencia muy significativa en el marcador CD86, en comparación con las células no estimuladas. En un estudio llevado a cabo por Healy y col., se realizó el fenotipado de las DCs tras ser estimuladas con LPS y TNF- $\alpha$ , donde se analizaron los marcadores de superficie MHC-II, CD40, CD80 y CD86, y las citoquinas IL-12 e IL-10. Afirmaron que las señales producidas a través de TNF- $\alpha$  y LPS difieren en su habilidad de estimular la expresión de moléculas de superficie y la producción de citoquinas por parte de las DCs. La exposición a LPS da como resultado la activación completa de las DCs, viéndose reflejado en los altos niveles de MHC-II, CD80 y CD86 y la producción de IL-12. Por el contrario, las DC que fueron tratadas con TNF- $\alpha$  no aumentaron los niveles de CD40 y CD80 de la superficie celular ni produjeron IL-12 (Healy et al., 2009). En estudios más recientes, se encontró que, tras haber estimulado las DCs con LPS, los marcadores MHC-II, CD80, CD86 y CD40 aumentaban su expresión, especialmente CD40, seguido de CD80 (Sadiq et al., 2020).

Tras la caracterización del estado de activación de las DCs, se realizaron los experimentos de presentación cruzada, con el fin de comprobar si los tratamientos que habían sido más efectivos en reducir la viabilidad de los parásitos de *Leishmania* en el experimento del coexplante, eran capaces de estimular la proliferación de linfocitos T. Los tratamientos elegidos pretendían reproducir condiciones de ICD que fueran capaces de estimular a las DCs, mediante la liberación de DAMPs y citoquinas proinflamatorias (Krysko et al., 2012; Gallo & Gallucci, 2013). De esta forma, las DCs se activarían y comenzarían a aumentar la expresión de moléculas coestimuladoras y la liberación de citoquinas proinflamatorias (Dudek et al., 2013). Para las condiciones de ICD en macrófagos RAW 264.7, se utilizaron tanto inhibidores de la ruta intrínseca (ABT-263 en combinación con AZD-5991) como de la ruta extrínseca (LCL161).

Los parásitos irradiados de la cepa *L. infantum* 2713 HASPB:OVA fueron sometidos a 300 mJ/cm<sup>2</sup> de radiación UV para provocar su apoptosis y anular su virulencia (Hodgkinson & Herman, 1980). Éstos servirían como fuente de PAMPs, para activar las DCs, junto con los

## 5. DISCUSIÓN

DAMPs liberados por las células RAW 264.7. Las DCs finalmente empleadas procedían del bazo de ratones a los que se les había implantado células de un tumor de melanoma B16 capaces de secretar Flt3L. Las células tumorales de estos ratones secretan Flt3L de una manera sistémica y continua en el tiempo, estimulando la propagación de todas las subpoblaciones de DCs al bazo del ratón (Arora & Porcelli, 2016). Concretamente, la subpoblación de DCs empleada fue de cDC1, que está especializada en realizar la presentación cruzada antigénica, ya que presenta una capacidad superior de captación de antígenos extracelulares, concretamente los procedentes de células en camino de la muerte (Albert et al., 1998; Sancho et al., 2008, 2009; Cancel et al., 2019). Las células T empleadas fueron linfocitos T CD8 esplénicos purificados a partir de bazos procedentes de ratones OT-I (células OT-I), y para medir su proliferación se utilizó citometría de flujo y la tinción CellTrace Yellow (Tempany et al., 2018).

Para que ocurra la proliferación de las células OT-I, se requiere la presentación del péptido SIINFEKL en la molécula MHC-I presente en las DCs, y el reconocimiento de este complejo por parte del TCR específico de OVA presente en las células OT-I. El TCR se encuentra asociado con una molécula coestimuladora denominada CD3, la cual proporciona la capacidad de transducción de señales transmembrana (Weiss & Littman, 1994). Además, se requiere una segunda señal estimuladora procedente de la interacción entre las moléculas coestimuladoras presentes en las DCs y en las células T. La molécula coestimuladora mejor caracterizada de las células T es CD28, una glicoproteína transmembrana que se une a dos ligandos expresados en las APCs: CD80 y CD86. La interacción del CD28 no es suficiente, pero junto con las señales producidas por el TCR, la activación de las células T aumenta (L. Chen & Flies, 2013; Peterson & Maltzman, 2019). Por esta razón, se emplearon anticuerpos frente a CD28 y CD3, ya que son capaces de estimular ambos receptores presentes en las células T, sirviendo como control positivo de proliferación (Sadiq et al., 2020). Otro de los controles empleados fue la incubación de las DCs con LPS y SIINFEKL (Alloatti et al., 2016).

Nuestros resultados demuestran que las células T fueron capaces de proliferar tras la estimulación con los controles positivos  $\alpha$ -CD3/CD28 y la combinación del LPS y el péptido SIINFEKL. Sin embargo, con los amastigotes de la cepa *L. infantum* 2713 HASPB:OVA, la proliferación de las células T no fue significativa con respecto al control no estimulado. El tratamiento de LPS con ABT-263 y AZD-5991 no fue capaz de generar proliferación en los linfocitos T. Sin embargo, el tratamiento con LCL-161 aumentó significativamente la proliferación de los linfocitos T, generando incluso porcentajes superiores a los de los controles positivos. En un experimento similar, empleando distintas cepas de *L. major* sobreproductoras de OVA secretada y no secretada, se observó que la OVA secretada por los parásitos en DCs infectadas era una fuente de péptidos para inducir la formación de células T CD8 específicas del parásito (Bertholet et al., 2005). La localización de OVA en la membrana es de singular importancia en la respuesta proliferativa de las células T, ya que se ha comunicado que una cepa de *L. major* que presentaba la proteína de fusión HASPB:OVA en

## 5. DISCUSIÓN

la superficie de la membrana del parásito originaba una mayor proliferación que una cepa mutada incapaz de modificar post-traduccionalmente dicha proteína, impidiendo su exposición exterior. Se concluyó que la localización de esta proteína en la cara externa de la membrana plasmática podría suponer una ventaja en términos de una mayor accesibilidad para las proteasas endosomales responsables del procesamiento de antígenos (Prickett et al., 2006). Los experimentos de presentación cruzada *in vivo*, utilizando cepas de *E. coli*, sobreproductoras de OVA, demostraron la proliferación de células OT-I (Blander & Medzhitov, 2006; Sadiq et al., 2020). Por otra parte, se probó la capacidad de proliferación de células T CD4 específicas de OVA (células OT-II) tras el co-cultivo con BMDC que habían fagocitado células B de la línea celular A20 apoptóticas e infectadas con una cepa de *Listeria* que expresaba OVA (Campisi, 2017).

Para el fenotipado de DCs infectadas con *Leishmania* el método de elección fue la citometría de flujo. Para ello, las poblaciones de DCs se seleccionaron en función de sus receptores de membrana. Las células que eran positivas a CD11c<sup>+</sup> y MHC-II<sup>+</sup>, se clasificaron como cDCs. A partir de esta población doble positiva, se diferenciaron las cDC1 y las cDC2, siendo XCR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup> y XCR1<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>, respectivamente. Para caracterizar a la población de pDCs, se seleccionó la población que era positiva para los marcadores Siglec-H y CD317 (Siglec-H<sup>+</sup>/CD317<sup>+</sup>) (Miltenyi Biotec, 2023).

Arora y Porcelli se encargaron de realizar un método para aislar las diferentes subpoblaciones de DCs, a partir de bazo de ratones en los que se había implantado el melanoma B16-F1t3L con el fin de producir una expansión del número de DCs en órganos linfoides periféricos. Estos autores caracterizaron 3 subtipos diferentes de DCs: plasmocitoides, CD8α<sup>Pos</sup> y CD8α<sup>Neg</sup>, correspondiendo estas dos últimas a cDC1 y cDC2, respectivamente. Las pDCs fueron seleccionadas empleando los marcadores B220 y CD11c (B220<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>) (Arora & Porcelli, 2016). Las cDCs fueron caracterizadas como CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup> y, a partir de esta población, se obtuvieron las cDC1 (CD11c<sup>+</sup>/CD8α<sup>+</sup>) y cDC2 (CD11c<sup>+</sup>/CD8α<sup>-</sup>) (Arora & Porcelli, 2016; Cunningham et al., 2016). Por su parte, las DCs se enmarcaban bajo el fenotipo CD15<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-CD14<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>, representando apenas el 0,7% del total de células mononucleadas en esplenocitos humanos (McIlroy et al., 2001; Gualdrón-López et al., 2021).

En la revisión realizada por Baldwin et al., se describen los marcadores que caracterizan a cada una de las subpoblaciones de DCs. Las pDCs podrían caracterizarse con los siguientes receptores de superficie: MHC-II, CD45RA/B220, Ly6C/GR-1 y Siglec-H. Las cDC1 podrían seleccionarse como CD8α<sup>+</sup> y CD103<sup>+</sup>. En cambio, cDC2 serían positivas a la expresión de CD11b y CD172/SIRPα (Baldwin et al., 2004).

En los esplenocitos de bazo infectados con *Leishmania*, el porcentaje de células de tipo cDC1 disminuyó con respecto al bazo no infectado. Sin embargo, a partir de la semana 8 de infección, la subpoblación identificada como cDC2 aumentó significativamente. Las células pDCs no sufrieron ninguna variación con respecto al bazo de ratones no infectados. La

## 5. DISCUSIÓN

disminución de la frecuencia de las cDC1 puede ser debido a que estas células son las principales encargadas de la presentación cruzada antigénica (Albert et al., 1998; Sancho et al., 2008, 2009; Cancel et al., 2019) y, como se ha visto en numerosos estudios, *Leishmania* es capaz de manipular este proceso (Antoine et al., 2004; Ghosh & Bandyopadhyay, 2004; Martínez-López et al., 2018; Khouili et al., 2020). De esta manera, al reducir el número de cDC1, podrían estar disminuyendo indirectamente la tasa de funcionamiento de la presentación antigénica, pudiendo suponer un mecanismo de evasión del sistema inmune por parte de *Leishmania*.

Las subpoblaciones de DCs son diferencialmente permisivas frente a *Leishmania*. Nuestros experimentos mostraron que las células cDC1 estaban altamente infectadas en las primeras semanas, pero a partir de la semana 16 de infección, la tasa de infección disminuyó significativamente. En el caso de las cDC2, la infección se mantuvo constante, excepto en la semana 8 de infección, que se elevó ligeramente. Las pDCs, sin embargo, no sufrieron variaciones en el porcentaje de infección. En otros trabajos se ha demostrado que las DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> son menos permisivas a los amastigotes de *L. major* en comparación con las DCs CD8 $\alpha$  (Henri et al., 2002; Baldwin et al., 2004; Akbari et al., 2014). Feijó y col. cuantificaron las cargas parasitarias en células de ganglios linfáticos y en poblaciones de DCs aisladas de ganglios linfáticos de drenaje de ratones infectados con *L. major*. Se encontraron hasta cinco poblaciones diferentes de DCs después de la infección, incluyendo las pDCs y cDCs. Aunque las cargas parasitarias parecían ser similares para todas las poblaciones, las pDC continuaron albergando parásitos a lo largo del tiempo. Eran la única población de DCs que contenía parásitos en los ratones C57BL/6J en la semana 9 de infección, en un momento en que las lesiones habían comenzado a curarse. Tanto las pDC como las cDC podían infectarse *in vitro*, pero las cDC eran más susceptibles a la infección que las pDC (Feijó et al., 2016).

## **6. CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

- I. Tras establecer condiciones de necroptosis, apoptosis intrínseca y apoptosis extrínseca en macrófagos murinos mediante el uso de inhibidores de proteínas antiapoptóticas, se observó:
  - a. Que la infección con *L. infantum* 2713 retrasó el proceso de muerte celular de macrófagos murinos inducidos a la ICD por necroptosis, apoptosis intrínseca o apoptosis extrínseca mediante inhibidores de proteínas antiapoptóticas.
  - b. Que el empleo de esplenocitos de ratones C57BL/6 estimulados con macrófagos inducidos a la ICD, redujo la viabilidad de amastigotes intracelulares procedentes de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. donovani* LV9 iRFP.
- II. La exposición de células RAW 264.7 a radiación UV generó un incremento porcentual de la apoptosis proporcional a la cantidad de energía empleada.
  - a. La radiación UV en células RAW 264.7 infectadas con *L. infantum* 2713 mCh-HASPB:OVA, que presenta OVA en la cara externa de su membrana plasmática, disminuye la expresión de la proteína mCherry fluorescente.
- III. El empleo de RAW 264.7 infectadas con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA y tratadas con radiación UV como cargo de las APC no generó activación de las células B3Z.
- IV. Células RAW 264.7 a las que se indujo ICD, junto con un lisado de amastigotes de *L. infantum* 2713 HASPB:OVA, fueron capaces de promover un proceso de presentación cruzada antigénica en cDC1 que promovió la proliferación de células OT-I.
- V. La infección de ratones BALB/c con *L. infantum* 2713 HASPB:OVA modificó las proporciones de las distintas subpoblaciones de DCs esplénicas.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

### A

- Abadías-Granado, I., Diago, A., Cerro, P. A., Palma-Ruiz, A. M., & Gilaberte, Y. (2021). Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 112(7), 601–618. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.02.008>
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., & Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome. *Molecular Cell*, 9(2), 423–432. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00442-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00442-2)
- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampé, R., & Cresswell, P. (2005). Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nature Immunology*, 6(1), 107–113. <https://doi.org/10.1038/ni1147>
- Aebischer, A., & Mrva, M. (2016). *Leishmania*. In *Molecular Parasitology* (pp. 195–216). Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1416-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1416-2_7)
- Afonina, I. S., Müller, C., Martin, S. J., & Beyaert, R. (2015). Proteolytic processing of interleukin-1 family cytokines: variations on a common theme. *Immunity*, 42(6), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.003>
- Aga, E., Katschinski, D. M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Müller, K., Solbach, W., & Laskay, T. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, 169(2), 898–905. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.898>
- Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 745–756. <https://doi.org/10.1038/nri1184>
- Aglietti, R. A., Estevez, A., Gupta, A., Ramirez, M. G., Liu, P. S., Kayagaki, N., Ciferri, C., Dixit, V. M., & Dueber, E. C. (2016). GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(28), 7858–7863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607769113>
- Akarid, K., Arnoult, D., Micic-Polianski, J., Sif, J., Estaquier, J., & Ameisen, J. C. (2004). *Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(1), 95–103. <https://doi.org/10.1189/jlb.1001877>
- Akbari, M., Honma, K., Kimura, D., Miyakoda, M., Kimura, K., Matsuyama, T., & Yui, K. (2014). IRF4 in dendritic cells inhibits il-12 production and controls Th1 immune responses against *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, 192(5), 2271–2279. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301914>
- Alberdi, P., Espinosa, P., Cabezas-Cruz, A., & de la Fuente, J. (2016). *Anaplasma phagocytophilum* manipulates host cell apoptosis by different mechanisms to establish infection. *Veterinary Sciences*, 3(3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/vetsci3030015>
- Albert, M. L., Pearce, S. F. A., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., & Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via  $\alpha\text{v}\beta 5$  and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T Lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 188(7), 1359–1368. <https://doi.org/10.1084/jem.188.7.1359>
- Alexander, J., Carter, K. C., Al-Fasi, N., Satoskar, A., & Brombacher, F. (2000). Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, 30(10), 2935–2943. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200010\)30:10<2935::AID-IMMU2935>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200010)30:10<2935::AID-IMMU2935>3.0.CO;2-Q)
- Alturki, N. A., McComb, S., Ariana, A., Rijal, D., Korneluk, R. G., Sun, S.-C., Alnemri, E., & Sad, S. (2018). Triad3a induces the degradation of early necrosome to limit RipK1-dependent cytokine production and necroptosis. *Cell Death & Disease*, 9(592), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0672-0>
- Alloatti, A., Kotsias, F., Hoffmann, E., & Amigorena, S. (2016). Evaluation of cross-presentation in bone marrow-derived dendritic cells *in vitro* and splenic dendritic cells *ex vivo* using antigen-coated beads. *BIO-PROTOCOL*, 6(22), 1–17. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2015>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alloatti, A., Kotsias, F., Pauwels, A.-M., Carpier, J.-M., Jouve, M., Timmerman, E., Pace, L., Vargas, P., Maurin, M., Gehrmann, U., Joannas, L., Vivar, O. I., Lennon-Duménil, A.-M., Savina, A., Gevaert, K., Beyaert, R., Hoffmann, E., & Amigorena, S. (2015). Toll-like receptor 4 engagement on dendritic cells restrains phago-lysosome fusion and promotes cross-presentation of antigens. *Immunity*, 43(6), 1087–1100. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.006>
- Anderson, C. F., Mendez, S., & Sacks, D. L. (2005). Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *The Journal of Immunology*, 174(5), 2934–2941. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2934>
- Angiolella, L., Carradori, S., Maccallini, C., Giusiano, G., & Supuran, C. T. (2017). Targeting *Malassezia* species for novel synthetic and natural antidandruff agents. *Current Medicinal Chemistry*, 24(22), 2392–2412. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170404110631>
- Annibaldi, A., & Meier, P. (2018). Checkpoints in TNF-induced cell death: implications in inflammation and cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 24(1), 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.11.002>
- Antoine, J.-C., Prina, E., Courret, N., & Lang, T. (2004). *Leishmania* spp.: on the Interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. In *Advances in Parasitology* (Vol. 58, pp. 1–68). [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)58001-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)58001-6)
- Arango Duque, G., & Descoteaux, A. (2015). *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Current Opinion in Microbiology*, 26, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.007>
- Ardouin, L., Luche, H., Chelbi, R., Carpentier, S., Shawket, A., Montanana Sanchis, F., Santa Maria, C., Grenot, P., Alexandre, Y., Grégoire, C., Fries, A., Vu Manh, T.-P., Tamoutounour, S., Crozat, K., Tomasello, E., Jorquera, A., Fossum, E., Bogen, B., Azukizawa, H., ... Malissen, B. (2016). Broad and largely concordant molecular changes characterize tolerogenic and immunogenic dendritic cell maturation in thymus and periphery. *Immunity*, 45(2), 305–318. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.019>
- Argueta-Donohué, J., Wilkins-Rodríguez, A. A., Aguirre-García, M., & Gutiérrez-Kobeh, L. (2016). Differential phagocytosis of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes by monocyte-derived dendritic cells. *Microbiology and Immunology*, 60(6), 369–381. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12325>
- Arnt, C. R., Chiorean, M. V., Heldebrant, M. P., Gores, G. J., & Kaufmann, S. H. (2002). Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 *in situ*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44236–44243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207578200>
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., Carvalho, E., Ephros, M., Jeronimo, S., & Magill, A. (2017). Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), 24–45. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-84256>
- Arora, P., & Porcelli, S. A. (2016). An efficient and high yield method for isolation of mouse dendritic cell subsets. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(110). <https://doi.org/10.3791/53824>
- Ashok, D., & Acha-Orbea, H. (2014). Timing is everything: dendritic cell subsets in murine *Leishmania* infection. *Trends in Parasitology*, 30(10), 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.08.001>
- Ashok, D., Schuster, S., Ronet, C., Rosa, M., Mack, V., Lavanchy, C., Marraco, S. F., Fasel, N., Murphy, K. M., Tacchini-Cottier, F., & Acha-Orbea, H. (2014). Cross-presenting dendritic cells are required for control of *Leishmania major* infection. *European Journal of Immunology*, 44(5), 1422–1432. <https://doi.org/10.1002/eji.201344242>
- Ashour, D. S. (2015). Toll-like receptor signaling in parasitic infections. *Expert Review of Clinical Immunology*, 11(6), 771–780. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2015.1037286>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Atale, N., Gupta, S., Yadav, U. C. S., & Rani, V. (2014). Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of Microscopy*, 255(1), 7–19. <https://doi.org/10.1111/jmi.12133>
- ATCC. (2022, December 19). RAW 264.7. <https://www.atcc.org/products/tib-71>
- Ato, M., Maroof, A., Zubairi, S., Nakano, H., Kakiuchi, T., & Kaye, P. M. (2006). Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice deficient in CCL19 and CCL21. *The Journal of Immunology*, 176(9), 5486–5493. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5486>

