



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Estudio de la activación de linfocitos T CD8 mediante liposomas que contienen  
antígenos de *Leishmania mexicana*”

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:  
**KAREN FLORES ÁVILA**

Tutor principal:  
**DRA. INGEBORG BECKER FAUSER**  
Facultad de Medicina

Comité tutor:  
**DRA. MINERVA ARCE FONSECA**  
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”  
**DR. CARLOS ESLAVA CAMPOS**  
Facultad de Medicina



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIAS**

En primer lugar, quisiera dedicar este trabajo a las personas y animales por las que la investigación tiene razón de ser.

En segundo lugar, a los animales utilizados durante la investigación, puesto que, como menciona Marc Bekoff: “no son propiedades o cosas, sino organismos vivientes, sujetos de una vida, que merecen nuestra compasión, respeto y apoyo”.

Dedico el trabajo a mi familia que me apoyó durante este periodo de mi vida.

A mis amigos que me apoyaron emocionalmente, permitiéndome entender que nuestras vidas se vuelven hermosas no por lo que hacemos, sino porque hemos incluido a todos a nuestro alrededor como parte de nuestro sueño de bienestar.

A Jesús Antonio Vargas Castillo, por todo su apoyo durante estos años, por mostrarme que los momentos más bellos de la vida son momentos en los que expresas tu alegría, no cuando la buscas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el financiamiento de esta investigación a AG201221 y CONACyT Fronteras 6682.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por aceptarme como su alumna y apoyarme durante este proceso.

Al Dr. Jaime Zamora Chimal por toda su asesoría, trabajo en equipo tanto en los experimentos como en el escrito, y principalmente quiero agradecer su apoyo moral.

Al Dr. José Sotero Delgado Domínguez por su asesoría y por ayudarme en la parte experimental de los liposomas.

A la Dra. Adriana Méndez Bernal por las imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

A todos los miembros del laboratorio, en especial a la Dra. Rocely Buenaventura, a la Dra. Adriana Ruiz y a la Dra. Isabel Cristina Cañeda por el aporte de material y asesoría en técnicas de laboratorio.

A mi comité tutor, la Dra. Minerva Arce Fonseca y el Dr. Carlos Eslava Campos, por toda su asesoría.

## RESUMEN

La leishmaniasis es causada por parásitos intracelulares del género *Leishmania*, que infectan a los macrófagos y a otras células fagocíticas. Para poder eliminar al parásito, los macrófagos necesitan ser activados por citocinas pro-inflamatorias de linfocitos T. En lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada se han observado granulomas con abundantes linfocitos T CD8<sup>+</sup> que son capaces de eliminar a los macrófagos infectados mediante mecanismos citotóxicos. Adicionalmente los linfocitos T CD8<sup>+</sup> producen IFN- $\gamma$ , el cual induce la activación de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) favoreciendo la eliminación del parásito por estas células. Se ha demostrado que los liposomas catiónicos, así como el alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer) activan linfocitos T CD8<sup>+</sup> en diferentes modelos infecciosos y cáncer. Por lo anterior, en este proyecto se buscó activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> mediante liposomas cargados con antígenos de *L. mexicana* y  $\alpha$ -GalCer para controlar la infección. Se formaron siete grupos experimentales con ratones BALB/c con diferentes protocolos de inmunización: SLA (antígeno soluble de *L. mexicana*) solo,  $\alpha$ -GalCer solo, liposomas cargados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) o liposomas vacíos (LV), liposomas cargados con  $\alpha$ -GalCer (Lc- $\alpha$ -GalCer), liposomas cargados con SLA (Lc-SLA), Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer y un control sin tratamiento (SN TX). Posteriormente, los animales fueron desafiados con  $1 \times 10^6$  parásitos de *L. mexicana* y se monitoreó el progreso de la infección. Se observó una disminución significativa de la carga parasitaria y del tamaño de lesión en los ratones inmunizados con Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer, así como aumento en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, la producción de IFN- $\gamma$  y de la citotoxicidad, por lo que se puede concluir que este protocolo de inmunización activó a los T CD8<sup>+</sup> y estos contribuyeron al control de la enfermedad.