## B

- Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H. W., Henn, V., Kloetzel, P.-M., Gurka, S., & Kroczeck, R. A. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 207(6), 1273–1281. <https://doi.org/10.1084/jem.20100348>
- Bagaev, A. V., Garaeva, A. Y., Lebedeva, E. S., Pichugin, A. V., Ataulakhanov, R. I., & Ataulakhanov, F. I. (2019). Elevated pre-activation basal level of nuclear NF-κB in native macrophages accelerates LPS-induced translocation of cytosolic NF-κB into the cell nucleus. *Scientific Reports*, 9(4563), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36052-5>
- Bagirova, M., Allahverdiyev, A. M., Abamor, E. S., Ullah, I., Cosar, G., Aydogdu, M., Senturk, H., & Ergenoglu, B. (2016). Overview of dendritic cell-based vaccine development for leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 38(11), 651–662. <https://doi.org/10.1111/pim.12360>
- Bajénoff, M., Breart, B., Huang, A. Y. C., Qi, H., Cazareth, J., Braud, V. M., Germain, R. N., & Gleichhaus, N. (2006). Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *Journal of Experimental Medicine*, 203(3), 619–631. <https://doi.org/10.1084/jem.20051474>
- Balan, S., Saxena, M., & Bhardwaj, N. (2019). Dendritic cell subsets and locations. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 348, pp. 1–68). <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.07.004>
- Balaña-Fouce, R., Calvo-Álvarez, E., Álvarez-Velilla, R., Prada, C. F., Pérez-Pertejo, Y., & Reguera, R. M. (2012). Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 181(2), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.10.007>
- Baldwin, T., Henri, S., Curtis, J., O'Keeffe, M., Vremec, D., Shortman, K., & Handman, E. (2004). Dendritic cell populations in *Leishmania major* - infected skin and draining lymph nodes. *Infection and Immunity*, 72(4), 1991–2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.1991-2001.2004>
- Baliga, B. S., Pronczuk, A. W., & Munro, H. N. (1969). Mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell-free system prepared from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4480–4489. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)94343-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)94343-7)
- Ballet, R., Emre, Y., Jemelin, S., Charmoy, M., Tacchini-Cottier, F., & Imhof, B. A. (2014). Blocking junctional adhesion molecule C enhances dendritic cell migration and boosts the immune responses against *Leishmania major*. *PLoS Pathogens*, 10(12), e1004550. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004550>
- Baptista, C., Miranda, L. de F. C., Madeira, M. de F., Leon, L. L. P., Conceição-Silva, F., & Schubach, A. de O. (2015). *In vitro* sensitivity of paired *Leishmania (Viannia) braziliensis* samples isolated before meglumine antimoniate treatment and after treatment failure or reactivation of cutaneous leishmaniasis. *Disease Markers*, 2015, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/943236>
- Barbosa, L. A., Fiuzza, P. P., Borges, L. J., Rolim, F. A., Andrade, M. B., Luz, N. F., Quintela-Carvalho, G., Lima, J. B., Almeida, R. P., Chan, F. K., Bozza, M. T., Borges, V. M., & Prates, D. B. (2018). RIPK1–RIPK3–MLKL-associated necroptosis drives *Leishmania infantum* killing in neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01818>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Barton, G. M., & Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, *300*(5625), 1524–1525. <https://doi.org/10.1126/science.1085536>
- Basha, G., Omilusik, K., Chavez-Steenbock, A., Reinicke, A. T., Lack, N., Choi, K. B., & Jefferies, W. A. (2012). A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. *Nature Immunology*, *13*(3), 237–245. <https://doi.org/10.1038/ni.2225>
- Basile, G., & Peticca, M. (2009). Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Molecular Biotechnology*, *43*(3), 273–278. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9213-5>
- Bastidas, R. J., Elwell, C. A., Engel, J. N., & Valdivia, R. H. (2013). Chlamydial intracellular survival strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *3*(5), a010256–a010256. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010256>
- Basu Ball, W., Kar, S., Mukherjee, M., Chande, A. G., Mukhopadhyaya, R., & Das, P. K. (2011). Uncoupling Protein 2 negatively regulates mitochondrial reactive oxygen species generation and induces phosphatase-mediated anti-inflammatory response in experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, *187*(3), 1322–1332. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004237>
- Bauer, J., Dress, R. J., Schulze, A., Dresing, P., Ali, S., Deenen, R., Alferink, J., & Scheu, S. (2016). Cutting edge: IFN- $\beta$  Expression in the spleen is restricted to a subpopulation of plasmacytoid dendritic cells exhibiting a specific immune modulatory transcriptome signature. *The Journal of Immunology*, *196*(11), 4447–4451. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500383>
- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B. G., Fitzgerald, K. A., Hornung, V., & Latz, E. (2009). Cutting edge: NF- $\kappa$ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *The Journal of Immunology*, *183*(2), 787–791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>
- Beattie, L., & Kaye, P. M. (2011). *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us? *Cellular Microbiology*, *13*(11), 1659–1667. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01658.x>
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L. G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A. P., Cabrera, N., González, A., Maldonado, C., & Isibasi, A. (2003). *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through Toll-like receptor-2. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *130*(2), 65–74. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00160-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00160-9)
- Bechelli, J. R., Rydkina, E., Colonne, P. M., & Sahni, S. K. (2009). *Rickettsia rickettsii* infection protects human microvascular endothelial cells against staurosporine-induced apoptosis by a cIAP2-independent mechanism. *The Journal of Infectious Diseases*, *199*(9), 1389–1398. <https://doi.org/10.1086/597805>
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., & Sacks, D. L. (2002a). CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, *420*(6915), 502–507. <https://doi.org/10.1038/nature01152>
- Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M. C., & Sacks, D. (2002b). CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, *168*(8), 3992–4000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.3992>
- Belz, G. T., Behrens, G. M. N., Smith, C. M., Miller, J. F. A. P., Jones, C., Lejon, K., Fathman, C. G., Mueller, S. N., Shortman, K., Carbone, F. R., & Heath, W. R. (2002). The CD8 $\alpha$ + dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *Journal of Experimental Medicine*, *196*(8), 1099–1104. <https://doi.org/10.1084/jem.20020861>
- Bennis, I., Thys, S., Filali, H., De Brouwere, V., Sahibi, H., & Boelaert, M. (2017). Psychosocial impact of scars due to cutaneous leishmaniasis on high school students in Errachidia province, Morocco. *Infectious Diseases of Poverty*, *6*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0267-5>
- Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J., & Denkers, E. Y. (2003). Cross-Talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *The Journal of Immunology*, *171*(11), 6052–6058. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6052>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Ben-Sasson, S. Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C. A., & Paul, W. E. (2009). IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(17), 7119–7124. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902745106>
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(2), 99–109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>
- Bern, C., Hightower, A. W., Chowdhury, R., Ali, M., Amann, J., Wagatsuma, Y., Haque, R., Kurkjian, K., Vaz, L. E., Begum, M., Akter, T., Cetre-Sossah, C. B., Ahluwalia, I. B., Dotson, E., Secor, W. E., Breiman, R. F., & Maguire, J. H. (2005). Risk factors for Kala-azar in Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases*, *11*(5), 655–662. <https://doi.org/10.3201/eid1105.040718>
- Bern, C., Maguire, J. H., & Alvar, J. (2008). Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *2*(10), e313. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000313>
- Bertholet, S., Debrabant, A., Afrin, F., Caler, E., Mendez, S., Tabbara, K. S., Belkaid, Y., & Sacks, D. L. (2005). Antigen requirements for efficient priming of CD8<sup>+</sup> T Cells by *Leishmania major*-infected dendritic cells. *Infection and Immunity*, *73*(10), 6620–6628. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6620-6628.2005>
- Bertholet, S., Goldszmid, R., Morrot, A., Debrabant, A., Afrin, F., Collazo-Custodio, C., Houde, M., Desjardins, M., Sher, A., & Sacks, D. (2006). *Leishmania* antigens are presented to CD8<sup>+</sup> T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Immunology*, *177*(6), 3525–3533. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3525>
- Bhattacharya, P., Bhattacharjee, S., Gupta, G., Majumder, S., Adhikari, A., Mukherjee, A., Majumdar, S. B., Saha, B., & Majumdar, S. (2010). Arabinosylated lipoarabinomannan-mediated protection in visceral leishmaniasis through up-regulation of toll-like receptor 2 signaling: an immunoprophylactic approach. *The Journal of Infectious Diseases*, *202*(1), 145–155. <https://doi.org/10.1086/653210>
- Bhor, R., Rafati, S., & Pai, K. (2021). Cytokine saga in visceral leishmaniasis. *Cytokine*, *147*(155322), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155322>
- Bjorkman, P. J. (1997). MHC restriction in three dimensions: a view of t cell receptor/ligand interactions. *Cell*, *89*(2), 167–170. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80195-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80195-6)
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., & Wiley, D. C. (1987a). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, *329*(6139), 506–512. <https://doi.org/10.1038/329506a0>
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., & Wiley, D. C. (1987b). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, *329*(6139), 512–518. <https://doi.org/10.1038/329512a0>
- Blander, J. M. (2018). Regulation of the cell biology of antigen cross-presentation. *Annual Review of Immunology*, *36*(1), 717–753. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055523>
- Blander, J. M., & Medzhitov, R. (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*, *440*(7085), 808–812. <https://doi.org/10.1038/nature04596>
- Blasius, A. L., & Beutler, B. (2010). Intracellular Toll-like receptors. *Immunity*, *32*(3), 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.012>
- Blasius, A. L., Cella, M., Maldonado, J., Takai, T., & Colonna, M. (2006). Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood*, *107*(6), 2474–2476. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3746>
- Blum, J. S., Wearsch, P. A., & Cresswell, P. (2013). Pathways of antigen processing. *Annual Review of Immunology*, *31*(1), 443–473. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095910>
- Bogdan, C., Moll, H., Solbach, W., & Röllinghoff, M. (1990). Tumor necrosis factor- $\alpha$  in combination with interferon- $\gamma$ , but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania*

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- major amastigotes. *European Journal of Immunology*, 20(5), 1131–1135. <https://doi.org/10.1002/eji.1830200528>
- Boise, L. H., & Collins, C. M. (2001). *Salmonella*-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death? *Trends in Microbiology*, 9(2), 64–67. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01937-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01937-5)
- Bossaller, L., Chiang, P.-I., Schmidt-Lauber, C., Ganesan, S., Kaiser, W. J., Rathinam, V. A. K., Mocarski, E. S., Subramanian, D., Green, D. R., Silverman, N., Fitzgerald, K. A., Marshak-Rothstein, A., & Latz, E. (2012). Cutting edge: FAS (CD95) mediates noncanonical IL-1 $\beta$  and IL-18 maturation via caspase-8 in an RIP3-independent manner. *The Journal of Immunology*, 189(12), 5508–5512. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202121>
- Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J.-L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J., & Schneider, P. (2006). Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 13964–13971. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601553200>
- Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J. L., & Maliszewski, C. R. (2000). Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood*, 96(9), 3029–3039. [https://doi.org/10.1182/blood.V96.9.3029.h8003029\\_3029\\_3039](https://doi.org/10.1182/blood.V96.9.3029.h8003029_3029_3039)
- Brehm, M. A., Daniels, K. A., & Welsh, R. M. (2005). Rapid production of TNF- $\alpha$  following TCR engagement of naive CD8 T cells. *The Journal of Immunology*, 175(8), 5043–5049. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5043>
- Breitling, R., Klingner, S., Callewaert, N., Pietrucha, R., Geyer, A., Ehrlich, G., Hartung, R., Müller, A., Contreras, R., Beverley, S. M., & Alexandrov, K. (2002). Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expression and Purification*, 25(2), 209–218. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00001-3](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00001-3)
- Brenner, D., & Mak, T. W. (2009). Mitochondrial cell death effectors. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.004>
- Breton, M., Tremblay, M. J., Ouellette, M., & Papadopoulou, B. (2005). Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 73(10), 6372–6382. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6372-6382.2005>
- Bronte, V., & Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), 641–654. <https://doi.org/10.1038/nri1668>
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signaling. *Nature Reviews Immunology*, 16(7), 407–420. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., & Kagan, J. C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 257–290. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
- Burgdorf, S., & Kurts, C. (2008). Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*, 20(1), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.12.002>
- Burgdorf, S., Kautz, A., Böhnert, V., Knolle, P. A., & Kurts, C. (2007). distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science*, 316(5824), 612–616. <https://doi.org/10.1126/science.1137971>
- Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., & Kurts, C. (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *The Journal of Immunology*, 176(11), 6770–6776. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6770>
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Cain, K., Bratton, S. B., & Cohen, G. M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, *84*(2–3), 203–214. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01376-7](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01376-7)
- Campbell, K. A., Ovendale, P. J., Kennedy, M. K., Fanslow, W. C., Reed, S. G., & Maliszewski, C. R. (1996). CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity*, *4*(3), 283–289. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80436-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80436-7)
- Campisi, L. (2017). *In vitro* antigen-presentation assay for self- and microbial-derived antigens. *BIO-PROTOCOL*, *7*(11), 1–11. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2307>
- Cancel, J.-C., Crozat, K., Dalod, M., & Mattiuz, R. (2019). Are conventional type 1 dendritic cells critical for protective antitumor immunity and how? *Frontiers in Immunology*, *10*(9), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00009>
- Caramelo, J. J., Castro, O. A., de Prat-Gay, G., & Parodi, A. J. (2004). The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(44), 46280–46285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408404200>
- Carneiro, G., Santos, D. C. M., Oliveira, M. C., Fernandes, A. P., Ferreira, L. S., Ramaldes, G. A., Nunan, E. A., & Ferreira, L. A. M. (2010). Topical delivery and *in vivo* antileishmanial activity of paromomycin-loaded liposomes for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Liposome Research*, *20*(1), 16–23. <https://doi.org/10.3109/08982100903015025>
- Caserta, T. M., Smith, A. N., Gultice, A. D., Reedy, M. A., & Brown, T. L. (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis*, *8*(4), 345–352. <https://doi.org/10.1023/A:1024116916932>
- Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. *Frontiers in Immunology*, *9*(847), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>
- Catanzaro, E., Feron, O., Skirtach, A. G., & Krysko, D. V. (2022). Immunogenic cell death and role of nanomaterials serving as therapeutic vaccine for personalized cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, *13*(925290), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.925290>
- Cebrian, I., Visentin, G., Blanchard, N., Jouve, M., Bobard, A., Moita, C., Enninga, J., Moita, L. F., Amigorena, S., & Savina, A. (2011). Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell*, *147*(6), 1355–1368. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.021>
- Centers for Disease Control. (2020, February 18). *CDC. Epidemiology and risk factors*. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>
- Cincurá, C., De Lima, C. M. F., Machado, P. R. L., Oliveira-Filho, J., Glesby, M. J., Lessa, M. M., & Carvalho, E. M. (2017). Mucosal leishmaniasis: A retrospective study of 327 cases from an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *97*(3), 761–766. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0349>
- Cirone, M., Di Renzo, L., Lotti, L. V., Conte, V., Trivedi, P., Santarelli, R., Gonnella, R., Frati, L., & Faggioni, A. (2012). Activation of dendritic cells by tumor cell death. *Oncology*, *1*(7), 1218–1219. <https://doi.org/10.4161/onci.20428>
- Clarke, S. R., Barden, M., Kurts, C., Carbone, F. R., Miller, J. F., & Heath, W. R. (2000). Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunology and Cell Biology*, *78*(2), 110–117. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2000.00889.x>
- Clifton, D. R., Goss, R. A., Sahni, S. K., van Antwerp, D., Baggs, R. B., Marder, V. J., Silverman, D. J., & Sporn, L. A. (1998). NF- $\kappa$ B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(8), 4646–4651. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4646>
- Colotti, G., & Ilari, A. (2011). Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Amino Acids*, *40*(2), 269–285. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0630-3>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Collin, M., & Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, *154*(1), 3–20. <https://doi.org/10.1111/imm.12888>
- Cookson, B. T., & Brennan, M. A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in Microbiology*, *9*(3), 113–114. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01936-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01936-3)
- Cooley, J. C., Javkhlan, N., Wilson, J. A., Foster, D. G., Edelman, B. L., Ortiz, L. A., Schwartz, D. A., Riches, D. W. H., & Redente, E. F. (2023). Inhibition of antiapoptotic BCL-2 proteins with ABT-263 induces fibroblast apoptosis, reversing persistent pulmonary fibrosis. *JCI Insight*, *8*(3), 1–19. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.163762>
- Cory, S., Roberts, A. W., Colman, P. M., & Adams, J. M. (2016). Targeting BCL-2-like proteins to kill cancer cells. *Trends in Cancer*, *2*(8), 443–460. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.07.001>
- Costa-Da-silva, A. C., Nascimento, D. de O., Ferreira, J. R. M., Guimarães-Pinto, K., Freire-De-lima, L., Morrot, A., Decote-Ricardo, D., Filardy, A. A., & Freire-De-lima, C. G. (2022). Immune responses in leishmaniasis: An overview. In *Tropical Medicine and Infectious Disease* (Vol. 7, Issue 54, pp. 1–16). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>
- Cotter, K., Stransky, L., McGuire, C., & Forgac, M. (2015). Recent insights into the structure, regulation, and function of the V-ATPases. *Trends in Biochemical Sciences*, *40*(10), 611–622. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.08.005>
- Courret, N., Fréhel, C., Gouhier, N., Pouchelet, M., Prina, E., Roux, P., & Antoine, J.-C. (2002). Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *Journal of Cell Science*, *115*(11), 2303–2316. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.11.2303>
- Coutinho De Oliveira, B., Duthie, M. S., & Alves Pereira, V. R. (2020). Vaccines for leishmaniasis and the implications of their development for American tegumentary leishmaniasis. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *16*(4), 919–930. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1678998>
- Croft, S. L., Neal, R. A., Pendergast, W., & Chan, J. H. (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology*, *36*(16), 2633–2636. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90543-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90543-0)
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(11), pdb.prot087288. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Vu Manh, T.-P., Baranek, T., Storset, A. K., Marvel, J., Boudinot, P., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., & Dalod, M. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(6), 1283–1292. <https://doi.org/10.1084/jem.20100223>
- Cui, Z. (2005). DNA vaccine. In *Advances in Genetics* (Vol. 54, pp. 257–289). [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(05\)54011-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(05)54011-2)
- Cunningham, M. A., Wirth, J. R., Scott, J. L., Eudaly, J., Collins, E. L., & Gilkeson, G. S. (2016). Early ovariectomy results in reduced numbers of CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> spleen cells and impacts disease expression in murine lupus. *Frontiers in Immunology*, *7*(31), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00031>

## CH

---

- Chan, L., Morovati, S., Karimi, N., Alizadeh, K., Vanderkamp, S., Kakish, J. E., Bridle, B. W., & Karimi, K. (2022). Neutrophil functional heterogeneity and implications for viral infections and treatments. In *Cells* (Vol. 11, Issue 1322, pp. 1–29). <https://doi.org/10.3390/cells11081322>
- Chandra, D., & Naik, S. (2008). *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clinical and Experimental Immunology*, *154*(2), 224–234. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03741.x>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Chang, K. P., Reynolds, J. M., Liu, Y., & He, J. J. (2022). Leishmaniac quest for developing a novel vaccine platform. Is a roadmap for its advances provided by the mad dash to produce vaccines for COVID-19? In *Vaccines* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/vaccines10020248>
- Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A. E. I., & Tacchini-Cottier, F. (2010). Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathogens*, 6(2), e1000755. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000755>
- Charmoy, M., Hurrell, B. P., Romano, A., Lee, S. H., Ribeiro-Gomes, F., Riteau, N., Mayer-Barber, K., Tacchini-Cottier, F., & Sacks, D. L. (2016). The Nlrp3 inflammasome, IL-1 $\beta$ , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *European Journal of Immunology*, 46(4), 897–911. <https://doi.org/10.1002/eji.201546015>
- Charmoy, M., Megnekou, R., Allenbach, C., Zweifel, C., Perez, C., Monnat, K., Breton, M., Ronet, C., Launois, P., & Tacchini-Cottier, F. (2007). *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(2), 288–299. <https://doi.org/10.1189/jlb.0706440>
- Chauhan, D., Bartok, E., Gaidt, M. M., Bock, F. J., Herrmann, J., Seeger, J. M., Broz, P., Beckmann, R., Kashkar, H., Tait, S. W. G., Müller, R., & Hornung, V. (2018). BAX/BAK-induced apoptosis results in caspase-8-dependent IL-1 $\beta$  maturation in macrophages. *Cell Reports*, 25(9), 2354–2368. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.087>
- Chauhan, P., Shukla, D., Chattopadhyay, D., & Saha, B. (2017). Redundant and regulatory roles for Toll-like receptors in *Leishmania* infection. *Clinical and Experimental Immunology*, 190(2), 167–186. <https://doi.org/10.1111/cei.13014>
- Cheekatla, S. S., Aggarwal, A., & Naik, S. (2012). mTOR signaling pathway regulates the IL-12/IL-10 axis in *Leishmania donovani* infection. *Medical Microbiology and Immunology*, 201(1), 37–46. <https://doi.org/10.1007/s00430-011-0202-5>
- Chen, C., Edelstein, L. C., & Gélinas, C. (2000). The Rel/NF- $\kappa$ B family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-L. *Molecular and Cellular Biology*, 20(8), 2687–2695. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.8.2687-2695.2000>
- Chen, K. W., Demarco, B., Heilig, R., Shkarina, K., Boettcher, A., Farady, C. J., Pelczar, P., & Broz, P. (2019). Extrinsic and intrinsic apoptosis activate pannexin-1 to drive NLRP 3 inflammasome assembly. *The EMBO Journal*, 38(10), e101638. <https://doi.org/10.15252/embj.2019101638>
- Chen, K.-F., Lin, J.-P., Shiau, C.-W., Tai, W.-T., Liu, C.-Y., Yu, H.-C., Chen, P.-J., & Cheng, A.-L. (2012). Inhibition of Bcl-2 improves effect of LCL161, a SMAC mimetic, in hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 84(3), 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.04.023>
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 13(4), 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Chen, X., He, W., Hu, L., Li, J., Fang, Y., Wang, X., Xu, X., Wang, Z., Huang, K., & Han, J. (2016). Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell Research*, 26(9), 1007–1020. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.100>
- Chen, Y.-L., Chen, T.-T., Pai, L.-M., Wesoly, J., Bluysen, H. A. R., & Lee, C.-K. (2013). A type I IFN–Flt3 ligand axis augments plasmacytoid dendritic cell development from common lymphoid progenitors. *Journal of Experimental Medicine*, 210(12), 2515–2522. <https://doi.org/10.1084/jem.20130536>
- Cho, S.-H., Chung, K.-S., Choi, J.-H., Kim, D.-H., & Lee, K.-T. (2009a). Compound K, a metabolite of ginseng saponin, induces apoptosis via caspase-8-dependent pathway in HL-60 human leukemia cells. *BMC Cancer*, 9(1), 449. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-449>
- Cho, Y., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M., & Chan, F. K.-M. (2009b). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 137(6), 1112–1123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.037>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Choi, H. W., Suwanpradid, J., Kim, I. H., Staats, H. F., Haniffa, M., MacLeod, A. S., & Abraham, S. N. (2018). Perivascular dendritic cells elicit anaphylaxis by relaying allergens to mast cells via microvesicles. *Science*, 362(6415), eaao0666. <https://doi.org/10.1126/science.aao0666>

Christofferson, D. E., Li, Y., & Yuan, J. (2014). Control of life-or-death decisions by RIP1 kinase. *Annual Review of Physiology*, 76(1), 129–150. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170259>

### D

D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>

D'Souza, C. A., & Heitman, J. (2001). Dismantling the *Cryptococcus* coat. *Trends in Microbiology*, 9(3), 112–113. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01945-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01945-4)

Daher, E. F., Lima, L. L. L., Vieira, A. P. F., Nascimento, L. S., Soares, D. S., Abreu, K. L. S., Zuntini, K. L. C. R., & Silva Junior, G. B. (2015). Hemophagocytic syndrome in children with visceral leishmaniasis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(12), 1311–1314. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000916>

Dalboni, L. C., Alvares Saraiva, A. M., Konno, F. T. de C., Perez, E. C., Codeceira, J. F., Spadacci-Morena, D. D., & Lallo, M. A. (2021). *Encephalitozoon cuniculi* takes advantage of efferocytosis to evade the immune response. *PLOS ONE*, 16(3), e0247658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247658>

Daneshvar, H., Coombs, G. H., Hagan, P., & Phillips, R. S. (2003). *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*: Attenuation of wild-type parasites and vaccination with the attenuated lines. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(10), 1662–1668. <https://doi.org/10.1086/374783>

Das, N. (2020). Post Kala-azar dermal leishmaniasis. *Indian Journal of Dermatology*, 65(6), 450–451. [https://doi.org/10.4103/ijd.IJD\\_439\\_20](https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_439_20)

Davies, C. R., Llanos-Cuentas, E. A., Pyke, S. D. M., & Dye, C. (1995). Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. *Epidemiology and Infection*, 114(2), 297–318. <https://doi.org/10.1017/S0950268800057964>

De Araujo, A. R. de, Portela, N. C., Feitosa, A. P. S., Silva, O. A. da, Ximenes, R. A. A., Alves, L. C., & Brayner, F. A. (2016). Risk factors associated with american cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 58(86), 1–6. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201658086>

de Menezes, J. P., Saraiva, E. M., & da Rocha-Azevedo, B. (2016). The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasites & Vectors*, 9(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1540-3>

De Muylder, G., Ang, K. K. H., Chen, S., Arkin, M. R., Engel, J. C., & McKerrow, J. H. (2011). A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(7), e1253. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001253>

De Trez, C., Brait, M., Leo, O., Aebischer, T., Torrentera, F. A., Carlier, Y., & Muraille, E. (2004). Myd88-dependent *in vivo* maturation of splenic dendritic cells induced by *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species. *Infection and Immunity*, 72(2), 824–832. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.824-832.2004>

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

Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G. D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S. M., Gerber, S. A., Lugovskoy, A., & Yuan, J. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature Chemical Biology*, 4(5), 313–321. <https://doi.org/10.1038/nchembio.83>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., & Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 1(2), 112–119. <https://doi.org/10.1038/nchembio711>
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., & Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*, 307(5715), 1630–1634. <https://doi.org/10.1126/science.1108003>
- Denny, P. W., Gokool, S., Russell, D. G., Field, M. C., & Smith, D. F. (2000). Acylation-dependent protein export in *Leishmania*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11017–11025. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11017>
- Denton, A. E., Russ, B. E., Doherty, P. C., Rao, S., & Turner, S. J. (2011). Differentiation-dependent functional and epigenetic landscapes for cytokine genes in virus-specific CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15306–15311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112520108>
- Dermine, J.-F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A., & Desjardins, M. (2000). *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cellular Microbiology*, 2(2), 115–126. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00037.x>
- Desjardins, M., & Descoteaux, A. (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine*, 185(12), 2061–2068. <https://doi.org/10.1084/jem.185.12.2061>
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), 305–318. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>
- Dey, R., Dagur, P. K., Selvapandiyani, A., McCoy, J. P., Salotra, P., Duncan, R., & Nakhasi, H. L. (2013). Live attenuated *Leishmania donovani* p27 gene knockout parasites are nonpathogenic and elicit long-term protective immunity in BALB/c mice. *The Journal of Immunology*, 190(5), 2138–2149. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202801>
- Dhuriya, Y. K., & Sharma, D. (2018). Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 199. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1235-0>
- Di Virgilio, F., Sarti, A. C., Falzoni, S., De Marchi, E., & Adinolfi, E. (2018). Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*, 18(10), 601–618. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>
- Díaz-Montero, C. M., El Naggar, S., Al Khami, A., El Naggar, R., Montero, A. J., Cole, D. J., & Salem, M. L. (2008). Priming of naive CD8+ T cells in the presence of IL-12 selectively enhances the survival of CD8+CD62Lhi cells and results in superior anti-tumor activity in a tolerogenic murine model. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57(4), 563–572. <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0394-0>
- Dillon, C. P., Weinlich, R., Rodriguez, D. A., Cripps, J. G., Quarato, G., Gurung, P., Verbist, K. C., Brewer, T. L., Llambi, F., Gong, Y.-N., Janke, L. J., Kelliher, M. A., Kanneganti, T.-D., & Green, D. R. (2014). ripk1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3. *Cell*, 157(5), 1189–1202. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.018>
- Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D.-C., & Shao, F. (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, 535(7610), 111–116. <https://doi.org/10.1038/nature18590>
- Diotallevi, A., De Santi, M., Buffi, G., Ceccarelli, M., Vitale, F., Galluzzi, L., & Magnani, M. (2018). *Leishmania* infection induces microRNA hsa-miR-346 in human cell line-derived macrophages. *Frontiers in Microbiology*, 9(1019), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01019>
- DNDi. (2021a). *Cutaneous leishmaniasis*. Drugs for neglected diseases initiative. <https://dndi.org/diseases/cutaneous-leishmaniasis/>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- DNDi. (2021b). *Visceral leishmaniasis*. Drugs for neglected diseases initiative. <https://dndi.org/diseases/visceral-leishmaniasis/>
- Domínguez-Bernal, G., Horcajo, P., Orden, J. A., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., De La Fuente, R., Ordóñez-Gutiérrez, L., Martínez-Rodrigo, A., Mas, A., & Carrión, J. (2015). HisAK70: Progress towards a vaccine against different forms of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, 8(629), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1246-y>
- Dondelinger, Y., Aguilera, M. A., Goossens, V., Dubuisson, C., Grootjans, S., Dejardin, E., Vandenabeele, P., & Bertrand, M. J. M. (2013). RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition. *Cell Death & Differentiation*, 20(10), 1381–1392. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.94>
- Dong, G., Wearsch, P. A., Peaper, D. R., Cresswell, P., & Reinisch, K. M. (2009). Insights into MHC Class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer. *Immunity*, 30(1), 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.10.018>
- Donovan, M. J., Maciuba, B. Z., Mahan, C. E., & McDowell, M. A. (2009). *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Experimental Parasitology*, 123(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.05.012>
- Dorner, B. G., Dorner, M. B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H. W., Ranke, K., Schaefer, M., Jack, R. S., Henn, V., & Kroczeck, R. A. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity*, 31(5), 823–833. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.027>
- Douglas, J. L., Gustin, J. K., Viswanathan, K., Mansouri, M., Moses, A. V., & Früh, K. (2010). The great escape: Viral strategies to counter BST-2/Tetherin. *PLoS Pathogens*, 6(5), e1000913. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000913>
- Duarte, D. B., Lacerda, M. C. S. R., Ribeiro, Y. J. P., Ribeiro, M. Z. D., Frederico, M. de A., & Oliveira, M. J. C. (2020). Kidney biomarkers in tropical infections: an update. *Pathogens and Global Health*, 114(6), 302–308. <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1799605>
- Dube, A., Gupta, R., & Singh, N. (2009). Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, 25(9), 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.06.006>
- Dudek, A. M., Martin, S., Garg, A. D., & Agostinis, P. (2013). Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: Toward a DC-cancer cells interface that augments anticancer immunity. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 4, Issue 438, pp. 1–14). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00438>
- Dudziak, D., Kamphorst, A. O., Heidkamp, G. F., Buchholz, V. R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.-W., Park, C. G., Steinman, R. M., & Nussenzweig, M. C. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo*. *Science*, 315(5808), 107–111. <https://doi.org/10.1126/science.1136080>
- Dutta, S., Ongarora, B. G., Li, H., Vicente, M. da G. H., Kolli, B. K., & Chang, K. P. (2011). Intracellular targeting specificity of novel phthalocyanines assessed in a host-parasite model for developing potential photodynamic medicine. *PLoS ONE*, 6(6), e20786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020786>
- Dzhagalov, I., St. John, A., & He, Y.-W. (2007). The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood*, 109(4), 1620–1626. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-013771>
- Dzierszinski, F., Pepper, M., Stumhofer, J. S., LaRosa, D. F., Wilson, E. H., Turka, L. A., Halonen, S. K., Hunter, C. A., & Roos, D. S. (2007). Presentation of *Toxoplasma gondii* antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells. *Infection and Immunity*, 75(11), 5200–5209. <https://doi.org/10.1128/IAI.00954-07>

E

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Edelson, B. T. (2012). Dendritic cells in *Listeria monocytogenes* infection. In *Advances in Immunology* (Vol. 113, pp. 33–49). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394590-7.00006-3>
- Edelson, B. T., KC, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L. A., Klekotka, P. A., Moon, C., Albring, J. C., Ise, W., Michael, D. G., Bhattacharya, D., Stappenbeck, T. S., Holtzman, M. J., Sung, S.-S. J., Murphy, T. L., Hildner, K., & Murphy, K. M. (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 $\alpha$ + conventional dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 207(4), 823–836. <https://doi.org/10.1084/jem.20091627>
- Edwards, A. D., Diebold, S. S., Slack, E. M. C., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S., & Sousa, C. R. e. (2003). Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 $\alpha$ + DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *European Journal of Immunology*, 33(4), 827–833. <https://doi.org/10.1002/eji.200323797>
- Ekert, P. G., & Vaux, D. L. (2005). The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 626–630. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.09.001>
- Elmahallawy, E. K., Alkhalidi, A. A. M., & Saleh, A. A. (2021). Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111671. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111671>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- England, H., Summersgill, H. R., Edey, M. E., Rothwell, N. J., & Brough, D. (2014). Release of interleukin-1 $\alpha$  or interleukin-1 $\beta$  depends on mechanism of cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 289(23), 15942–15950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557561>
- 
- F**
- Fages-Lartaud, M., Tietze, L., Elie, F., Lale, R., & Hohmann-Marriott, M. F. (2022). mCherry contains a fluorescent protein isoform that interferes with its reporter function. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.892138>
- Fallarino, F., Asselin-Paturel, C., Vacca, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Fioretti, M. C., Trinchieri, G., Grohmann, U., & Puccetti, P. (2004). Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *The Journal of Immunology*, 173(6), 3748–3754. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3748>
- Fan, T., Lu, H., Hu, H., Shi, L., McClarty, G. A., Nance, D. M., Greenberg, A. H., & Zhong, G. (1998). Inhibition of apoptosis in *Chlamydia*-infected cells: Blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *Journal of Experimental Medicine*, 187(4), 487–496. <https://doi.org/10.1084/jem.187.4.487>
- Fang, H., Ang, B., Xu, X., Huang, X., Wu, Y., Sun, Y., Wang, W., Li, N., Cao, X., & Wan, T. (2014). TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 11(2), 150–159. <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.59>
- Faouzi, S., Burckhardt, B. E., Hanson, J. C., Campe, C. B., Schrum, L. W., Rippe, R. A., & Maher, J. J. (2001). Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF- $\kappa$ B-independent, caspase-3-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 49077–49082. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109791200>
- Faria, M. S., Reis, F. C. G., & Lima, A. P. C. A. (2012). Toll-like receptors in *Leishmania* infections: Guardians or promoters? *Journal of Parasitology Research*, 2012, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/930257>
- Fehres, C. M., Unger, W. W. J., Garcia-Vallejo, J. J., & van Kooyk, Y. (2014). Understanding the biology of antigen cross-presentation for the design of vaccines against cancer. *Frontiers in Immunology*, 5(149), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00149>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Feijó, D., Tibúrcio, R., Ampuero, M., Brodskyn, C., & Tavares, N. (2016). Dendritic cells and *Leishmania* infection: Adding layers of complexity to a complex disease. *Journal of Immunology Research*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/3967436>
- Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D. P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Häcker, G., & Leverkus, M. (2011). cIAPs block ripoptosome formation, a RIP1/Caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Molecular Cell*, 43(3), 449–463. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.011>
- Fernández-Figueroa, E. A., Rangel-Escareño, C., Espinosa-Mateos, V., Carrillo-Sánchez, K., Salaiza-Suazo, N., Carrada-Figueroa, G., March-Mifsut, S., & Becker, I. (2012). Disease Severity in Patients Infected with *Leishmania mexicana* Relates to IL-1 $\beta$ . *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(5), e1533. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001533>
- Ferri, K. F., & Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology*, 3(11), E255–E263. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-e255>
- Figueiredo, A. B., Serafim, T. D., Marques-da-Silva, E. A., Meyer-Fernandes, J. R., & Afonso, L. C. C. (2012). *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A 2B adenosine receptor activation. *European Journal of Immunology*, 42(5), 1203–1215. <https://doi.org/10.1002/eji.201141926>
- Fikre, H., Mohammed, R., Atinafu, S., van Griensven, J., & Diro, E. (2017). Clinical features and treatment response of cutaneous leishmaniasis in North-West Ethiopia. *Tropical Medicine & International Health*, 22(10), 1293–1301. <https://doi.org/10.1111/tmi.12928>
- Filippou, A., Pehkonen, H., Karhemo, P. R., Väänänen, J., Nieminen, A. I., Klefström, J., Grénman, R., Mäkitie, A. A., Joensuu, H., & Monni, O. (2021). Ano1 expression orchestrates p27kip1/mcl1-mediated signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancers*, 13(1170), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cancers13051170>
- Filley, A. C., & Dey, M. (2017). Dendritic cell based vaccination strategy: an evolving paradigm. *Journal of Neuro-Oncology*, 133(2), 223–235. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2446-4>
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73(4), 1907–1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>
- Fiuza, J. A., Santiago, H. da C., Selvapandiyan, A., Gannavaram, S., Ricci, N. D., Bueno, L. L., Bartholomeu, D. C., Correa-Oliveira, R., Nakhasi, H. L., & Fujiwara, R. T. (2013). Induction of immunogenicity by live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites in dogs. *Vaccine*, 31(14), 1785–1792. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.048>
- Flandin, J.-F., Chano, F., & Descoteaux, A. (2006). RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- $\gamma$ -primed macrophages. *European Journal of Immunology*, 36(2), 411–420. <https://doi.org/10.1002/eji.200535079>
- Frézard, F., Demicheli, C., & Ribeiro, R. (2009). Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. *Molecules*, 14(7), 2317–2336. <https://doi.org/10.3390/molecules14072317>
- Frézard, F., Martins, P. S., Barbosa, M. C. M., Pimenta, A. M. C., Ferreira, W. A., de Melo, J. E., Mangrum, J. B., & Demicheli, C. (2008). New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(4), 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.10.010>
- Fu, Y., Wang, T., Xiu, L., Shi, X., Bian, Z., Zhang, Y., Ruhan, A., & Wang, X. (2016). Levamisole promotes murine bone marrow derived dendritic cell activation and drives Th1 immune response *in vitro* and *in vivo*. *International Immunopharmacology*, 31, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.12.015>
- Fucikova, J., Kepp, O., Kasikova, L., Petroni, G., Yamazaki, T., Liu, P., Zhao, L., Spisek, R., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2020). Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death & Disease*, 11(11), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03221-2>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

### G

- Gabriel, Á., Valério-Bolas, A., Palma-Marques, J., Mourata-Gonçalves, P., Ruas, P., Dias-Guerreiro, T., & Santos-Gomes, G. (2019). Cutaneous leishmaniasis: The complexity of host's effective immune response against a polymorphic parasitic disease. *Journal of Immunology Research*, 2019, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2019/2603730>
- Gabriel, C., McMaster, W. R., Girard, D., & Descoteaux, A. (2010). *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Immunology*, 185(7), 4319–4327. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000893>
- Galvão, E. L., Rabello, A., & Cota, G. F. (2017). Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 12(10), e0186117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186117>
- Gallo, P. M., & Gallucci, S. (2013). The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 4(138), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00138>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gao, L.-Y., & Abu Kwaik, Y. (2000). Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. *Microbes and Infection*, 2(14), 1705–1719. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01326-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01326-5)
- Geijtenbeek, T. B. H., van Vliet, S. J., Engering, A., 't Hart, B. A., & van Kooyk, Y. (2004). Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 33–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104558>
- Gentile, M. (2003). Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses. *Nucleic Acids Research*, 31(16), 4779–4790. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg675>
- Gett, A. V., & Hodgkin, P. D. (2000). A cellular calculus for signal integration by T cells. *Nature Immunology*, 1(3), 239–244. <https://doi.org/10.1038/79782>
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., Perfettini, J.-L., Schlemmer, F., Tasdemir, E., Uhl, M., Génin, P., Civas, A., Ryffel, B., Kanellopoulos, J., Tschopp, J., ... Zitvogel, L. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Medicine*, 15(10), 1170–1178. <https://doi.org/10.1038/nm.2028>
- Ghosh, M., & Bandyopadhyay, S. (2004). Interaction of *Leishmania* parasites with dendritic cells and its functional consequences. *Immunobiology*, 209(1–2), 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2004.02.007>
- Giampazolias, E., Zunino, B., Dhayade, S., Bock, F., Cloix, C., Cao, K., Roca, A., Lopez, J., Ichim, G., Proïcs, E., Rubio-Patiño, C., Fort, L., Yatim, N., Woodham, E., Orozco, S., Taraborrelli, L., Peltzer, N., Lecis, D., Machesky, L., ... Tait, S. W. G. (2017). Mitochondrial permeabilization engages NF- $\kappa$ B-dependent anti-tumour activity under caspase deficiency. *Nature Cell Biology*, 19(9), 1116–1129. <https://doi.org/10.1038/ncb3596>
- Gillespie, P. M., Beaumier, C. M., Strych, U., Hayward, T., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*, 34(26), 2992–2995. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.071>
- Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S. A., Stanley, E. R., Nussenzweig, M., & Merad, M. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3115–3130. <https://doi.org/10.1084/jem.20091756>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Giri, J., Srivastav, S., Basu, M., Palit, S., Gupta, P., & Ukil, A. (2016). *Leishmania donovani* exploits Myeloid Cell Leukemia 1 (MCL-1) protein to prevent mitochondria-dependent host cell apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 291(7), 3496–3507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672873>
- Glennie, N. D., Volk, S. W., & Scott, P. (2017). Skin-resident CD4+ T cells protect against *Leishmania major* by recruiting and activating inflammatory monocytes. *PLOS Pathogens*, 13(4), e1006349. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006349>
- Gong, T., Liu, L., Jiang, W., & Zhou, R. (2020). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, 20(2), 95–112. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7>
- Goodall, K. J., Finch-Edmondson, M. L., van Vuuren, J., Yeoh, G. C., Gentle, I. E., Vince, J. E., Ekert, P. G., Vaux, D. L., & Callus, B. A. (2016). Cycloheximide can induce Bax/Bak dependent myeloid cell death independently of multiple BH3-only proteins. *PLOS ONE*, 11(11), e0164003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164003>
- Gorczynski, R. M. (1985). Immunization of susceptible BALB/c mice against *Leishmania braziliensis*. *Cellular Immunology*, 94(1), 11–20. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(85\)90081-4](https://doi.org/10.1016/0008-8749(85)90081-4)
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), 23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>
- Gossage, S. M., Rogers, M. E., & Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, 33(10), 1027–1034. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00142-5)
- Goto, H., & Lindoso, J. A. L. (2004). Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(4), 615–623. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000400020>
- Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., Endo, M. M., Uno, B. E., Wilcock, B. C., & Burke, M. D. (2012). Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(7), 2234–2239. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117280109>
- Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature Reviews Immunology*, 9(5), 353–363. <https://doi.org/10.1038/nri2545>
- Greenfield, J. J., & High, S. (1999). The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. *Journal of Cell Science*, 112(10), 1477–1486. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.10.1477>
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2005). The B7 family revisited. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 515–548. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611>
- Grouard, G., Risoan, M.-C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., & Liu, Y.-J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *Journal of Experimental Medicine*, 185(6), 1101–1112. <https://doi.org/10.1084/jem.185.6.1101>
- Gualdrón-López, M., Díaz-Varela, M., Toda, H., Aparici-Herraiz, I., Pedró-Cos, L., Lauzurica, R., Lacerda, M. V. G., Fernández-Sanmartín, M. A., Fernandez-Becerra, C., & del Portillo, H. A. (2021). Multiparameter flow cytometry analysis of the human spleen applied to studies of plasma-derived EVs from *Plasmodium vivax* patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.596104>
- Gubbels, M.-J., Striepen, B., Shastri, N., Turkoz, M., & Robey, E. A. (2005). Class I major histocompatibility complex presentation of antigens that escape from the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, 73(2), 703–711. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.703-711.2005>
- Gueirard, P., Laplante, A., Rondeau, C., Milon, G., & Desjardins, M. (2007). Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cellular Microbiology*, 10(1), 100–111. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01018.x>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., van Endert, P., & Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, *425*(6956), 397–402. <https://doi.org/10.1038/nature01911>
- Guilliams, M., Dutertre, C.-A., Scott, C. L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Prijck, S., Tavernier, S. J., Low, I., Irac, S. E., Mattar, C. N., Sumatoh, H. R., Low, G. H. L., Chung, T. J. K., Chan, D. K. H., Tan, K. K., ... Ginhoux, F. (2016). Unsupervised high-dimensional analysis aligns dendritic cells across tissues and species. *Immunity*, *45*(3), 669–684. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.015>
- Guo, H., Callaway, J. B., & Ting, J. P.-Y. (2015). Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine*, *21*(7), 677–687. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>. Inflammasomes
- Gupta, A. K., Das, S., Kamran, M., Ejazi, S. A., & Ali, N. (2022). The pathogenicity and virulence of *Leishmania*- interplay of virulence factors with host defenses. *Virulence*, *13*(1), 903–935. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2074130>
- Gupta, A. K., Ghosh, K., Palit, S., Barua, J., Das, P. K., & Ukil, A. (2017). *Leishmania donovani* inhibits inflammasome-dependent macrophage activation by exploiting the negative regulatory proteins A20 and UCP2. *The FASEB Journal*, *31*(11), 5087–5101. <https://doi.org/10.1096/fj.201700407R>
- Gupta, P., Giri, J., Srivastav, S., Chande, A. G., Mukhopadhyaya, R., Das, P. K., & Ukil, A. (2014). *Leishmania donovani* targets tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 3 for impairing TLR4-mediated host response. *The FASEB Journal*, *28*(4), 1756–1768. <https://doi.org/10.1096/fj.13-238428>
- Gurel, M. S., Tekin, B., & Uzun, S. (2020). Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. *Clinics in Dermatology*, *38*(2), 140–151. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2019.10.008>

## H

- Hailu, A., Musa, A., Wasunna, M., Balasegaram, M., Yifru, S., Mengistu, G., Hurissa, Z., Hailu, W., Weldegebreal, T., Tesfaye, S., Makonnen, E., Khailil, E., Ahmed, O., Fadlalla, A., El-Hassan, A., Raheem, M., Mueller, M., Koummuki, Y., Rashid, J., ... Kinuthia, J. (2010). Geographical variation in the response of visceral leishmaniasis to paromomycin in East Africa: A multicentre, open-label, randomized trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *4*(10), e709. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000709>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, *166*(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hao, Q., & Tang, H. (2018). Interferon- $\gamma$  and Smac mimetics synergize to induce apoptosis of lung cancer cells in a TNF $\alpha$ -independent manner. *Cancer Cell International*, *18*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0579-y>
- Hari, Y., Harashima, N., Tajima, Y., & Harada, M. (2015). Bcl-xL inhibition by molecular-targeting drugs sensitizes human pancreatic cancer cells to TRAIL. *Oncotarget*, *6*(39), 41902–41915. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5881>
- Hartley, M.-A., Eren, R. O., Rossi, M., Prevel, F., Castiglioni, P., Isorce, N., Desponds, C., Lye, L.-F., Beverley, S. M., Drexler, S. K., & Fasel, N. (2018). *Leishmania guyanensis* parasites block the activation of the inflammasome by inhibiting maturation of IL-1 $\beta$ . *Microbial Cell*, *5*(3), 137–149. <https://doi.org/10.15698/mic2018.03.619>
- Hatzigeorgiou, D. E., Geng, J., Zhu, B., Zhang, Y., Liu, K., Rom, W. N., Fenton, M. J., Turco, S. J., & Ho, J. L. (1996). Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-induced interleukin 1 $\beta$  gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(25), 14708–14713. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14708>
- Haudek, S. B., Taffet, G. E., Schneider, M. D., & Mann, D. L. (2007). TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(9), 2692–2701. <https://doi.org/10.1172/JCI29134>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- He, S., Liang, Y., Shao, F., & Wang, X. (2011). Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(50), 20054–20059. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116302108>
- He, W., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., Yang, Z.-H., Zhong, C.-Q., & Han, J. (2015). Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 $\beta$  secretion. *Cell Research*, *25*(12), 1285–1298. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.139>
- He, Y., Hara, H., & Núñez, G. (2016). Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(12), 1012–1021. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002>
- Healy, L. J., Collins, H. L., & Thompson, S. J. (2009). Systemic administration of tolerogenic dendritic cells ameliorates murine inflammatory arthritis. *The Open Rheumatology Journal*, *2*(1), 71–80. <https://doi.org/10.2174/1874312900802010071>
- Heap, R. E., Marín-Rubio, J. L., Peltier, J., Heunis, T., Dannoura, A., Moore, A., & Trost, M. (2021). Proteomics characterisation of the L929 cell supernatant and its role in BMDM differentiation. *Life Science Alliance*, *4*(6), e202000957. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000957>
- Heinzel, F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., Coffman, R. L., & Locksley, R. M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *Journal of Experimental Medicine*, *169*(1), 59–72. <https://doi.org/10.1084/jem.169.1.59>
- Hennessy, E. J., Adam, A., Aquila, B. M., Castriotta, L. M., Cook, D., Hattersley, M., Hird, A. W., Huntington, C., Kamhi, V. M., Laing, N. M., Li, D., MacIntyre, T., Omer, C. A., Oza, V., Patterson, T., Repik, G., Rooney, M. T., Saeh, J. C., Sha, L., ... Whitston, D. (2013). Discovery of a novel class of dimeric Smac mimetics as potent IAP antagonists resulting in a clinical candidate for the treatment of cancer (AZD5582). *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*(24), 9897–9919. <https://doi.org/10.1021/jm401075x>
- Henri, S., Curtis, J., Hochrein, H., Vremec, D., Shortman, K., & Handman, E. (2002). Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: Inverse relationship to interleukin-12 production. *Infection and Immunity*, *70*(7), 3874–3880. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3874-3880.2002>
- Henry, C. J., Omelles, D. A., Mitchell, L. M., Brzoza-Lewis, K. L., & Hiltbold, E. M. (2008). IL-12 produced by dendritic cells augments CD8+ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. *The Journal of Immunology*, *181*(12), 8576–8584. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8576>
- Hermida, M. D., Doria, P. G., Taguchi, A. M., Mengel, J. O., & dos-Santos, W. L. (2014). *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC Infectious Diseases*, *14*(1), 450. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-450>
- Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghori, N., Falkow, S., & Zychlinsky, A. (1999). The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(5), 2396–2401. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2396>
- Hewitt, M. C., & Seeberger, P. H. (2001). Solution and solid-support synthesis of a potential leishmaniasis carbohydrate vaccine. *The Journal of Organic Chemistry*, *66*(12), 4233–4243. <https://doi.org/10.1021/jo015521z>
- Hilbi, H., Moss, J. E., Hersh, D., Chen, Y., Arondel, J., Banerjee, S., Flavell, R. A., Yuan, J., Sansonetti, P. J., & Zychlinsky, A. (1998). *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(49), 32895–32900. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32895>
- Ho, J. L., Badaró, R., Schwartz, A., Dinarello, C. A., Gelfand, J. A., Sobel, J., Barral, A., Barral Netto, M., Carvalho, E. M., Reed, S. G., & Johnson, W. D. (1992). Diminished *in vitro* production of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  during acute visceral leishmaniasis and recovery after therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, *165*(6), 1094–1102. <https://doi.org/10.1093/infdis/165.6.1094>
- Hobernik, D., & Bros, M. (2018). DNA vaccines—How far from clinical use? *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3605), 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijms19113605>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., & O’Keeffe, M. (2001). Differential production of IL-12, IFN- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  by mouse dendritic cell subsets. *The Journal of Immunology*, 166(9), 5448–5455. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.9.5448>
- Hodgkinson, V. H., & Herman, R. (1980). *In vivo* assay of viability of amastigotes of *Leishmania donovani*. *The Journal of Parasitology*, 66(2), 245. <https://doi.org/10.2307/3280812>
- Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., & Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*, 76(1), 17–27. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90169-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90169-4)
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.-L., Schneider, P., Seed, B., & Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology*, 1(6), 489–495. <https://doi.org/10.1038/82732>
- Hou, J., Zhao, R., Xia, W., Chang, C.-W., You, Y., Hsu, J.-M., Nie, L., Chen, Y., Wang, Y.-C., Liu, C., Wang, W.-J., Wu, Y., Ke, B., Hsu, J. L., Huang, K., Ye, Z., Yang, Y., Xia, X., Li, Y., ... Hung, M.-C. (2020). PD-L1-mediated gasdermin C expression switches apoptosis to pyroptosis in cancer cells and facilitates tumour necrosis. *Nature Cell Biology*, 22(10), 1264–1275. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0575-z>
- Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K., & Jonuleit, H. (2013). Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, 4(82), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00082>
- Hughes, S. A., Lin, M., Weir, A., Huang, B., Xiong, L., Chua, N. K., Pang, J., Santavanond, J. P., Tixeira, R., Doerflinger, M., Deng, Y., Yu, C., Silke, N., Conos, S. A., Frank, D., Simpson, D. S., Murphy, J. M., Lawlor, K. E., Pearson, J. S., ... Vince, J. E. (2023). Caspase-8-driven apoptotic and pyroptotic crosstalk causes cell death and IL-1 $\beta$  release in X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) deficiency. *The EMBO Journal*, 42(5), e110468. <https://doi.org/10.15252/emj.2021110468>
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO Journal*, 30(17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Hurdalay, R., & Brombacher, F. (2014). The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous leishmaniasis. *Immunology Letters*, 161(2), 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.12.022>
- Hurrell, B. P., Regli, I. B., & Tacchini-Cottier, F. (2016). Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. *Trends in Parasitology*, 32(5), 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.003>
- Husebye, H., Aune, M. H., Stenvik, J., Samstad, E., Skjeldal, F., Halaas, Ø., Nilsen, N. J., Stenmark, H., Latz, E., Lien, E., Mollnes, T. E., Bakke, O., & Espevik, T. (2010). The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity*, 33(4), 583–596. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.010>
- Hutcheon, C., Paulvannan, P., & Subramanian, N. (2016). Cytoplasmic sensing in innate immunity. In *Encyclopedia of Cell Biology* (pp. 710–726). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821618-7.00012-2>
- 
- Ichim, G., & Tait, S. W. G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 16(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 277–288. <https://doi.org/10.1038/nrc776>
- Imbert, S., Palous, M., Meyer, I., Dannaoui, E., Mazier, D., Datry, A., & Fekkar, A. (2014). *In vitro* combination of voriconazole and miltefosine against clinically relevant molds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(11), 6996–6998. <https://doi.org/10.1128/AAC.03212-14>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, *96*(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)
- Irisarri, M., Plumas, J., Bonnefoix, T., Jacob, M.-C., Roucard, C., Pasquier, M.-A., Sotto, J.-J., & Lajmanovich, A. (2000). Resistance to CD95-mediated apoptosis through constitutive c-FLIP expression in a non-Hodgkin's lymphoma B cell line. *Leukemia*, *14*(12), 2149–2158. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401954>
- Isberg, R. R., O'Connor, T. J., & Heidtman, M. (2009). The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(1), 13–24. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1967>
- Iyer, S. S., He, Q., Janczy, J. R., Elliott, E. I., Zhong, Z., Olivier, A. K., Sadler, J. J., Knepper-Adrian, V., Han, R., Qiao, L., Eisenbarth, S. C., Nauseef, W. M., Cassel, S. L., & Sutterwala, F. S. (2013). Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity*, *39*(2), 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.001>
- 
- J**
- Jafarzadeh, A., Nemati, M., Sharifi, I., Nair, A., Shukla, D., Chauhan, P., Khorramdelazad, H., Sarkar, A., & Saha, B. (2019). *Leishmania* species-dependent functional duality of toll-like receptor 2. *IUBMB Life*, *71*(11), 1685–1700. <https://doi.org/10.1002/iub.2129>
- Jaramillo, M., Gomez, M. A., Larsson, O., Shio, M. T., Topisirovic, I., Contreras, I., Luxenburg, R., Rosenfeld, A., Colina, R., McMaster, R. W., Olivier, M., Costa-Mattioli, M., & Sonenberg, N. (2011). *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell Host & Microbe*, *9*(4), 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.03.008>
- Jawed, J. J., Dutta, S., & Majumdar, S. (2019). Functional aspects of T cell diversity in visceral Leishmaniasis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *117*(109098), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109098>
- Jena Bioscience. (2023). *pLEXSY-hyg2.1*. <https://www.jenabioscience.com/lexsy-expression/lexsy-configurations/vectors/ege-272-plexsy-hyg2-1>
- Jhingran, A., Chawla, B., Saxena, S., Barrett, M. P., & Madhubala, R. (2009). Paromomycin: Uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *164*(2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.12.007>
- Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., & Molina, R. (2014). Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Veterinary Parasitology*, *202*(3–4), 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.027>
- Jo, G. H., Bögler, O., Chwae, Y.-J., Yoo, H., Lee, S. H., Park, J. B., Kim, Y.-J., Kim, J. H., & Gwak, H.-S. (2014). Radiation-induced autophagy contributes to cell death and induces apoptosis partly in malignant glioma cells. *Cancer Research and Treatment*, *47*(2), 221–241. <https://doi.org/10.4143/crt.2013.159>
- Johannes, L., & Popoff, V. (2008). Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell*, *135*(7), 1175–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.009>
- Jones, J. D. (2015). *Leishmania tarentolae*: an alternative approach to the production of monoclonal antibodies to treat emerging viral infections. *Infectious Diseases of Poverty*, *4*(8), 1–5. <https://doi.org/10.1186/2049-9957-4-8>
- Joshi, T., Rodriguez, S., Perovic, V., Cockburn, I. A., & Stäger, S. (2009). B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8+ T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathogens*, *5*(5), e1000431. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000431>
- Jost, P. J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M. D., Nachbur, U., Huang, D. C. S., Bouillet, P., Thomas, H. E., Borner, C., Silke, J., Strasser, A., & Kaufmann, T. (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*, *460*(7258), 1035–1039. <https://doi.org/10.1038/nature08229>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., & Alnemri, E. S. (2012). Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(43), 36617–36622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407130>

## K

Kaiser, W. J., Sridharan, H., Huang, C., Mandal, P., Upton, J. W., Gough, P. J., Sehon, C. A., Marquis, R. W., Bertin, J., & Mocarski, E. S. (2013). Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *Journal of Biological Chemistry*, 288(43), 31268–31279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.462341>

Kalkavan, H., & Green, D. R. (2018). MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 46–55. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.179>

Kamanaka, M., Yu, P., Yasui, T., Yoshida, K., Kawabe, T., & Horii, T. (1996). Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity CD40–CD40L interaction also plays a critical role in cell-mediated immune responses. *Immunity*, 4(3), 275–281. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80435-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80435-5)

Kane, M. M., & Mosser, D. M. (2000). *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Current Opinion in Hematology*, 7(1), 26–31. <https://doi.org/10.1097/00062752-200001000-00006>

Kang, T.-B., Yang, S.-H., Toth, B., Kovalenko, A., & Wallach, D. (2013). Caspase-8 blocks kinase RIPK3-mediated activation of the NLRP3 inflammasome. *Immunity*, 38(1), 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.015>

Karam, M. C., Merckbawi, R., El-Kouba, J. E., Bazzi, S. I., & Bodman-Smith, K. B. (2013). In *Leishmania major*-induced inflammation, interleukin-13 reduces hyperalgesia, down-regulates IL-1 $\beta$  and up-regulates IL-6 in an IL-4 independent mechanism. *Experimental Parasitology*, 134(2), 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.02.005>

Karmakar, S., Bhaumik, S. K., Paul, J., & De, T. (2012). TLR4 and NKT cell synergy in immunotherapy against visceral leishmaniasis. *PLoS Pathogens*, 8(4), e1002646. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002646>

Karttunen, J., Sanderson, S., & Shastri, N. (1992). Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(13), 6020–6024. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.6020>

Kaushal, H., Bras-Gonçalves, R., Negi, N. S., Lemesre, J. L., Papierok, G., & Salotra, P. (2014). Role of CD8+ T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed visceral leishmaniasis individuals. *BMC Infectious Diseases*, 14(653), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0653-6>

Kautz-Neu, K., Kostka, S. L., Dinges, S., Iwakura, Y., Udey, M. C., & von Stebut, E. (2011). IL-1 signalling is dispensable for protective immunity in *Leishmania*-resistant mice. *Experimental Dermatology*, 20(1), 76–78. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01172.x>

Kavoosi, G., Ardestani, S. K., & Kariminia, A. (2009). The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology*, 136(10), 1193–1199. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990473>

Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, 5(461), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>

Kayagaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q. T., Liu, P. S., Lill, J. R., Li, H., Wu, J., Kummerfeld, S., Zhang, J., Lee, W. P., Snipas, S. J., Salvesen, G. S., ... Dixit, V. M. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 526(7575), 666–671. <https://doi.org/10.1038/nature15541>

Keane, J., Balcewicz-Sablinska, M. K., Remold, H. G., Chupp, G. L., Meek, B. B., Fenton, M. J., & Kornfeld, H. (1997). Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infection and Immunity*, 65(1), 298–304. <https://doi.org/10.1128/iai.65.1.298-304.1997>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Keerti, & Kumar, V. (2021). Development of a successful vaccine for leishmaniasis: possibilities and challenges. In *Pathogenesis, Treatment and Prevention of Leishmaniasis* (pp. 183–196). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822800-5.00006-8>
- Keller, A., Scheiding, B., Breitling, R., Licht, A., Hemmerich, P., Lorkowski, S., & Reissmann, S. (2019). Transduction and transfection of difficult-to-transfect cells: Systematic attempts for the transfection of protozoa *Leishmania*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(1), 14–27. <https://doi.org/10.1002/jcb.27463>
- Kepp, O., Senovilla, L., Galluzzi, L., Panaretakis, T., Schlemmer, F., Madeo, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2009). Viral subversion of immunogenic cell death. *Cell Cycle*, 8(6), 860–869. <https://doi.org/10.4161/cc.8.6.7939>
- Kerridge, D. (1958). The effect of actidione and other antifungal agents on nucleic acid and protein synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of General Microbiology*, 19(3), 497–506. <https://doi.org/10.1099/00221287-19-3-497>
- Khamesipour, A., Dowlati, Y., Asilian, A., Hashemifesharki, R., Javadi, A., Noazin, S., & Modabber, F. (2005). Leishmanization: Use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine*, 23(28), 3642–3648. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.02.015>
- Khouili, S. C., Cook, E. C. L., Hernández-García, E., Martínez-López, M., Conde-Garrosa, R., & Iborra, S. (2020). SHP-1 regulates antigen cross-presentation and is exploited by *Leishmania* to evade immunity. *Cell Reports*, 33(9), 108468. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108468>
- Khoury, R., Bafica, A., Silva, M. da P. P., Noronha, A., Kolb, J.-P., Wietzerbin, J., Barral, A., Barral-Netto, M., & Van Weyenbergh, J. (2009). IFN- $\beta$  impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: Evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 182(4), 2525–2531. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802860>
- Kim, J., Lee, S., Oh, S., Han, S., Park, H., Yoo, M.-A., & Kang, H. (2004). Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-Xs and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. *Oncology Reports*, 12(6), 1233–1238. <https://doi.org/10.3892/or.12.6.1233>
- Kima, P. E., Soong, L., Chicharro, C., Ruddle, N. H., & McMahon-Pratt, D. (1996). *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells. *European Journal of Immunology*, 26(12), 3163–3169. <https://doi.org/10.1002/eji.1830261249>
- Kimberlin, D. W., Barnett, E. D., Lynfield, R., & Sawyer, M. (2018). Red book: 2018–2021 report of the committee on infectious diseases. In *American Academy of Pediatrics*.
- Kimsey, P. B., Theodos, C. M., Mitchen, T. K., Turco, S. J., & Titus, R. G. (1993). An avirulent lipophosphoglycan-deficient *Leishmania major* clone induces CD4+ T cells which protect susceptible BALB/c mice against infection with virulent *L. major*. *Infection and Immunity*, 61(12), 5205–5213. <https://doi.org/10.1128/iai.61.12.5205-5213.1993>
- Kimutai, R., Musa, A. M., Njoroge, S., Omollo, R., Alves, F., Hailu, A., Khalil, E. A. G., Diro, E., Soipei, P., Musa, B., Salman, K., Ritmeijer, K., Chappuis, F., Rashid, J., Mohammed, R., Jameneh, A., Makonnen, E., Olobo, J., Okello, L., ... Wasunna, M. (2017). Safety and effectiveness of sodium stibogluconate and paromomycin combination for the treatment of visceral leishmaniasis in Eastern Africa: Results from a pharmacovigilance programme. *Clinical Drug Investigation*, 37(3), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s40261-016-0481-0>
- Klingler, K., Tchou-Wong, K. M., Brändli, O., Aston, C., Kim, R., Chi, C., & Rom, W. N. (1997). Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. *Infection and Immunity*, 65(12), 5272–5278. <https://doi.org/10.1128/iai.65.12.5272-5278.1997>
- Knuth, A.-K., Rösler, S., Schenk, B., Kowald, L., van Wijk, S. J. L., & Fulda, S. (2019). Interferons transcriptionally up-regulate MLKL expression in cancer cells. *Neoplasia*, 21(1), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.11.002>
- Kohli, K., Janssen, A., & Förster, R. (2016). Plasmacytoid dendritic cells induce tolerance predominantly by cargoing antigen to lymph nodes. *European Journal of Immunology*, 46(11), 2659–2668. <https://doi.org/10.1002/eji.201646359>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- Komai-Koma, M., Li, D., Wang, E., Vaughan, D., & Xu, D. (2014). Anti-Toll-like receptor 2 and 4 antibodies suppress inflammatory response in mice. *Immunology*, 143(3), 354–362. <https://doi.org/10.1111/imm.12312>
- Kominami, K., Nakabayashi, J., Nagai, T., Tsujimura, Y., Chiba, K., Kimura, H., Miyawaki, A., Sawasaki, T., Yokota, H., Manabe, N., & Sakamaki, K. (2012). The molecular mechanism of apoptosis upon caspase-8 activation: Quantitative experimental validation of a mathematical model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(10), 1825–1840. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.07.003>
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A. L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G. L., Gong, J.-N., Moujalled, D. M., Bruno, A., Csekei, M., Paczal, A., Szabo, Z. B., Sipos, S., Radics, G., Proszenyak, A., Balint, B., Ondi, L., ... Geneste, O. (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature*, 538(7626), 477–482. <https://doi.org/10.1038/nature19830>
- Kretzer, N. M., Theisen, D. J., Tussiwand, R., Briseño, C. G., Grajales-Reyes, G. E., Wu, X., Durai, V., Albring, J., Bagadia, P., Murphy, T. L., & Murphy, K. M. (2016). RAB43 facilitates cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 $\alpha$  dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 213(13), 2871–2883. <https://doi.org/10.1084/jem.20160597>
- Kropf, P., Fuentes, J. M., Fähnrich, E., Arpa, L., Herath, S., Weber, V., Soler, G., Celada, A., Modolell, M., & Müller, I. (2005). Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis *in vivo*. *The FASEB Journal*, 19(8), 1000–1002. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3416fje>
- Krysko, D. V., Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., & Vandenabeele, P. (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(12), 860–875. <https://doi.org/10.1038/nrc3380>
- Kupcho, K., Shultz, J., Hurst, R., Hartnett, J., Zhou, W., Machleidt, T., Grailer, J., Worzella, T., Riss, T., Lazar, D., Cali, J. J., & Niles, A. (2019). A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis. *Apoptosis*, 24(1–2), 184–197. <https://doi.org/10.1007/s10495-018-1502-7>
- Kuriakose, T., & Kanneganti, T.-D. (2018). ZBP1: Innate sensor regulating cell death and inflammation. *Trends in Immunology*, 39(2), 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.11.002>
- Kuroda, E., & Yamashita, U. (2003). Mechanisms of enhanced macrophage-mediated prostaglandin E2 production and its suppressive role in Th1 activation in Th2-dominant BALB/c mice. *The Journal of Immunology*, 170(2), 757–764. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.2.757>
- Kuroda, E., Kito, T., & Yamashita, U. (2002). Reduced expression of STAT4 and IFN- $\gamma$  in macrophages from BALB/c mice. *The Journal of Immunology*, 168(11), 5477–5482. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5477>
- 
- L**
- Lamberti, M. J., Nigro, A., Mentucci, F. M., Vittar, N. B. R., Casolaro, V., & Col, J. D. (2020). Dendritic cells and immunogenic cancer cell death: A combination for improving antitumor immunity. *Pharmaceutics*, 12(256), 1–28. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030256>
- Lamkanfi, M. (2011). Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, 11(3), 213–220. <https://doi.org/10.1038/nri2936>
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 157(5), 1013–1022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007>
- Landsverk, O. J. B., Bakke, O., & Gregers, T. F. (2009). MHC II and the endocytic pathway: Regulation by invariant chain. *Scandinavian Journal of Immunology*, 70(3), 184–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02301.x>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Laskay, T., van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, 11(5), 210–214. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00075-1)
- Lauterbach, H., Bathke, B., Gilles, S., Traidl-Hoffmann, C., Lubert, C. A., Fejer, G., Freudenberg, M. A., Davey, G. M., Vremec, D., Kallies, A., Wu, L., Shortman, K., Chaplin, P., Suter, M., O’Keeffe, M., & Hochrein, H. (2010). Mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs and human BDCA3<sup>+</sup> DCs are major producers of IFN- $\lambda$  in response to poly IC. *Journal of Experimental Medicine*, 207(12), 2703–2717. <https://doi.org/10.1084/jem.20092720>
- Lawand, M., Abramova, A., Manceau, V., Springer, S., & van Endert, P. (2016). TAP-dependent and -independent peptide import into dendritic cell phagosomes. *The Journal of Immunology*, 197(9), 3454–3463. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501925>
- Lawlor, K. E., Feltham, R., Yabal, M., Conos, S. A., Chen, K. W., Ziehe, S., Graß, C., Zhan, Y., Nguyen, T. A., Hall, C., Vince, A. J., Chatfield, S. M., D’Silva, D. B., Pang, K. C., Schroder, K., Silke, J., Vaux, D. L., Jost, P. J., & Vince, J. E. (2017). XIAP loss triggers RIPK3- and caspase-8-driven IL-1 $\beta$  activation and cell death as a consequence of TLR-MyD88-induced cIAP1-TRAF2 degradation. *Cell Reports*, 20(3), 668–682. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.073>
- Lawlor, K. E., Khan, N., Mildenhall, A., Gerlic, M., Croker, B. A., D’Cruz, A. A., Hall, C., Kaur Spall, S., Anderton, H., Masters, S. L., Rashidi, M., Wicks, I. P., Alexander, W. S., Mitsuuchi, Y., Benetatos, C. A., Condon, S. M., Wong, W. W.-L., Silke, J., Vaux, D. L., & Vince, J. E. (2015). RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nature Communications*, 6(6282), 1–19. <https://doi.org/10.1038/ncomms7282>
- Lechmann, M., Berchtold, S., Steinkasserer, A., & Hauber, J. (2002). CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends in Immunology*, 23(6), 273–275. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02214-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02214-7)
- Lee, G.-S., Subramanian, N., Kim, A. I., Aksentijevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D. B., Germain, R. N., Kastner, D. L., & Chae, J. J. (2012). The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Nature*, 492(7427), 123–127. <https://doi.org/10.1038/nature11588>
- Legarda, D., & Ting, A. T. (2018). Analysis of necroptosis in bone marrow-derived macrophages. *Methods in Molecular Biology*, 1857, 63–70. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8754-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8754-2_6)
- Legarda, D., Justus, S. J., Ang, R. L., Rikhi, N., Li, W., Moran, T. M., Zhang, J., Mizoguchi, E., Zelic, M., Kelliher, M. A., Blander, J. M., & Ting, A. T. (2016). CYLD proteolysis protects macrophages from TNF-mediated auto-necroptosis induced by LPS and licensed by type I IFN. *Cell Reports*, 15(11), 2449–2461. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.032>
- Legastelois, I., Buffin, S., Peubez, I., Mignon, C., Sodoyer, R., & Werle, B. (2017). Non-conventional expression systems for the production of vaccine proteins and immunotherapeutic molecules. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(4), 947–961. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1260795>
- Legrand, A. J., Konstantinou, M., Goode, E. F., & Meier, P. (2019). The diversification of cell death and immunity: *Memento mori*. *Molecular Cell*, 76(2), 232–242. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.006>
- Levi, M., & Sivapalaratnam, S. (2018). Disseminated intravascular coagulation: an update on pathogenesis and diagnosis. *Expert Review of Hematology*, 11(8), 663–672. <https://doi.org/10.1080/17474086.2018.1500173>
- Lewis, K. L., Caton, M. L., Bogunovic, M., Greter, M., Grajkowska, L. T., Ng, D., Klinakis, A., Charo, I. F., Jung, S., Gommerman, J. L., Ivanov, I. I., Liu, K., Merad, M., & Reizis, B. (2011). Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity*, 35(5), 780–791. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.013>
- Li, J., McQuade, T., Siemer, A. B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.-S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., Chan, F. K.-M., & Wu, H. (2012). The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell*, 150(2), 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.019>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Li, P., Zhou, L., Zhao, T., Liu, X., Zhang, P., Liu, Y., Zheng, X., & Li, Q. (2017). Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*, 8(14), 23996–24008. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15098>
- Li, Z., Ju, X., Silveira, P. A., Abadir, E., Hsu, W.-H., Hart, D. N. J., & Clark, G. J. (2019). CD83: Activation marker for antigen presenting cells and its therapeutic potential. *Frontiers in Immunology*, 10(1312), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01312>
- Libório, A. B., Rocha, N. A., Oliveira, M. J. C., Franco, L. F. L. G., Aguiar, G. B. R., Pimentel, R. S., Abreu, K. L. S., Silva, G. B., & Daher, E. F. (2012). Acute kidney injury in children with visceral leishmaniasis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 31(5), 451–454. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318247f533>
- Liese, J., Schleicher, U., & Bogdan, C. (2007). TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, 37(12), 3424–3434. <https://doi.org/10.1002/eji.200737182>
- Liew, F. Y., Li, Y., & Millott, S. (1990). Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*, 71(4), 556–559.
- Ligasová, A., & Koberna, K. (2021). Dna dyes—highly sensitive reporters of cell quantification: Comparison with other cell quantification methods. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 18). <https://doi.org/10.3390/molecules26185515>
- Lima-Junior, D. S., Costa, D. L., Carregaro, V., Cunha, L. D., Silva, A. L. N., Mineo, T. W. P., Gutierrez, F. R. S., Bellio, M., Bortoluci, K. R., Flavell, R. A., Bozza, M. T., Silva, J. S., & Zamboni, D. S. (2013). Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nature Medicine*, 19(7), 909–915. <https://doi.org/10.1038/nm.3221>
- Lin, J., Kumari, S., Kim, C., Van, T.-M., Wachsmuth, L., Polykratis, A., & Pasparakis, M. (2016). RIPK1 counteracts ZBP1-mediated necroptosis to inhibit inflammation. *Nature*, 540(7631), 124–128. <https://doi.org/10.1038/nature20558>
- Lin, R. A., Lin, J. K., & Lin, S. (2021). Mechanisms of immunogenic cell death and immune checkpoint blockade therapy. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 37(6), 448–458. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12375>
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., & Liu, Z. -g. (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by Caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes & Development*, 13(19), 2514–2526. <https://doi.org/10.1101/gad.13.19.2514>
- Lisi, S., Sisto, M., Acquafredda, A., Spinelli, R., Schiavone, M. A., Mitolo, V., Brandonisio, O., & Panaro, M. A. (2005). Infection with *Leishmania infantum* inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(3), 211–217. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00026.x>
- Liston, A., & Masters, S. L. (2017). Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nature Reviews Immunology*, 17(3), 208–214. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.151>
- Liu, D., & Uzonna, J. E. (2012). The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083>
- Liu, Q., Wen, W., Tang, L., Qin, C.-J., Lin, Y., Zhang, H.-L., Wu, H., Ashton, C., Wu, H.-P., Ding, J., Dong, W., Yu, L.-X., Yang, W., Huang, D.-D., Wu, M.-C., Wang, H.-Y., & Yan, H.-X. (2016a). Inhibition of SIRP $\alpha$  in dendritic cells potentiates potent antitumor immunity. *Oncotarget*, 5(9), e1183850. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1183850>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 2, Issue 17023, pp. 1–9). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, X., Li, J., Liu, Y., Ding, J., Tong, Z., Liu, Y., Zhou, Y., & Liu, Y. (2016b). Calreticulin acts as an adjuvant to promote dendritic cell maturation and enhances antigen-specific cytotoxic T lymphocyte

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- responses against non-small cell lung cancer cells. *Cellular Immunology*, 300, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.12.003>
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., & Lieberman, J. (2016c). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 535(7610), 153–158. <https://doi.org/10.1038/nature18629>
- Liu, Y., Chen, J., Zhang, Z., Ma, X., Chen, Y., Du, X., Liu, H., Zong, Y., & Lu, G. (2017). NLRP3 inflammasome activation mediates radiation-induced pyroptosis in bone marrow-derived macrophages. *Cell Death & Disease*, 8(2), e2579–e2579. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.460>
- Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2405–2419. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.011>
- Lodge, R., & Descoteaux, A. (2005). Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clinical Immunology*, 114(3), 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.07.018>
- Lodge, R., & Descoteaux, A. (2008). *Leishmania* invasion and phagosome biogenesis. In *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion* (Vol. 47, pp. 174–181). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_14)
- Lodge, R., Diallo, T. O., & Descoteaux, A. (2006). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cellular Microbiology*, 8(12), 1922–1931. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00758.x>
- Loria-Cervera, E. N., & Andrade-Narvaez, F. (2020). The role of monocytes/macrophages in *Leishmania* infection: A glance at the human response. *Acta Tropica*, 207, 105456. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105456>
- Louis, J. A., Conceição-Silva, F., Himmelrich, H., Tacchini-Cottier, F., & Launois, P. (1998). Anti-*leishmania* effector functions of CD4+ Th1 cells and early events instructing Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 452, pp. 53–60). [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5355-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5355-7_7)
- Lu, J., Bai, L., Sun, H., Nikolovska-Coleska, Z., McEachern, D., Qiu, S., Miller, R. S., Yi, H., Shangary, S., Sun, Y., Meagher, J. L., Stuckey, J. A., & Wang, S. (2008). SM-164: A novel, bivalent Smac mimetic that induces apoptosis and tumor regression by concurrent removal of the blockade of cIAP-1/2 and XIAP. *Cancer Research*, 68(22), 9384–9393. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2655>
- Luber, C. A., Cox, J., Lauterbach, H., Fancke, B., Selbach, M., Tschopp, J., Akira, S., Wiegand, M., Hochrein, H., O’Keeffe, M., & Mann, M. (2010). Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity*, 32(2), 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.01.013>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4+ T cells: Differentiation and functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Lührmann, A., & Roy, C. R. (2007). *Coxiella burnetii* inhibits activation of host cell apoptosis through a mechanism that involves preventing cytochrome c release from mitochondria. *Infection and Immunity*, 75(11), 5282–5289. <https://doi.org/10.1128/IAI.00863-07>
- Lyons, A. B., & Parish, C. R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 171(1), 131–137. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90236-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90236-4)

## M

- Ma, Y., Adjemian, S., Mattarollo, S. R., Yamazaki, T., Aymeric, L., Yang, H., Portela Catani, J. P., Hannani, D., Duret, H., Steegh, K., Martins, I., Schlemmer, F., Michaud, M., Kepp, O., Sukkurwala, A. Q., Menger, L., Vacchelli, E., Droin, N., Galluzzi, L., ... Kroemer, G. (2013). Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity*, 38(4), 729–741. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.03.003>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Macri, C., Pang, E. S., Patton, T., & O'Keeffe, M. (2018). Dendritic cell subsets. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 84, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.12.009>
- Maelfait, J., Vercammen, E., Janssens, S., Schotte, P., Haegman, M., Magez, S., & Beyaert, R. (2008). Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1 $\beta$  maturation by caspase-8. *Journal of Experimental Medicine*, 205(9), 1967–1973. <https://doi.org/10.1084/jem.20071632>
- Majno, G., & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. In *American Journal of Pathology* (Vol. 146, Issue 1, pp. 3–15).
- Malhotra, P., Gupta, A. K., Singh, D., Mishra, S., Singh, S. K., & Kumar, R. (2018). N-Acetyl-tryptophan glucoside (NATG) protects J774A.1 murine macrophages against gamma radiation-induced cell death by modulating oxidative stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 447(1–2), 9–19. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3289-9>
- Malireddi, R. K. S., Gurung, P., Mavuluri, J., Dasari, T. K., Klco, J. M., Chi, H., & Kanneganti, T.-D. (2018). TAK1 restricts spontaneous NLRP3 activation and cell death to control myeloid proliferation. *Journal of Experimental Medicine*, 215(4), 1023–1034. <https://doi.org/10.1084/jem.20171922>
- Man, S. M., Tourlomousis, P., Hopkins, L., Monie, T. P., Fitzgerald, K. A., & Bryant, C. E. (2013). *Salmonella* infection induces recruitment of caspase-8 to the inflammasome to modulate IL-1 $\beta$  production. *The Journal of Immunology*, 191(10), 5239–5246. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301581>
- Mandel, M., & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*, 53(1), 159–162. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90051-3)
- Mann, S., Frasca, K., Scherrer, S., Henao-Martínez, A. F., Newman, S., Ramanan, P., & Suarez, J. A. (2021). A review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions. *Current Tropical Medicine Reports*, 8(2), 121–132. <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7>
- Mantegazza, A. R., Magalhaes, J. G., Amigorena, S., & Marks, M. S. (2013). Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic*, 14(2), 135–152. <https://doi.org/10.1111/tra.12026>
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E. R., Lyman, S. D., Shortman, K., & McKenna, H. J. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *Journal of Experimental Medicine*, 184(5), 1953–1962. <https://doi.org/10.1084/jem.184.5.1953>
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M., & Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440(7081), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature04515>
- Marsden, P. D. (1986). Mucosal leishmaniasis ("spundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(6), 859–876. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90243-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90243-9)
- Martínez-López, M., Iborra, S., Conde-Garrosa, R., & Sancho, D. (2015). Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania major* infection in mice. *European Journal of Immunology*, 45(1), 119–129. <https://doi.org/10.1002/eji.201444651>
- Martínez-López, M., Soto, M., Iborra, S., & Sancho, D. (2018). *Leishmania* hijacks myeloid cells for immune escape. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00883>
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome. *Molecular Cell*, 10(2), 417–426. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)
- Martinvalet, D., Zhu, P., & Lieberman, J. (2005). Granzyme a induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, 22(3), 355–370. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.02.004>
- Mashayekhi, M., Sandau, M. M., Dunay, I. R., Frickel, E. M., Khan, A., Goldszmid, R. S., Sher, A., Ploegh, H. L., Murphy, T. L., Sibley, L. D., & Murphy, K. M. (2011). CD8 $\alpha$ + dendritic cells are the critical

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity*, 35(2), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.008>
- Matheoud, D., Moradin, N., Bellemare-Pelletier, A., Shio, M. T., Hong, W. J., Olivier, M., Gagnon, É., Desjardins, M., & Descoteaux, A. (2013). *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host & Microbe*, 14(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.06.003>
- Matsushita, H., Hosoi, A., Ueha, S., Abe, J., Fujieda, N., Tomura, M., Maekawa, R., Matsushima, K., Ohara, O., & Kakimi, K. (2015). Cytotoxic T lymphocytes block tumor growth both by lytic activity and IFN $\gamma$ -dependent cell-cycle arrest. *Cancer Immunology Research*, 3(1), 26–36. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0098>
- Matthews, W., Jordan, C. T., Wiegand, G. W., Pardoll, D., & Lemischka, I. R. (1991). A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell*, 65(7), 1143–1152. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90010-V](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90010-V)
- Maupin-Furlow, J. (2012). Proteasomes and protein conjugation across domains of life. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2), 100–111. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2696>
- McComb, S., Cheung, H. H., Korneluk, R. G., Wang, S., Krishnan, L., & Sad, S. (2012). cIAP1 and cIAP2 limit macrophage necroptosis by inhibiting Rip1 and Rip3 activation. *Cell Death & Differentiation*, 19(11), 1791–1801. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.59>
- McComb, S., Shutinoski, B., Thurston, S., Cessford, E., Kumar, K., & Sad, S. (2014). Cathepsins limit macrophage necroptosis through cleavage of Rip1 kinase. *The Journal of Immunology*, 192(12), 5671–5678. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303380>
- McIlroy, D., Troadec, C., Grassi, F., Samri, A., Barrou, B., Autran, B., Debré, P., Feuillard, J., & Hosmalin, A. (2001). Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of *in vivo* activation in a subset of organ donors. *Blood*, 97(11), 3470–3477. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.11.3470>
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656–a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
- McKenna, H. J., Stocking, K. L., Miller, R. E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C. R., Lynch, D. H., Smith, J., Pulendran, B., Roux, E. R., Teepe, M., Lyman, S. D., & Peschon, J. J. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood*, 95(11), 3489–3497. <https://doi.org/10.1182/blood.V95.11.3489>
- McNew, J. A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R. J., Paz, K., Paumet, F., Söllner, T. H., & Rothman, J. E. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*, 407(6801), 153–159. <https://doi.org/10.1038/35025000>
- Megjugorac, N. J., Gallagher, G. E., & Gallagher, G. (2009). Modulation of human plasmacytoid DC function by IFN- $\lambda$ 1 (IL-29). *Journal of Leukocyte Biology*, 86(6), 1359–1363. <https://doi.org/10.1189/jlb.0509347>
- Mehta, S. R., Zhang, X.-Q., Badaro, R., Spina, C., Day, J., Chang, K.-P., & Schooley, R. T. (2010). Flow cytometric screening for anti-leishmanials in a human macrophage cell line. *Experimental Parasitology*, 126(4), 617–620. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.007>
- Meier, C. L., Svensson, M., & Kaye, P. M. (2003). *Leishmania*-induced inhibition of macrophage antigen presentation analyzed at the single-cell level. *The Journal of Immunology*, 171(12), 6706–6713. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6706>
- Mellman, I., & Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells. *Cell*, 106(3), 255–258. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00449-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00449-4)
- Mendonça, S. C. F. (2016). Differences in immune responses against *Leishmania* induced by infection and by immunization with killed parasite antigen: Implications for vaccine discovery. In *Parasites and Vectors* (Vol. 9, Issue 492, pp. 1–9). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1777-x>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: Ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 563–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>
- Metlay, J. P., Witmer-Pack, M. D., Agger, R., Crowley, M. T., Lawless, D., & Steinman, R. M. (1990). The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *Journal of Experimental Medicine*, 171(5), 1753–1771. <https://doi.org/10.1084/jem.171.5.1753>
- Miao, E. A., Leaf, I. A., Treuting, P. M., Mao, D. P., Dors, M., Sarkar, A., Warren, S. E., Wewers, M. D., & Aderem, A. (2010). caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nature Immunology*, 11(12), 1136–1142. <https://doi.org/10.1038/ni.1960>
- Mills, C. D. (2015). Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6(2015), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00212>
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Miltenyi Biotec. (2023). *MBTP 17: Immunophenotyping of dendritic cells from mouse spleen using flow cytometry*. <https://www.miltenyibiotec.com/ES-en/applications/all-protocols/immunophenotyping-of-dendritic-cells-from-mouse-spleen-using-flow-cytometry.html>
- Mishra, P., Dixit, A., Chatterjee, T., Bhattacharya, M., Bhattacharya, J., Dutta, P., Mahapatra, M., Prasad Pati, H., Choudhry, V. P., & Saxena, R. (2004). disseminated intravascular coagulation as an unusual presentation of Kala-azar: Report of two cases. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 36(6–7), 519–521. <https://doi.org/10.1080/00365540410020550>
- Mitchell, G. F., Handman, E., & Spithill, T. W. (1984). Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *Leishmania major* and importance of route of injection. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 62(2), 145–153. <https://doi.org/10.1038/icb.1984.14>
- Mizbani, A., Taheri, T., Zahedifard, F., Taslimi, Y., Azizi, H., Azadmanesh, K., Papadopoulou, B., & Rafati, S. (2009). Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 28(1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.114>
- Moafi, M., Sherkat, R., Taleban, R., & Rezvan, H. (2019). *Leishmania* vaccines entered in clinical trials: A review of literature. *International Journal of Preventive Medicine*, 10(95), 1–6. [https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM\\_116\\_18](https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_116_18)
- Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., & Bernal, J. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 190(1–2), 268–271. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006>
- Moll, H. (2003). Dendritic cells and host resistance to infection. *Cellular Microbiology*, 5(8), 493–500. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00291.x>
- Moon, J.-H., Shin, J.-S., Hong, S.-W., Jung, S.-A., Hwang, I.-Y., Kim, J. H., Choi, E. K., Ha, S.-H., Kim, J.-S., Kim, K.-M., Hong, D.-W., Kim, D., Kim, Y. S., Kim, J. E., Kim, K.-P., Hong, Y. S., Choi, E. K., Lee, J. S., Hattersley, M., ... Kim, T. W. (2015). A novel small-molecule IAP antagonist, AZD5582, draws Mcl-1 down-regulation for induction of apoptosis through targeting of cIAP1 and XIAP in human pancreatic cancer. *Oncotarget*, 6(29), 26895–26908. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4822>
- Moore, K. J., & Matlashewski, G. (1994). Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *The Journal of Immunology*, 152(6), 2930–2937. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.152.6.2930>
- Moquin, D. M., McQuade, T., & Chan, F. K.-M. (2013). CYLD Deubiquitinates RIP1 in the TNF $\alpha$ -Induced Necrosome to Facilitate Kinase Activation and Programmed Necrosis. *PLoS ONE*, 8(10), e76841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076841>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Müller, D., Mazzeo, P., Koch, R., Bösherz, M. S., Welter, S., von Hammerstein-Equord, A., Hinterthaler, M., Cordes, L., Belharazem, D., Marx, A., Ströbel, P., & Küffer, S. (2021). Functional apoptosis profiling identifies MCL-1 and BCL-xL as prognostic markers and therapeutic targets in advanced thymomas and thymic carcinomas. *BMC Medicine*, *19*(300), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02158-3>
- Muller, I., Pedrazzini, T., Farrell, J. P., & Louis, J. (1989). T-cell responses and immunity to experimental infection with *Leishmania major*. *Annual Review of Immunology*, *7*(1), 561–578. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.003021>
- Muntjewerff, E. M., Meesters, L. D., & van den Bogaart, G. (2020). Antigen cross-presentation by macrophages. *Frontiers in Immunology*, *11*(1276), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01276>
- Muraille, E., De Trez, C., Pajak, B., Torrentera, F. A., De Baetselier, P., Leo, O., & Carlier, Y. (2003). Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, *71*(5), 2704–2715. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2704-2715.2003>
- Murray, H. W., Zhang, Y., Zhang, Y., Raman, V. S., Reed, S. G., & Ma, X. (2013). Regulatory actions of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 in *Leishmania donovani* infection in the liver. *Infection and Immunity*, *81*(7), 2318–2326. <https://doi.org/10.1128/IAI.01468-12>
- Musa, A., Khalil, E., Hailu, A., Olobo, J., Balasegaram, M., Omollo, R., Edwards, T., Rashid, J., Mbui, J., Musa, B., Abuzaid, A. A., Ahmed, O., Fadlalla, A., El-Hassan, A., Mueller, M., Mucee, G., Njoroje, S., Manduku, V., Mutuma, G., ... Wasunna, M. (2012). Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: A randomised controlled trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(6), e1674. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001674>
- Mutiso, J. M., Macharia, J. C., Kio, M. N., Ichagichua, J. M., Rikoi, H., & Gicherub, M. M. (2013). Development of leishmania vaccines: Predicting the future from past and present experience. *Journal of Biomedical Research*, *27*(2), 85–102. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20120064>
- 
- N**
- Nadim, A., Javadian, E., Tahvildar Bidruni, G., & Ghorbani, M. (1983). Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique et de Ses Filiales*, *76*(4), 377–383.
- Nagill, R., & Kaur, S. (2011). Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. *International Immunopharmacology*, *11*(10), 1464–1488. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.008>
- Nair-Gupta, P., & Blander, J. M. (2013). An updated view of the intracellular mechanisms regulating cross-presentation. *Frontiers in Immunology*, *4*(401), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00401>
- Nair-Gupta, P., Baccarini, A., Tung, N., Seyffer, F., Florey, O., Huang, Y., Banerjee, M., Overholtzer, M., Roche, P. A., Tampé, R., Brown, B. D., Amsen, D., Whiteheart, S. W., & Blander, J. M. (2014). TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell*, *158*(3), 506–521. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.054>
- Naruka, M. (2023). Apoptosis VS necrosis. Medical Junction. <https://medical-junction.com/apoptosis-vs-necrosis/>
- Negera, E., Gadisa, E., Yamuah, L., Engers, H., Hussein, J., Kuru, T., Hailu, A., Gedamu, L., & Aseffa, A. (2008). Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Silti woreda, Ethiopia: risk factor assessment and causative agent identification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *102*(9), 883–890. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.021>
- Newton, K., Wickliffe, K. E., Maltzman, A., Dugger, D. L., Strasser, A., Pham, V. C., Lill, J. R., Roose-Girma, M., Warming, S., Solon, M., Ngu, H., Webster, J. D., & Dixit, V. M. (2016). RIPK1 inhibits ZBP1-driven necroptosis during development. *Nature*, *540*(7631), 129–133. <https://doi.org/10.1038/nature20559>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Nguyen, T. T., Chang, S.-C., Evnouchidou, I., York, I. A., Zikos, C., Rock, K. L., Goldberg, A. L., Stratikos, E., & Stern, L. J. (2011). Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(5), 604–613. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2021>
- Nicotera, P., Leist, M., & Manzo, L. (1999). Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(2), 46–51. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01304-8](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01304-8)
- Niimi, T. (2012). Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: a review. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 824, 307–315. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_15)
- Ninomiya-Tsuji, J., Kajino, T., Ono, K., Ohtomo, T., Matsumoto, M., Shiina, M., Mihara, M., Tsuchiya, M., & Matsumoto, K. (2003). A resorcylic acid lactone, 5Z-7-Oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18485–18490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207453200>
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., & Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I $\kappa$ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, 398(6724), 252–256. <https://doi.org/10.1038/18465>
- Noazin, S., Modabber, F., Khamesipour, A., Smith, P. G., Moulton, L. H., Nasser, K., Sharifi, I., Khalil, E. A. G., Bernal, I. D. V., Antunes, C. M. F., Kieny, M. P., & Tanner, M. (2008). First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. *Vaccine*, 26(52), 6759–6767. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.085>
- Nordic BioSite. (2019). *Zombie Fixable Viability Dyes - When It's a Matter of Life and Death*. <https://www.nordicbiosite.com/blog/zombie-fixable-viability-dyes-when-its-a-matter-of-life-and-death-2>
- Novais, F. O., & Scott, P. (2015). CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Seminars in Immunopathology*, 37(3), 251–259. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0475-7>
- Nylen, S., & Gautam, S. (2010). Immunological perspectives of leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 135–146. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62876>
- 
- O
- O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Caminschi, I., Miller, J. L., Anders, E. M., Wu, L., Lahoud, M. H., Henri, S., Scott, B., Hertzog, P., Tatarczuch, L., & Shortman, K. (2002). Mouse plasmacytoid cells. *Journal of Experimental Medicine*, 196(10), 1307–1319. <https://doi.org/10.1084/jem.20021031>
- O'Sullivan, B., & Thomas, R. (2003). Recent advances on the role of CD40 and dendritic cells in immunity and tolerance. *Current Opinion in Hematology*, 10(4), 272–278. <https://doi.org/10.1097/00062752-200307000-00004>
- Oancea, G., O'Mara, M. L., Bennett, W. F. D., Tieleman, D. P., Abele, R., & Tampé, R. (2009). Structural arrangement of the transmission interface in the antigen ABC transport complex TAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5551–5556. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811260106>
- Obonaga, R., Fernández, O. L., Valderrama, L., Rubiano, L. C., Castro, M. del M., Barrera, M. C., Gomez, M. A., & Gore Saravia, N. (2014). Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* subgenus *Viannia* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 144–152. <https://doi.org/10.1128/AAC.01023-13>
- Ochando, J. C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., Jessberger, R., Trinchieri, G., Lira, S. A., Randolph, G. J., & Bromberg, J. S. (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nature Immunology*, 7(6), 652–662. <https://doi.org/10.1038/ni1333>
- Oliveira, F., de Carvalho, A. M., & de Oliveira, C. I. (2013). Sand-fly saliva-*Leishmania*-man: The trigger trio. *Frontiers in Immunology*, 4(375), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00375>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Oliveira, S. R., Amaral, J. D., & Rodrigues, C. M. P. (2018). Mechanism and disease implications of necroptosis and neuronal inflammation. *Cell Death & Disease*, 9(9), 903. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0872-7>
- Olivier, M., Atayde, V. D., Isnard, A., Hassani, K., & Shio, M. T. (2012). *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and Infection*, 14(15), 1377–1389. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.014>
- Olivier, M., Brownsey, R. W., & Reiner, N. E. (1992). Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(16), 7481–7485. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7481>
- Oppenheim, R. W., Flavell, R. A., Vinsant, S., Prevette, D., Kuan, C.-Y., & Rakic, P. (2001). Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *The Journal of Neuroscience*, 21(13), 4752–4760. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-13-04752.2001>
- Orning, P., Weng, D., Starheim, K., Ratner, D., Best, Z., Lee, B., Brooks, A., Xia, S., Wu, H., Kelliher, M. A., Berger, S. B., Gough, P. J., Bertin, J., Proulx, M. M., Goguen, J. D., Kayagaki, N., Fitzgerald, K. A., & Lien, E. (2018). Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8–dependent cleavage of gasdermin D and cell death. *Science*, 362(6418), 1064–1069. <https://doi.org/10.1126/science.aau2818>
- Orth, K., Palmer, L. E., Bao, Z. Q., Stewart, S., Rudolph, A. E., Bliska, J. B., & Dixon, J. E. (1999). Inhibition of the mitogen-activated protein kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science*, 285(5435), 1920–1923. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1920>

## P

- Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69(S1), S10–S18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>
- Pacheco-Fernandez, T., Volpedo, G., Gannavaram, S., Bhattacharya, P., Dey, R., Satoskar, A., Matlashewski, G., & Nakhasi, H. L. (2021). Revival of leishmanization and leishmanin. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(639801), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.639801>
- Paludan, S. R., Reinert, L. S., & Hornung, V. (2019). DNA-stimulated cell death: implications for host defence, inflammatory diseases and cancer. *Nature Reviews Immunology*, 19(3), 141–153. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0117-0>
- Pallotta, M. T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Biccato, S., Mazza, E. M. C., Boon, L., Grassi, F., Fioretti, M. C., Fallarino, F., Puccetti, P., & Grohmann, U. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature Immunology*, 12(9), 870–878. <https://doi.org/10.1038/ni.2077>
- Pandey, R. K., Mehrotra, S., Sharma, S., Gudde, R. S., Sundar, S., & Shaha, C. (2016). *Leishmania donovani*-induced increase in macrophage Bcl-2 favors parasite survival. *Frontiers in Immunology*, 7(456), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00456>
- Pandey, S. C., Kumar, A., & Samant, M. (2020). Genetically modified live attenuated vaccine: A potential strategy to combat visceral leishmaniasis. In *Parasite Immunology* (Vol. 42, Issue 9, p. e12732). <https://doi.org/10.1111/pim.12732>
- Park, H.-H., Park, S.-Y., Mah, S., Park, J.-H., Hong, S.-S., Hong, S., & Kim, Y.-S. (2018). HS-1371, a novel kinase inhibitor of RIP3-mediated necroptosis. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(9), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0152-8>
- Patil, T., More, V., Rane, D., Mukherjee, A., Suresh, R., Patidar, A., Bodhale, N., Mosser, D., Dandapat, J., & Sarkar, A. (2018). Pro-inflammatory cytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) controls *Leishmania* infection. *Cytokine*, 112, 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.06.033>
- Pedrosa, F. D. A., & Ximenes, R. A. D. A. (2009). Sociodemographic and environmental risk factors for American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the State of Alagoas, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(2), 195–201. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.81.195>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Pemmaraju, N., Carter, B. Z., Bose, P., Jain, N., Kadia, T. M., Garcia-Manero, G., Bueso-Ramos, C. E., DiNardo, C. D., Bledsoe, S., Daver, N. G., Papat, U., Konopleva, M. Y., Zhou, L., Pierce, S., Estrov, Z. E., Borthakur, G. M., Ohanian, M., Qiao, W., Masarova, L., ... Verstovsek, S. (2021). Final results of a phase 2 clinical trial of LCL161, an oral SMAC mimetic for patients with myelofibrosis. *Blood Advances*, 5(16), 3163–3173. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003829>
- Pennock, N. D., White, J. T., Cross, E. W., Cheney, E. E., Tamburini, B. A., & Kedl, R. M. (2013). T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Advances in Physiology Education*, 37(4), 273–283. <https://doi.org/10.1152/advan.00066.2013>
- Peña-Blanco, A., & García-Sáez, A. J. (2018). Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS Journal*, 285(3), 416–431. <https://doi.org/10.1111/febs.14186>
- Pessenda, G., & Silva, J. S. (2020). Arginase and its mechanisms in *Leishmania* persistence. *Parasite Immunology*, 42(7), 1–33. <https://doi.org/10.1111/pim.12722>
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N., & Sacks, D. (2008). *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 321(5891). <https://doi.org/10.1126/science.1159194>
- Peterson, E. J., & Maltzman, J. S. (2019). T-cell activation and tolerance. In *Clinical Immunology* (pp. 183-196.e1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00012-0>
- Petrie, E. J., Czabotar, P. E., & Murphy, J. M. (2019). The structural basis of necroptotic cell death signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(1), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.11.002>
- Place, D. E., & Kanneganti, T.-D. (2018). Recent advances in inflammasome biology. *Current Opinion in Immunology*, 50, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.10.011>
- Poon, I. K. H., Lucas, C. D., Rossi, A. G., & Ravichandran, K. S. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 166–180. <https://doi.org/10.1038/nri3607>
- Prickett, S., Gray, P. M., Colpitts, S. L., Scott, P., Kaye, P. M., & Smith, D. F. (2006). *In vivo* recognition of ovalbumin expressed by transgenic *Leishmania* is determined by its subcellular localization. *The Journal of Immunology*, 176(8), 4826–4833. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.4826>
- Proietto, A. I., O'Keeffe, M., Gartlan, K., Wright, M. D., Shortman, K., Wu, L., & Lahoud, M. H. (2004). Differential production of inflammatory chemokines by murine dendritic cell subsets. *Immunobiology*, 209(1–2), 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2004.03.002>
- Proietto, A. I., van Dommelen, S., Zhou, P., Rizzitelli, A., D'Amico, A., Steptoe, R. J., Naik, S. H., Lahoud, M. H., Liu, Y., Zheng, P., Shortman, K., & Wu, L. (2008). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50), 19869–19874. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810268105>

## Q

---

- Qadoumi, M., Becker, I., Donhauser, N., Röllinghoff, M., & Bogdan, C. (2002). Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 70(8), 4638–4642. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4638-4642.2002>
- Qi, H., Popov, V., & Soong, L. (2001). *Leishmania amazonensis* - dendritic cell interactions *in vitro* and the priming of parasite-specific CD4+ T cells *in vivo*. *The Journal of Immunology*, 167(8), 4534–4542. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4534>
- Quentmeier, H., Geffers, R., Hauer, V., Nagel, S., Pommerenke, C., Uphoff, C. C., Zaborski, M., & Drexler, H. G. (2022). Inhibition of MCL1 induces apoptosis in anaplastic large cell lymphoma and in primary effusion lymphoma. *Scientific Reports*, 12(1085), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04916-6>

## R

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Radwanska, M., Cutler, A. J., Hoving, J. C., Magez, S., Holscher, C., Bohms, A., Arendse, B., Kirsch, R., Hunig, T., Alexander, J., Kaye, P., & Brombacher, F. (2007). Deletion of IL-4R $\alpha$  on CD4 T cells renders BALB/c mice resistant to *Leishmania major* infection. *PLoS Pathogens*, 3(5), e68. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030068>
- Rahman, M. M., & McFadden, G. (2011). Modulation of NF- $\kappa$ B signalling by microbial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 291–306. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2539>
- Rajagopala, S., Dutta, U., Chandra, K. S. P., Bhatia, P., Varma, N., & Kochhar, R. (2008). Visceral leishmaniasis associated hemophagocytic lymphohistiocytosis – Case report and systematic review. *Journal of Infection*, 56(5), 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.02.013>
- Ramakrishnan, V., Painuly, U., Kimlinger, T., Haug, J., Rajkumar, S. V., & Kumar, S. (2014). Inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in multiple myeloma. *Leukemia*, 28(7), 1519–1528. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.2>
- Raman, V. S., Duthie, M. S., Fox, C. B., Matlashewski, G., & Reed, S. G. (2012). Adjuvants for *Leishmania* vaccines: from models to clinical application. *Frontiers in Immunology*, 3(JUN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00144>
- Ramos, H. J., Davis, A. M., Cole, A. G., Schatzle, J. D., Forman, J., & Farrar, J. D. (2009). Reciprocal responsiveness to interleukin-12 and interferon- $\alpha$  specifies human CD8+ effector versus central memory T-cell fates. *Blood*, 113(22), 5516–5525. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-11-188458>
- Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., & Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell*, 15(1), 261–267. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90101-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90101-0)
- Raschke, W. C., Ralph, P., Watson, J., Sklar, M., & Coon, H. (1975). Brief communication: Oncogenic transformation of murine lymphoid cells by *in vitro* infection with Abelson Leukemia Virus. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 54(5), 1249–1253. <https://doi.org/10.1093/jnci/54.5.1249>
- Rathinam, V. A. K., & Fitzgerald, K. A. (2016). Inflammasome complexes: Emerging mechanisms and effector functions. *Cell*, 165(4), 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.046>
- Rauen, J., Kreer, C., Paillard, A., van Duikeren, S., Benckhuijsen, W. E., Camps, M. G., Valentijn, A. R. P. M., Ossendorp, F., Drijfhout, J. W., Arens, R., & Burgdorf, S. (2014). Enhanced cross-presentation and improved CD8+ T cell responses after mannosylation of synthetic long peptides in mice. *PLoS ONE*, 9(8), e103755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103755>
- Ready, P. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, 6(1), 147–154. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267>
- Real, F., Florentino, P. T. V., Reis, L. C., Ramos-Sanchez, E. M., Veras, P. S. T., Goto, H., & Mortara, R. A. (2014). Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cellular Microbiology*, 16(10), 1549–1564. <https://doi.org/10.1111/cmi.12311>
- Redeker, A., Welten, S. P. M., Baert, M. R. M., Vloemans, S. A., Tiemessen, M. M., Staal, F. J. T., & Arens, R. (2015). The quantity of autocrine IL-2 governs the expansion potential of CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*, 195(10), 4792–4801. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501083>
- Regli, I. B., Passelli, K., Hurrell, B. P., & Tacchini-Cottier, F. (2017). Survival mechanisms used by some *Leishmania* species to escape neutrophil killing. *Frontiers in Immunology*, 8(1558), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01558>
- Reiner, N. E., Ng, W., & McMaster, W. R. (1987). Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *The Journal of Immunology*, 138(6), 1926–1932. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.138.6.1926>
- Reis e Sousa, C. (2004). Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.11.007>
- Reizis, B. (2019). Plasmacytoid dendritic cells: Development, regulation, and function. *Immunity*, 50(1), 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.027>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Resende, M., Moreira, D., Augusto, J., Cunha, J., Neves, B., Cruz, M. T., Estaquier, J., Cordeiro-da-Silva, A., & Silvestre, R. (2013). *Leishmania*-infected MHC class IIhigh dendritic cells polarize CD4+ T cells toward a nonprotective T-bet+ IFN- $\gamma$ + IL-10+ phenotype. *The Journal of Immunology*, *191*(1), 262–273. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203518>
- Rezvan, H., Khodadadi, A., & Ali, S. (2014). CTL responses to DCs stimulated with *Leishmania* antigens detected by DCs expressing *Leishmania* gp63. *Iranian Journal of Immunology*, *11*(2), 65–73.
- Ribeiro-Gomes, F. L., & Sacks, D. (2012). The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *2*(59), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00059>
- Ribeiro-Gomes, F. L., Peters, N. C., Debrabant, A., & Sacks, D. L. (2012). Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* response. *PLoS Pathogens*, *8*(2), e1002536. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002536>
- Ribeiro-Gomes, F. L., Romano, A., Lee, S., Roffê, E., Peters, N. C., Debrabant, A., & Sacks, D. (2015). Apoptotic cell clearance of *Leishmania major*-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8+ T-cell priming *in vitro* by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. *Cell Death & Disease*, *6*(12), e2018–e2018. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.351>
- Riley, J. S., Quarato, G., Cloix, C., Lopez, J., O'Prey, J., Pearson, M., Chapman, J., Sesaki, H., Carlin, L. M., Passos, J. F., Wheeler, A. P., Oberst, A., Ryan, K. M., & Tait, S. W. (2018). Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. *The EMBO Journal*, *37*(17), e99238. <https://doi.org/10.15252/embj.201899238>
- Ritter, U., Lechner, A., Scharl, K., Kiafard, Z., Zwirner, J., & Körner, H. (2007). TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of *Leishmania major* infection. *Medical Microbiology and Immunology*, *197*(1), 29–37. <https://doi.org/10.1007/s00430-007-0056-z>
- Rivera-Fernández, I., Argueta-Donohué, J., Wilkins-Rodríguez, A. A., & Gutiérrez-Kobeh, L. (2019). Effect of two different isolates of *Leishmania mexicana* in the production of cytokines and phagocytosis by murine dendritic cells. *Journal of Parasitology*, *105*(2), 359–370. <https://doi.org/10.1645/17-158>
- Rivier, D., Shah, R., Bovay, P., & Mauel, J. (1993). Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. *Parasite Immunology*, *15*(2), 75–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1993.tb00587.x>
- Rizzitelli, A., Hawkins, E., Todd, H., Hodgkin, P. D., & Shortman, K. (2006). The proliferative response of CD4 T cells to steady-state CD8+ dendritic cells is restricted by post-activation death. *International Immunology*, *18*(3), 415–423. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh382>
- Roatt, B. M., de Oliveira Cardoso, J. M., De Brito, R. C. F., Coura-Vital, W., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., & Reis, A. B. (2020). Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(21), 8965–8977. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w>
- Rock, K. L., & Shen, L. (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunological Reviews*, *207*(1), 166–183. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00301.x>
- Rodrigues, V., Cordeiro-Da-Silva, A., Laforge, M., Silvestre, R., & Estaquier, J. (2016). Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasites and Vectors*, *9*(118), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1412-x>
- Rogers, C., Fernandes-Alnemri, T., Mayes, L., Alnemri, D., Cingolani, G., & Alnemri, E. S. (2017). Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nature Communications*, *8*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms14128>
- Rogers, M., Kropf, P., Choi, B.-S., Dillon, R., Podinovskaia, M., Bates, P., & Müller, I. (2009). Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathogens*, 5(8), e1000555. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000555>
- Rongvaux, A., Jackson, R., Harman, C. C. D., Li, T., West, A. P., de Zoete, M. R., Wu, Y., Yordy, B., Lakhani, S. A., Kuan, C.-Y., Taniguchi, T., Shadel, G. S., Chen, Z. J., Iwasaki, A., & Flavell, R. A. (2014). Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell*, 159(7), 1563–1577. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.037>
- Rosado, F. G. N., & Kim, A. S. (2013). Hemophagocytic lymphohistiocytosis. *American Journal of Clinical Pathology*, 139(6), 713–727. <https://doi.org/10.1309/AJCP4ZDKJ4ICOUAT>
- Rosazza, T., Lecoeur, H., Blisnick, T., Moya-Nilges, M., Pescher, P., Bastin, P., Prina, E., & Späth, G. F. (2020). Dynamic imaging reveals surface exposure of virulent *Leishmania* amastigotes during pyroptosis of infected macrophages. *Journal of Cell Science*, 134(5), 1–7. <https://doi.org/10.1242/jcs.242776>
- Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11), 665–680. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3>
- Rossi, M., & Fasel, N. (2018). How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *International Immunology*, 30(3), 103–111. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx075>
- Roy, K., Mandloi, S., Chakrabarti, S., & Roy, S. (2016). Cholesterol corrects altered conformation of MHC-II protein in *Leishmania donovani* infected macrophages: Implication in therapy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(5), e0004710. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004710>
- Ruddock, L. W., & Molinari, M. (2006). N-glycan processing in ER quality control. *Journal of Cell Science*, 119(21), 4373–4380. <https://doi.org/10.1242/jcs.03225>
- Rühl, S., & Broz, P. (2015). Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K<sup>+</sup> efflux. *European Journal of Immunology*, 45(10), 2927–2936. <https://doi.org/10.1002/eji.201545772>
- Ruhland, A., & Kima, P. E. (2009). Activation of PI3K/Akt signaling has a dominant negative effect on IL-12 production by macrophages infected with *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Experimental Parasitology*, 122(1), 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.12.010>
- Ruhland, A., Leal, N., & Kima, P. E. (2007). *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cellular Microbiology*, 9(1), 84–96. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00769.x>
- Ruiz, J. H., & Becker, I. (2007). CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 29(12), 671–678. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00991.x>

## S

- Sacramento, L. A., da Costa, J. L., de Lima, M. H. F., Sampaio, P. A., Almeida, R. P., Cunha, F. Q., Silva, J. S., & Carregaro, V. (2017). Toll-like receptor 2 is required for inflammatory process development during *Leishmania infantum* infection. *Frontiers in Microbiology*, 8(262), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00262>
- Sacramento, L., Trevelin, S. C., Nascimento, M. S., Lima-Júnior, D. S., Costa, D. L., Almeida, R. P., Cunha, F. Q., Silva, J. S., & Carregaro, V. (2015). Toll-like receptor 9 signaling in dendritic cells regulates neutrophil recruitment to inflammatory foci following *Leishmania infantum* infection. *Infection and Immunity*, 83(12), 4604–4616. <https://doi.org/10.1128/IAI.00975-15>
- Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T., & Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*, 5(2), 103–114. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80487-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80487-2)
- Sadiq, B. A., Mantel, I., & Blander, J. M. (2020). A comprehensive experimental guide to studying cross-presentation in dendritic cells *in vitro*. *Current Protocols in Immunology*, 131(1), 1–41. <https://doi.org/10.1002/cpim.115>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Safavi, M., Eshaghi, H., & Hajihassani, Z. (2021). Visceral leishmaniasis: Kala-azar. *Diagnostic Cytopathology*, 49(3), 446–448. <https://doi.org/10.1002/dc.24671>
- Saha, A., Basu, M., & Ukil, A. (2018). Recent advances in understanding *Leishmania donovani* infection: The importance of diverse host regulatory pathways. *IUBMB Life*, 70(7), 593–601. <https://doi.org/10.1002/iub.1759>
- Saha, G., Chiranjivi, A. K., Khamar, B. M., Prerna, K., Kumar, M., & Dubey, V. K. (2020). BLIMP-1 mediated downregulation of TAK1 and p53 molecules is crucial in the pathogenesis of Kala-azar. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(594431), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.594431>
- Saha, G., Khamar, B. M., Singh, O. P., Sundar, S., & Dubey, V. K. (2019). *Leishmania donovani* evades caspase 1 dependent host defense mechanism during infection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.185>
- Saint-Pierre-Chazalet, M., Ben Brahim, M., Le Moyec, L., Bories, C., Rakotomanga, M., & Loiseau, P. M. (2009). Membrane sterol depletion impairs miltefosine action in wild-type and miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(5), 993–1001. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp321>
- Saljoughian, N., Taheri, T., & Rafati, S. (2014). Live vaccination tactics: Possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 5(134), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00134>
- Saljoughian, N., Taheri, T., Zahedifard, F., Taslimi, Y., Doustdari, F., Bolhassani, A., Doroud, D., Azizi, H., Heidari, K., Vasei, M., Namvar Asl, N., Papadopoulou, B., & Rafati, S. (2013). Development of novel prime-boost strategies based on a tri-gene fusion recombinant *L. tarentolae* vaccine against experimental murine visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4), e2174. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002174>
- Samraj, A. K., Keil, E., Ueffing, N., Schulze-Osthoff, K., & Schmitz, I. (2006). Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 29652–29659. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603487200>
- Sancho, D., Joffre, O. P., Keller, A. M., Rogers, N. C., Martínez, D., Hernanz-Falcón, P., Rosewell, I., & Sousa, C. R. e. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature*, 458(7240), 899–903. <https://doi.org/10.1038/nature07750>
- Sancho, D., Mourão-Sá, D., Joffre, O. P., Schulz, O., Rogers, N. C., Pennington, D. J., Carlyle, J. R., & Reis e Sousa, C. (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 2098–2110. <https://doi.org/10.1172/JCI34584>
- Sanquin. (2021). *Proliferation assay - flow cytometry*. <https://www.sanquin.org/products-and-services/immunomonitoring-services/clinical-immunomonitoring/assays/proliferation-assay--flow-cytometry>
- Sansom, D. M. (2000). CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology*, 101(2), 169–177. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00121.x>
- Sarantis, H., & Grinstein, S. (2012). Subversion of phagocytosis for pathogen survival. *Cell Host & Microbe*, 12(4), 419–431. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.001>
- Sarhan, J., Liu, B. C., Muendlein, H. I., Li, P., Nilson, R., Tang, A. Y., Rongvaux, A., Bunnell, S. C., Shao, F., Green, D. R., & Poltorak, A. (2018). Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during *Yersinia* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(46), E10888–E10897. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809548115>
- Sarhan, J., Liu, B. C., Muendlein, H. I., Weindel, C. G., Smirnova, I., Tang, A. Y., Ilyukha, V., Sorokin, M., Buzdin, A., Fitzgerald, K. A., & Poltorak, A. (2019). Constitutive interferon signaling maintains critical threshold of MLKL expression to license necroptosis. *Cell Death & Differentiation*, 26(2), 332–347. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0122-7>
- Sarkar, A., Aga, E., Bussmeyer, U., Bhattacharyya, A., Möller, S., Hellberg, L., Behnen, M., Solbach, W., & Laskay, T. (2013). Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. *Medical Microbiology and Immunology*, 202(1), 25–35. <https://doi.org/10.1007/s00430-012-0246-1>
- Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Leishmaniasis: where are we and where are we heading? *Parasitology Research*, 120(5), 1541–1554. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07139-2>
- Sathe, P., Vremec, D., Wu, L., Corcoran, L., & Shortman, K. (2013). Convergent differentiation: myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 121(1), 11–19. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-413336>
- Saveanu, L., Carroll, O., Weimershaus, M., Guermonprez, P., Firat, E., Lindo, V., Greer, F., Davoust, J., Kratzer, R., Keller, S. R., Niedermann, G., & van Endert, P. (2009). IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science*, 325(5937), 213–217. <https://doi.org/10.1126/science.1172845>
- Sborgi, L., Rühl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., Farady, C. J., Müller, D. J., Broz, P., & Hiller, S. (2016). GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *The EMBO Journal*, 35(16), 1766–1778. <https://doi.org/10.15252/embj.201694696>
- Scaife, H., Woldehiwet, Z., Hart, C. A., & Edwards, S. W. (2003). *Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis *in vivo*. *Infection and Immunity*, 71(4), 1995–2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.1995-2001.2003>
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., & Cassatella, M. A. (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews*, 177(1), 195–203. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2000.17706.x>
- Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J.-F., Meresse, S., Descoteaux, A., & Desjardins, M. (1999). Impaired recruitment of the small GTPase Rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cellular Microbiology*, 1(1), 19–32. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.1999.00002.x>
- Schafer, P. H., Pierce, S. K., & Jardetzky, T. S. (1995). The structure of MHC class II: a role for dimer of dimers. *Seminars in Immunology*, 7(6), 389–398. <https://doi.org/10.1006/smim.1995.0043>
- Schesser, K., Spiik, A.-K., Dukuzumuremyi, J.-M., Neurath, M. F., Pettersson, S., & Wolf-Watz, H. (1998). The yopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Molecular Microbiology*, 28(6), 1067–1079. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00851.x>
- Schleicher, U., Haeberlein, S., Sebald, H., & Bogdan, C. (2009). Activation of NK cells *in vivo* following *Leishmania* infection requires myeloid dendritic cells, TLR9 and a unique set of cytokines. *Cytokine*, 48(1–2), 13–14. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.07.057>
- Schleicher, U., Liese, J., Knippertz, I., Kurzmann, C., Hesse, A., Heit, A., Fischer, J. A. A., Weiss, S., Kalinke, U., Kunz, S., & Bogdan, C. (2007). NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *Journal of Experimental Medicine*, 204(4), 893–906. <https://doi.org/10.1084/jem.20061293>
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A. W. S., See, P., Shin, A., Wasan, P. S., Hoeffel, G., Malleret, B., Heiseke, A., Chew, S., Jardine, L., Purvis, H. A., Hilkens, C. M. U., Tam, J., Poidinger, M., ... Ginhoux, F. (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity*, 38(5), 970–983. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.011>
- Schmid, M. A., Kingston, D., Boddupalli, S., & Manz, M. G. (2010). Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunological Reviews*, 234(1), 32–44. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00877.x>
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Mizrachi, I. (2020, January 1). *NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database*. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Schulz, O., & Reis e Sousa, C. (2002). Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology*, *107*(2), 183–189. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01513.x>
- Séguin, O., & Descoteaux, A. (2016). *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. *Cellular Immunology*, *309*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.08.004>
- Segura, E., & Villadangos, J. A. (2009). Antigen presentation by dendritic cells *in vivo*. *Current Opinion in Immunology*, *21*(1), 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.03.011>
- Semini, G., Paape, D., Paterou, A., Schroeder, J., Barrios-Llerena, M., & Aebischer, T. (2017). Changes to cholesterol trafficking in macrophages by *Leishmania* parasites infection. *MicrobiologyOpen*, *6*(4), e00469. <https://doi.org/10.1002/mbo3.469>
- Seo, J., Nam, Y. W., Kim, S., Oh, D.-B., & Song, J. (2021). Necroptosis molecular mechanisms: Recent findings regarding novel necroptosis regulators. *Experimental & Molecular Medicine*, *53*(6), 1007–1017. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00634-7>
- Seo, J., Seong, D., Nam, Y. W., Hwang, C. H., Lee, S. R., Lee, C.-S., Jin, Y., Lee, H.-W., Oh, D.-B., Vandenabeele, P., & Song, J. (2020). Beclin 1 functions as a negative modulator of MLKL oligomerisation by integrating into the necrosome complex. *Cell Death & Differentiation*, *27*(11), 3065–3081. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0561-9>
- Sette, A., Ceman, S., Kubo, R. T., Sakaguchi, K., Appella, E., Hunt, D. F., Davis, T. A., Michel, H., Shabanowitz, J., Grey, H. M., DeMars, R., & Rudersdorf, R. (1992). Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant. *Science*, *258*(5089), 1801–1804. <https://doi.org/10.1126/science.1465617>
- Shakya, N., Sane, S. A., Vishwakarma, P., & Gupta, S. (2012). Enhancement in therapeutic efficacy of miltefosine in combination with synthetic bacterial lipopeptide, Pam3Cys against experimental Visceral Leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, *131*(3), 377–382. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.05.007>
- Sharma, U., & Singh, S. (2009). Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology*, *47*(6), 412–423.
- Shcherbakova, D. M., & Verkhusha, V. V. (2013). Near-infrared fluorescent proteins for multicolor *in vivo* imaging. *Nature Methods*, *10*(8), 751–754. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2521>
- Shi, J., Gao, W., & Shao, F. (2017). Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends in Biochemical Sciences*, *42*(4), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.10.004>
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., & Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, *526*(7575), 660–665. <https://doi.org/10.1038/nature15514>
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., & Shao, F. (2014). Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*, *514*(7521), 187–192. <https://doi.org/10.1038/nature13683>
- Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V. K., Wolf, A. J., Vergnes, L., Ojcius, D. M., Rentsendorj, A., Vargas, M., Guerrero, C., Wang, Y., Fitzgerald, K. A., Underhill, D. M., Town, T., & Arditi, M. (2012). Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*, *36*(3), 401–414. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2012.01.009>
- Shimoda, M., Tran, K. A., & Toda, M. (2023). Cellular factors. In *Atopic Dermatitis: Inside Out Or Outside in* (pp. 134–145). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-84744-5.00014-0>
- Shin, S., & Roy, C. R. (2008). Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology*, *10*(6), 1209–1220. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01145.x>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Shio, M. T., Christian, J. G., Jung, J. Y., Chang, K.-P., & Olivier, M. (2015). PKC/ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation is attenuated by *Leishmania* zinc-metalloprotease during infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(6), e0003868. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003868>
- Shortman, K., & Heath, W. R. (2010). The CD8+ dendritic cell subset. *Immunological Reviews*, 234(1), 18–31. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00870.x>
- Sica, A., Wang, J. M., Colotta, F., Dejana, E., Mantovani, A., Oppenheim, J. J., Larsen, C. G., Zachariae, C. O., & Matsushima, K. (1990). Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *The Journal of Immunology*, 144(8), 3034–3038. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.144.8.3034>
- Silvestre, R., Cordeiro-Da-Silva, A., Santarém, N., Vergnes, B., Sereno, D., & Ouaiissi, A. (2007). SIR2-deficient *Leishmania infantum* induces a defined IFN- $\gamma$ /IL-10 pattern that correlates with protection. *The Journal of Immunology*, 179(5), 3161–3170. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3161>
- Singh, A. K., Haque, M., O'Sullivan, K., Chourasia, M., Ouseph, M. M., & Ahmed, S. (2021). Suppression of monosodium urate crystal-induced inflammation by inhibiting TGF- $\beta$ -activated kinase 1-dependent signaling: role of the ubiquitin proteasome system. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(1), 162–170. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0284-3>
- Siu, K. T., Huang, C., Panaroni, C., Mukaihara, K., Fulzele, K., Soucy, R., Thorburn, C., Cidado, J., Drew, L., Chattopadhyay, S., & Raje, N. (2019). BCL2 blockade overcomes MCL1 resistance in multiple myeloma. *Leukemia*, 33(8), 2098–2102. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0421-0>
- Skinner, J., Yankey, B., & Shelton, B. K. (2019). Hemophagocytic lymphohistiocytosis. *AACN Advanced Critical Care*, 30(2), 151–164. <https://doi.org/10.4037/aacnacc2019463>
- Smith, R. E., Bissell, E. R., Mitchell, A. R., & Pearson, K. W. (1980). Direct photometric or fluorometric assay of proteinases using substrates containing 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin. *Thrombosis Research*, 17(3–4), 393–402. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(80\)90074-2](https://doi.org/10.1016/0049-3848(80)90074-2)
- Sommer, F., Meixner, M., Mannherz, M., Ogilvie, A. L., Rollinghoff, M., & Lohoff, M. (1998). Analysis of cytokine patterns produced by individual CD4+ lymph node cells during experimental murine leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *International Immunology*, 10(12), 1853–1861. <https://doi.org/10.1093/intimm/10.12.1853>
- Song, G., Ouyang, G., & Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(1), 59–71. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x>
- Spencer, S. L., Gaudet, S., Albeck, J. G., Burke, J. M., & Sorger, P. K. (2009). Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature*, 459(7245), 428–432. <https://doi.org/10.1038/nature08012>
- Srivastav, S., Kar, S., Chande, A. G., Mukhopadhyaya, R., & Das, P. K. (2012). *Leishmania donovani* exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response. *The Journal of Immunology*, 189(2), 924–934. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102845>
- Srivastava, G. K., & de Larrea, G. Z. L. (2008). UVB-induced murine bone marrow derived macrophages and apoptosis. *Immunological Investigations*, 37(4), 293–313. <https://doi.org/10.1080/08820130802083689>
- Srivastava, S., Mishra, J., Gupta, A. K., Singh, A., Shankar, P., & Singh, S. (2017). Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasites & Vectors*, 10(49), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-1969-z>
- Srivastava, S., Pandey, S. P., Jha, M. K., Chandel, H. S., & Saha, B. (2013). *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clinical and Experimental Immunology*, 172(3), 403–409. <https://doi.org/10.1111/cei.12074>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Srivastava, S., Shankar, P., Mishra, J., & Singh, S. (2016). Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 9(277), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1553-y>
- Stäger, S., & Rafati, S. (2012). CD8+ T Cells in *Leishmania* Infections: Friends or Foes? *Frontiers in Immunology*, 3(5), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00005>
- Steinman, R. M., & Witmer, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(10), 5132–5136. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.10.5132>
- Stewart, D., Fulton, W. B., Wilson, C., Monitto, C. L., Paidas, C. N., Reeves, R. H., & De Maio, A. (2002). Genetic contribution to the septic response in a mouse model. *Shock*, 18(4), 342–347. <https://doi.org/10.1097/00024382-200210000-00009>
- Stow, J. L., Manderson, A. P., & Murray, R. Z. (2006). SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 6(12), 919–929. <https://doi.org/10.1038/nri1980>
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., & Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 481(7381), 278–286. <https://doi.org/10.1038/nature10759>
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., & Wang, X. (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148(1–2), 213–227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.031>
- Sundar, S., & Chakravarty, J. (2008). Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(5), 787–794. <https://doi.org/10.1517/13543784.17.5.787>
- Sundar, S., & Chakravarty, J. (2015). An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. In *Expert Opinion on Pharmacotherapy* (Vol. 16, Issue 2, pp. 237–252). <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.973850>
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Sinha, P. K., & Bhattacharya, S. K. (2007a). Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *New England Journal of Medicine*, 356(25), 2571–2581. <https://doi.org/10.1056/nejmoa066536>
- Sundar, S., Mehta, H., Suresh, A. V., Singh, S. P., Rai, M., & Murray, H. W. (2007b). Amphotericin B treatment for indian visceral leishmaniasis: Conventional versus lipid formulations. *Clinical Infectious Diseases*, 38(3), 1–7. <https://doi.org/10.1086/380971>
- Sundquist, M., Rydström, A., & Wick, M. J. (2004). Immunity to *Salmonella* from a dendritic point of view. *Cellular Microbiology*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00336.x>
- Sung, S.-S. J., Fu, S. M., Rose, C. E., Gaskin, F., Ju, S.-T., & Beaty, S. R. (2006). A major lung CD103 (αE)-β7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *The Journal of Immunology*, 176(9), 5683–5683. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5683>
- Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G. S., Millar, D. G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., Penninger, J. M., Wesche, H., Ohashi, P. S., Mak, T. W., & Yeh, W.-C. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature*, 416(6882), 750–754. <https://doi.org/10.1038/nature736>
- Swiecki, M., & Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 471–485. <https://doi.org/10.1038/nri3865>
- Swihart, K., Fruth, U., Messmer, N., Hug, K., Behin, R., Huang, S., Del Giudice, G., Aguet, M., & Louis, J. A. (1995). Mice from a genetically resistant background lacking the interferon γ receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *Journal of Experimental Medicine*, 181(3), 961–971. <https://doi.org/10.1084/jem.181.3.961>

T

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Taheri, T., Seyed, N., Mizbani, A., & Rafati, S. (2016). *Leishmania*-based expression systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(17), 7377–7385. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7712-4>
- Tait, S. W. G., Parsons, M. J., Llambi, F., Bouchier-Hayes, L., Connell, S., Muñoz-Pinedo, C., & Green, D. R. (2010). Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Developmental Cell*, *18*(5), 802–813. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.03.014>
- Takeda, K., & Akira, S. (2004). Microbial recognition by Toll-like receptors. *Journal of Dermatological Science*, *34*(2), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2003.10.002>
- Tam, E. M., Fulton, R. B., Sampson, J. F., Muda, M., Camblin, A., Richards, J., Koshkaryev, A., Tang, J., Kurella, V., Jiao, Y., Xu, L., Zhang, K., Kohli, N., Luus, L., Hutto, E., Kumar, S., Lulo, J., Paragas, V., Wong, C., ... Raue, A. (2019). Antibody-mediated targeting of TNFR2 activates CD8+ T cells in mice and promotes antitumor immunity. *Science Translational Medicine*, *11*(512). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax0720>
- Tamaki, H., Harashima, N., Hiraki, M., Arichi, N., Nishimura, N., Shiina, H., Naora, K., & Harada, M. (2014). Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostate cancer cells to docetaxel and promotes unexpected apoptosis under caspase-9 inhibition. *Oncotarget*, *5*(22), 11399–11412. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2550>
- Tang, D., Lahti, J. M., Grenet, J., & Kidd, V. J. (1999). Cycloheximide-induced T-cell Death Is Mediated by a Fas-associated Death Domain-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(11), 7245–7252. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.7245>
- Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P., & Bottomly, K. (1997). Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. *The Journal of Immunology*, *159*(12), 5956–5963. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.159.12.5956>
- Tecchio, C., Micheletti, A., & Cassatella, M. A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. *Frontiers in Immunology*, *5*(508), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00508>
- Tempany, J. C., Zhou, J. H., Hodgkin, P. D., & Bryant, V. L. (2018). Superior properties of CellTrace Yellow™ as a division tracking dye for human and murine lymphocytes. *Immunology and Cell Biology*, *96*(2), 149–159. <https://doi.org/10.1111/imcb.1020>
- Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K., & Meier, P. (2011). The ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Molecular Cell*, *43*(3), 432–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.006>
- Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2008). Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death & Differentiation*, *15*(1), 3–12. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402269>
- Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cellular Signalling*, *16*(2), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2003.08.007>
- Tian, A., Wilson, G. S., Lie, S., Wu, G., Hu, Z., Hebbard, L., Duan, W., George, J., & Qiao, L. (2014). Synergistic effects of IAP inhibitor LCL161 and paclitaxel on hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters*, *351*(2), 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.06.006>
- Tibúrcio, R., Nunes, S., Nunes, I., Rosa Ampuero, M., Silva, I. B., Lima, R., Machado Tavares, N., & Brodskyn, C. (2019a). Molecular aspects of dendritic cell activation in leishmaniasis: An immunobiological view. *Frontiers in Immunology*, *10*(227), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00227>
- Titus, R. G., Gueiros-Filho, F. J., de Freitas, L. A., & Beverley, S. M. (1995). Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(22), 10267–10271. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10267>
- Toda, C., & Diano, S. (2014). Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *28*(5), 757–764. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.02.006>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Tomiotto-Pellissier, F., Bortoleti, B. T. da S., Assolini, J. P., Gonçalves, M. D., Carloto, A. C. M., Miranda-Sapla, M. M., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., & Pavanelli, W. R. (2018). Macrophage polarization in leishmaniasis: Broadening horizons. *Frontiers in Immunology*, 9(2529), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02529>
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: A review. *F1000Research*, 6(750), 1–15. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
- Tribioscience. (2019). *LDH Cytotoxicity Assay*. <https://tribioscience.com/ldh-cytotoxicity-assay/>
- Trickett, A., & Kwan, Y. L. (2003). T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods*, 275(1–2), 251–255. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00010-3)
- Tron, A. E., Belmonte, M. A., Adam, A., Aquila, B. M., Boise, L. H., Chiarparin, E., Cidado, J., Embrey, K. J., Gangl, E., Gibbons, F. D., Gregory, G. P., Hargreaves, D., Hendricks, J. A., Johannes, J. W., Johnstone, R. W., Kazmirski, S. L., Kettle, J. G., Lamb, M. L., Matulis, S. M., ... Hird, A. W. (2018). Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Nature Communications*, 9(5341), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07551-w>
- Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E. F., Marsh, K. C., Mitten, M. J., Nimmer, P., Roberts, L., Tahir, S. K., Xiao, Y., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S., Rosenberg, S. H., & Elmore, S. W. (2008). ABT-263: A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Research*, 68(9), 3421–3428. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5836>

## U

---

- Upchurch, K. C., Boquín, J. R., Yin, W., Xue, Y., Joo, H., Kane, R. R., & Oh, S. (2015). New TLR7 agonists with improved humoral and cellular immune responses. *Immunology Letters*, 168(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.09.007>

## V

---

- Vacchina, P., & Morales, M. A. (2014). *In vitro* screening test using *Leishmania* promastigotes stably expressing mCherry protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3), 1825–1828. <https://doi.org/10.1128/AAC.02224-13>
- Valdés-Reyes, L., Argueta, J., Morán, J., Salaiza, N., Hernández, J., Berzunza, M., Aguirre-García, M., Becker, I., & Gutiérrez-Kobeh, L. (2009). *Leishmania mexicana*: Inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Experimental Parasitology*, 121(3), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.10.020>
- van Engeland, M., Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. M. (1998). Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1), 1–9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980101\)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980101)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R)
- Van Gorp, H., & Lamkanfi, M. (2019). The emerging roles of inflammasome-dependent cytokines in cancer development. *EMBO Reports*, 20(6), e47575. <https://doi.org/10.15252/embr.201847575>
- van Griensven, J., & Diro, E. (2019). Visceral leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1), 79–99. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>
- van Griensven, J., Gadisa, E., Aseffa, A., Hailu, A., Beshah, A. M., & Diro, E. (2016). Treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania aethiopica*: A Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004495. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004495>
- Van Noorden, C. J. F. (2001). The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochemica*, 103(3), 241–251. <https://doi.org/10.1078/0065-1281-00601>
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., & Laskay, T. (2004). Cutting edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *The Journal of Immunology*, 173(11), 6521–6525. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6521>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Vanaerschot, M., Dumetz, F., Roy, S., Ponte-Sucre, A., Arevalo, J., & Dujardin, J.-C. (2014). Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12(8), 937–946. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.916614>
- Vannier-Santos, M., Martiny, A., & Souza, W. (2002). Cell biology of *Leishmania* spp.: Invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), 297–318. <https://doi.org/10.2174/1381612023396230>
- Varela M, R. E., Lorena Muñoz, D., Robledo, S. M., Kolli, B. K., Dutta, S., Chang, K. P., & Muskus, C. (2009). *Leishmania (Viannia) panamensis*: An *in vitro* assay using the expression of GFP for screening of antileishmanial drug. *Experimental Parasitology*, 122(2), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.012>
- Varma, N., & Naseem, S. (2010). Hematologic changes in visceral leishmaniasis/Kala Azar. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 26(3), 78–82. <https://doi.org/10.1007/s12288-010-0027-1>
- Vélez, I. D., del Pilar Agudelo, S., Arbelaez, M. P., Gilchrist, K., Robledo, S. M., Puerta, J. A., Zicker, F., Berman, J., & Modabber, F. (2000). Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania (L.) amazonensis* vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(6), 698–703. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90239-6](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90239-6)
- Verdon, D. J., Mulazzani, M., & Jenkins, M. R. (2020). Cellular and molecular mechanisms of CD8+ T cell differentiation, dysfunction and exhaustion. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 19, pp. 1–28). <https://doi.org/10.3390/ijms21197357>
- Verma, J. K., Rastogi, R., & Mukhopadhyay, A. (2017). *Leishmania donovani* resides in modified early endosomes by upregulating Rab5a expression via the downregulation of miR-494. *PLOS Pathogens*, 13(6), e1006459. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006459>
- Verma, N. K., & Dey, C. S. (2004). Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8), 3010–3015. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3010-3015.2004>
- Vince, J. E., De Nardo, D., Gao, W., Vince, A. J., Hall, C., McArthur, K., Simpson, D., Vijayaraj, S., Lindqvist, L. M., Bouillet, P., Rizzacasa, M. A., Man, S. M., Silke, J., Masters, S. L., Lessene, G., Huang, D. C. S., Gray, D. H. D., Kile, B. T., Shao, F., & Lawlor, K. E. (2018). The mitochondrial apoptotic effectors BAX/BAK activate caspase-3 and -7 to trigger NLRP3 inflammasome and Caspase-8 driven IL-1 $\beta$  activation. *Cell Reports*, 25(9), 2339–2353. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.103>
- Vince, J. E., Wong, W. W.-L., Gentle, I., Lawlor, K. E., Allam, R., O'Reilly, L., Mason, K., Gross, O., Ma, S., Guarda, G., Anderton, H., Castillo, R., Häcker, G., Silke, J., & Tschopp, J. (2012). Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity*, 36(2), 215–227. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.012>
- Vinet, A. F., Fukuda, M., Turco, S. J., & Descoteaux, A. (2009). The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS Pathogens*, 5(10), e1000628. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000628>
- Volpedo, G., Huston, R. H., Holcomb, E. A., Pacheco-Fernandez, T., Gannavaram, S., Bhattacharya, P., Nakhasi, H. L., & Satoskar, A. R. (2021). From infection to vaccination: reviewing the global burden, history of vaccine development, and recurring challenges in global leishmaniasis protection. *Expert Review of Vaccines*, 20(11), 1431–1446. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1969231>
- von der Weid, T., Beebe, A. M., Roopenian, D. C., & Coffman, R. L. (1996). Early production of IL-4 and induction of Th2 responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4+NK1.1- T cell population. *The Journal of Immunology*, 157(10), 4421–4427. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.157.10.4421>
- von Stebut, E., & Udey, M. C. (2004). Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes and Infection*, 6(12), 1102–1109. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.05.024>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- von Stebut, E., Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D. L., & Udey, M. C. (1998). Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: Implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *Journal of Experimental Medicine*, *188*(8), 1547–1552. <https://doi.org/10.1084/jem.188.8.1547>
- von Stebut, E., Ehrchen, J. M., Belkaid, Y., Kostka, S. L., Mölle, K., Knop, J., Sunderkötter, C., & Udey, M. C. (2003). Interleukin 1 $\alpha$  promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *Journal of Experimental Medicine*, *198*(2), 191–199. <https://doi.org/10.1084/jem.20030159>
- Voronov, E., Dotan, S., Gayvoronsky, L., White, R. M., Cohen, I., Krelin, Y., Benchetrit, F., Elkabets, M., Huszar, M., El-On, J., & Apte, R. N. (2010). IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *International Immunology*, *22*(4), 245–257. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq006>
- Voth, D. E., Howe, D., & Heinzen, R. A. (2007). *Coxiella burnetii* inhibits apoptosis in human THP-1 cells and monkey primary alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, *75*(9), 4263–4271. <https://doi.org/10.1128/IAI.00594-07>
- Voytik-Harbin, S. L., Brightman, A. O., Waisner, B., Lamar, C. H., & Badylak, S. F. (1998). Application and evaluation of the alamarBlue assay for cell growth and survival of fibroblasts. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, *34*(3), 239–246. <https://doi.org/10.1007/s11626-998-0130-x>
- Vremec, D., Lieschke, G. J., Dunn, A. R., Robb, L., Metcalf, D., & Shortman, K. (1997). The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *European Journal of Immunology*, *27*(1), 40–44. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270107>
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., & Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *The Journal of Immunology*, *164*(6), 2978–2986. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.6.2978>

## W

- Wajant, H., & Siegmund, D. (2019). TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death balance of macrophages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *7*(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00091>
- Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobé, G. C., & Kerr, J. F. (1988). Patterns of cell death. In *Methods and achievements in experimental pathology* (Vol. 13, pp. 18–54).
- Walker, P. S., Scharton-Kersten, T., Rowton, E. D., Hengge, U., Boulloc, A., Udey, M. C., & Vogel, J. C. (1998). Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper t cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. *Human Gene Therapy*, *9*(13), 1899–1907. <https://doi.org/10.1089/hum.1998.9.13-1899>
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R. M., Bhutta, Z. A., Carter, A., Casey, D. C., Charlson, F. J., Chen, A. Z., Coates, M. M., Coggeshall, M., Dandona, L., Dicker, D. J., Erskine, H. E., Ferrari, A. J., Fitzmaurice, C., Foreman, K., Forouzanfar, M. H., Fraser, M. S., ... Murray, C. J. L. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, *388*(10053), 1459–1544. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31012-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31012-1)
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L.-F., Wang, F.-S., & Wang, X. (2014). Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Molecular Cell*, *54*(1), 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.003>
- Wang, J.-S., Wu, D., Huang, D.-Y., & Lin, W.-W. (2015). TAK1 inhibition-induced RIP1-dependent apoptosis in murine macrophages relies on constitutive TNF- $\alpha$  signaling and ROS production. *Journal of Biomedical Science*, *22*(76), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0182-7>
- Wang, W., Marinis, J. M., Beal, A. M., Savadkar, S., Wu, Y., Khan, M., Taunk, P. S., Wu, N., Su, W., Wu, J., Ahsan, A., Kurz, E., Chen, T., Yaboh, I., Li, F., Gutierrez, J., Diskin, B., Hundeyin, M., Reilly, M., ... Miller, G. (2018). RIP1 kinase drives macrophage-mediated adaptive immune tolerance in pancreatic cancer. *Cancer Cell*, *34*(5), 757–774. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.006>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Wang, Y., Gao, W., Shi, X., Ding, J., Liu, W., He, H., Wang, K., & Shao, F. (2017). Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, *547*(7661), 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature22393>
- Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jèze, G., Guermonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., & Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nature Immunology*, *9*(6), 676–683. <https://doi.org/10.1038/ni.1615>
- Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K., & Matsukawa, A. (2004). Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*, *22*(5), 460–466. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000142249.08135.e9>
- Watts, C. (2004). The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nature Immunology*, *5*(7), 685–692. <https://doi.org/10.1038/ni1088>
- Weidmann, E., Brieger, J., Jahn, B., Hoelzer, D., Bergmann, L., & Mitrou, P. S. (1995). Lactate dehydrogenase-release assay: A reliable, nonradioactive technique for analysis of cytotoxic lymphocyte-mediated lytic activity against blasts from acute myelocytic leukemia. *Annals of Hematology*, *70*(3), 153–158. <https://doi.org/10.1007/BF01682036>
- Weimershaus, M., Evnouchidou, I., Saveanu, L., & van Ender, P. (2013). Peptidases trimming MHC class I ligands. *Current Opinion in Immunology*, *25*(1), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.10.001>
- Weingärtner, A., Kemmer, G., Müller, F. D., Zampieri, R. A., Gonzaga dos Santos, M., Schiller, J., & Pomorski, T. G. (2012). *Leishmania* promastigotes lack phosphatidylserine but bind annexin V upon permeabilization or miltefosine treatment. *PLoS ONE*, *7*(8), e42070. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042070>
- Weinkopff, T., Mariotto, A., Simon, G., Hauyon-La Torre, Y., Auderset, F., Schuster, S., Zangger, H., Fasel, N., Barral, A., & Tacchini-Cottier, F. (2013). Role of Toll-like receptor 9 signaling in experimental *Leishmania braziliensis* infection. *Infection and Immunity*, *81*(5), 1575–1584. <https://doi.org/10.1128/IAI.01401-12>
- Weinlich, R., & Green, D. R. (2014). The two faces of receptor interacting protein kinase-1. *Molecular Cell*, *56*(4), 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.001>
- Weiss, A., & Littman, D. R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, *76*(2), 263–274. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90334-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90334-4)
- Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D. L., Ma, A., Koonin, E. V., & Dixit, V. M. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- $\kappa$ B signalling. *Nature*, *430*(7000), 694–699. <https://doi.org/10.1038/nature02794>
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., & Cao, Z. (1997). MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, *7*(6), 837–847. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80402-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80402-1)
- White, M. J., McArthur, K., Metcalf, D., Lane, R. M., Cambier, J. C., Herold, M. J., van Delft, M. F., Bedoui, S., Lessene, G., Ritchie, M. E., Huang, D. C. S., & Kile, B. T. (2014). Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell*, *159*(7), 1549–1562. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.036>
- Wickner, W., & Schekman, R. (2008). Membrane fusion. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(7), 658–664. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1451>
- Wildes, T. J., Dean, B. D., & Flores, C. T. (2021). Myelopoiesis during solid cancers and strategies for immunotherapy. In *Cells* (Vol. 10, Issue 968, pp. 1–16). <https://doi.org/10.3390/cells10050968>
- Wilson, M. E., Jeronimo, S. M. B., & Pearson, R. D. (2005). Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis*, *38*(4), 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2004.11.002>

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Witmer-Pack, M. D., Olivier, W., Valinsky, J., Schuler, G., & Steinman, R. M. (1987). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *Journal of Experimental Medicine*, *166*(5), 1484–1498. <https://doi.org/10.1084/jem.166.5.1484>
- World Health Organization. (2021). <https://www.who.int/>. Noncommunicable Diseases. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Wu, Y., Zhang, J., Yu, S., Li, Y., Zhu, J., Zhang, K., & Zhang, R. (2022). Cell pyroptosis in health and inflammatory diseases. *Cell Death Discovery*, *8*(191), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00998-3>
- Wu, Y., Zhang, N., Hashimoto, K., Xia, C., & Dijkstra, J. M. (2021). Structural comparison between MHC classes I and II; in evolution, a class-II-like molecule probably came first. *Frontiers in Immunology*, *12*(621153), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.621153>

### X

---

- Xu, D., & Liew, F. Y. (1995). Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology*, *84*(2), 173–176. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7750991><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1415107>
- Xu, D., McSorley, S. J., Chatfield, S. N., Dougan, G., & Liew, F. Y. (1995). Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA- AroD-). *Immunology*, *85*(1), 1–7.
- Xu, Y.-R., & Lei, C.-Q. (2021). TAK1-TABs complex: A central signalosome in inflammatory responses. *Frontiers in Immunology*, *11*(608976), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.608976>

### Y

---

- Yabal, M., Müller, N., Adler, H., Knies, N., Groß, C. J., Damgaard, R. B., Kanegane, H., Ringelhan, M., Kaufmann, T., Heikenwälder, M., Strasser, A., Groß, O., Ruland, J., Peschel, C., Gyrd-Hansen, M., & Jost, P. J. (2014). XIAP restricts TNF- and RIP3-dependent cell death and inflammasome activation. *Cell Reports*, *7*(6), 1796–1808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.008>
- Yadon, Z. E., Rodrigues, L. C., Davies, C. R., & Quigley, M. A. (2003). Indoor and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in northwestern Argentina: a retrospective case-control study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *68*(5), 519–526. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.68.519>
- Yamazaki, S., Dudziak, D., Heidkamp, G. F., Fiorese, C., Bonito, A. J., Inaba, K., Nussenzweig, M. C., & Steinman, R. M. (2008). CD8+CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, *181*(10), 6923–6933. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.6923>
- Yang, C., Wang, H., Zhang, B., Chen, Y., Zhang, Y., Sun, X., Xiao, G., Nan, K., Ren, H., & Qin, S. (2016). LCL161 increases paclitaxel-induced apoptosis by degrading cIAP1 and cIAP2 in NSCLC. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *35*(158), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0435-7>
- Yang, L., Kumar, B., Shen, C., Zhao, S., Blakaj, D., Li, T., Romito, M., Teknos, T. N., & Williams, T. M. (2019). lcl161, a smac-mimetic, preferentially radiosensitizes human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, *18*(6), 1025–1035. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-1157>
- Yanik, M., Gurel, M. S., Simsek, Z., & Kati, M. (2004). The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, *29*(5), 464–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2004.01605.x>
- Yao, W., Bai, L., Wang, S., Zhai, Y., & Sun, S.-Y. (2022). Mcl-1 levels critically impact the sensitivities of human colorectal cancer cells to APG-1252-M1, a novel Bcl-2/Bcl-XL dual inhibitor that induces

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Bax-dependent apoptosis. *Neoplasia*, 29(100798), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100798>
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., & Sher, A. (2005). TLR11 Activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, 308(5728), 1626–1629. <https://doi.org/10.1126/science.1109893>
- Yatim, N., Cullen, S., & Albert, M. L. (2017). Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 262–275. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.9>
- Yatim, N., Jusforgues-Saklani, H., Orozco, S., Schulz, O., Barreira da Silva, R., Reis e Sousa, C., Green, D. R., Oberst, A., & Albert, M. L. (2015). RIPK1 and NF- $\kappa$ B signaling in dying cells determines cross-priming of CD8+ T cells. In *Science* (Vol. 350, Issue 6258).
- Yewdell, J. W., & Bennink, J. R. (1999). Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.51>
- Yin, X., Yu, H., Jin, X., Li, J., Guo, H., Shi, Q., Yin, Z., Xu, Y., Wang, X., Liu, R., Wang, S., & Zhang, L. (2017). Human blood CD1c+ dendritic cells encompass CD5high and CD5low subsets that differ significantly in phenotype, gene expression, and functions. *The Journal of Immunology*, 198(4), 1553–1564. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600193>
- Yoshio, S., Kanto, T., Kuroda, S., Matsubara, T., Higashitani, K., Kakita, N., Ishida, H., Hiramatsu, N., Nagano, H., Sugiyama, M., Murata, K., Fukuhara, T., Matsuura, Y., Hayashi, N., Mizokami, M., & Takehara, T. (2013). Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)+ dendritic cells are a potent producer of interferon- $\lambda$  in response to hepatitis C virus. *Hepatology*, 57(5), 1705–1715. <https://doi.org/10.1002/hep.26182>
- 
- ## Z
- Zamboni, D. S., & Sacks, D. L. (2019). Inflammasomes and *Leishmania*: in good times or bad, in sickness or in health. *Current Opinion in Microbiology*, 52, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.05.005>
- Zhang, L., Ramesh, P., Steinmetz, M., & Medema, J. P. (2021). BH3 mimetic sensitivity of colorectal cancer cell lines in correlation with molecular features identifies predictors of response. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3811. <https://doi.org/10.3390/ijms22083811>
- Zheng, T. S., Schlosser, S. F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I. N., Boyer, J. L., & Flavell, R. A. (1998). Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13618–13623. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13618>
- Zhou, B., Zhang, J., Liu, X., Chen, H., Ai, Y., Cheng, K., Sun, R., Zhou, D., Han, J., & Wu, Q. (2018). Tom20 senses iron-activated ROS signaling to promote melanoma cell pyroptosis. *Cell Research*, 28(12), 1171–1185. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0090-y>
- Zhou, W., & Yuan, J. (2014). Necroptosis in health and diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 35, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.07.013>
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>
- Zijlstra, E. E., Kumar, A., Sharma, A., Rijal, S., Mondal, D., & Routray, S. (2020). Report of the fifth post-Kala-azar dermal leishmaniasis consortium meeting, Colombo, Sri Lanka, 14–16 May 2018. *Parasites & Vectors*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04011-7>
- Zutshi, S., Kumar, S., Chauhan, P., Bansode, Y., Nair, A., Roy, S., Sarkar, A., & Saha, B. (2019). Anti-leishmanial vaccines: Assumptions, approaches, and annulments. In *Vaccines* (Vol. 7, Issue 156, pp. 1–33). <https://doi.org/10.3390/vaccines7040156>
- Zychlinsky, A., Prevost, M. C., & Sansonetti, P. J. (1992). *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, 358(6382), 167–169. <https://doi.org/10.1038/358167a0>

## **8. ANEXO X: Aportación**

## Cribado de productos naturales marinos para la búsqueda de nuevos fármacos dirigidos contra los tripanosomátidos y la malaria

---

Las Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTD) representan una grave amenaza para los humanos, especialmente para aquellos que viven en países pobres o en vías de desarrollo. Casi una sexta parte de la población mundial está en riesgo de padecer estas enfermedades y muchos miles mueren a causa de las NTD, a lo que hay que sumar las cuestiones sanitarias, laborales y sociales que lastran el desarrollo económico de estos países. Las enfermedades transmitidas por protozoos son responsables de más de un millón de muertes cada año. La leishmaniasis visceral, la enfermedad de Chagas o la enfermedad del sueño se encuentran entre las NTD más letales. A pesar de no ser considerada una NTD por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la malaria debe agregarse a este siniestro grupo. La malaria, causada por el parásito *Plasmodium falciparum*, es responsable de miles de muertes cada año. El tratamiento de esta enfermedad ha ido perdiendo eficacia año tras año. Muchos de los medicamentos empleados actualmente están obsoletos debido a su pérdida progresiva de eficacia, a su toxicidad intrínseca, a la aparición de farmacoresistencias o a la falta de adherencia al tratamiento. Por lo tanto, existe una necesidad urgente y global de nuevos medicamentos. A pesar de ello, el escaso interés mostrado por la industria farmacéutica hace que nuestro arsenal terapéutico actual sea escaso, y hasta hace poco no se había abordado con seriedad la búsqueda de nuevos fármacos.

Las fuentes de nuevos fármacos para estas y otras patologías incluyen productos naturales, moléculas sintéticas o fármacos de reutilización. Las fuentes más frecuentes de productos naturales son los microorganismos, por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras, algas y plantas, que son capaces de sintetizar muchos fármacos que están en uso actualmente (por ejemplo, antimicrobianos, antitumorales, inmunosupresores, etc.). El ambiente marino es otra fuente bien establecida de productos naturales bioactivos, con aplicaciones recientes contra parásitos, bacterias y otros patógenos que afectan a humanos y animales. Las técnicas para el descubrimiento de fármacos han avanzado rápidamente desde el comienzo del milenio. La combinación de técnicas novedosas, que incluyen la modificación genética de patógenos, la bioimagen y la robótica, ha dado lugar a la estandarización de las plataformas de cribado de alto rendimiento (*High-Performance Screening*) en el descubrimiento de fármacos. Estos avances han acelerado el descubrimiento de nuevas entidades químicas con efectos antiparasitarios. Esta revisión representa las novedades existentes con respecto al uso del cribado de alto rendimiento

(HTS, por sus siglas en inglés) en el descubrimiento de medicamentos para los defectos del tubo neural transmitidos por protozoos, incluida la malaria, y su aplicación en el descubrimiento de nuevos fármacos de origen marino.

**doi: 10.3390/md18040187**