**Palabras clave:** *Leishmania mexicana*, Linfocitos T CD8<sup>+</sup>, Liposomas, Alfa-galactosilceramida, IFN- $\gamma$ , Citotoxicidad.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by intracellular parasites of the genus *Leishmania*, which infect macrophages and other phagocytic cells. In order to eliminate the parasite, macrophages need to be activated by pro-inflammatory cytokines from T lymphocytes. In lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis, granulomas with abundant CD8+ T lymphocytes have been observed, which are able to eliminate infected macrophages by cytotoxicity. Additionally, lymphocytes produce IFN- $\gamma$ , which induces the activation of inducible nitric oxide synthase favoring the elimination of the parasite by these cells. Cationic liposomes, as well as alpha-galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) have been shown to activate CD8+ T lymphocytes in different infectious and cancer models. Therefore, in this project CD8+ T lymphocyte activation using liposomes loaded with *L. mexicana* antigens and  $\alpha$ -GalCer to control infection was analyzed. Seven experimental groups with BALB/c mice with different immunization protocols were formed: soluble *L. mexicana* antigen (SLA) alone,  $\alpha$ -GalCer alone, liposomes loaded with phosphate buffered saline (PBS) or empty liposomes (EL), liposomes loaded with  $\alpha$ -GalCer (LI- $\alpha$ -GalCer), liposomes loaded with SLA (LI-SLA), LI-SLA/LI- $\alpha$ -GalCer and an untreated control (UC). They were subsequently challenged with  $1 \times 10^6$  *L. mexicana* parasites and the progress of infection was monitored. A statistically significant decrease in parasite load and lesion size was observed in mice immunized with LI-SLA/LI- $\alpha$ -GalCer, as well as an increase in CD8+ T lymphocyte population, IFN- $\gamma$  production and cytotoxicity, so it can be concluded that this immunization protocol activated CD8+ T cells and these contributed to disease control.

**Key words:** *Leishmania mexicana*, CD8+ T lymphocytes, Liposomes, Alpha-galactosylceramide, IFN- $\gamma$ , Cytotoxicity.

# ÍNDICE

<b>DEDICATORIAS</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>RESUMEN</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
Expresión de IL-4 e IL-10 por células T CD4 <sup>+</sup> y T CD8 <sup>+</sup> .....	xi
<b>Abreviaturas</b> .....	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>Ciclo biológico</b> .....	12
<b>Formas clínicas de la leishmaniasis</b> .....	14
<b>Tratamientos farmacológicos para la leishmaniasis</b> .....	15
<b>Factores de virulencia del parásito y su interacción con el sistema inmunitario</b> .....	15
<b>Respuesta de células T en la leishmaniasis</b> .....	17
<b>Presentación cruzada de antígeno</b> .....	17
<b>Activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup></b> .....	18
<b>Citotoxicidad por linfocitos T CD8<sup>+</sup></b> .....	19
<b>Papel de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la leishmaniasis</b> .....	20
<b>Antígenos vacunales de <i>Leishmania</i></b> .....	21
<b>Liposomas</b> .....	22
<b>Alfa-galactosilceramida (<math>\alpha</math>-GalCer)</b> .....	24
<b><math>\alpha</math>-GalCer en la leishmaniasis</b> .....	25
<b>Liposomas y <math>\alpha</math>-GalCer</b> .....	26
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	26
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	27
<b>HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	27
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	27
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	28

Unidades experimentales.....	28
Aislado de <i>L. mexicana</i> .....	28
Diferenciación de macrófagos derivados de células de la médula ósea ....	29
Análisis de pureza de macrófagos .....	29
Obtención de antígenos .....	30
Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	30
Incorporación de antígeno dentro de liposomas .....	30
Caracterización de los liposomas .....	31
Determinación del tamaño de los liposomas .....	31
Internalización de antígenos cargados en liposomas por macrófagos derivados de médula ósea .....	31
Inmunización de ratones .....	32
Infección de ratones BALB/c con <i>L. mexicana</i> .....	32
Cuantificación del tamaño de lesión y carga parasitaria .....	33
Producción intracelular de citocinas y citotoxicidad de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> y T CD4 <sup>+</sup> .....	33
Análisis estadístico.....	34
<b>RESULTADOS</b> .....	34
Obtención de antígeno y preparación de liposomas .....	34
Caracterización de antígeno dentro de liposomas .....	34
Caracterización de liposomas cargados.....	35
Análisis de pureza de macrófagos .....	37
Internalización de antígenos .....	37
Cuantificación del tamaño de la lesión y carga parasitaria de los grupos experimentales .....	39
Proporción de población de células T CD4 <sup>+</sup> y T CD8 <sup>+</sup> .....	40
Citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> y T CD4 <sup>+</sup> .....	42
Citotoxicidad .....	44
<b>DISCUSIÓN</b> .....	44
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	52



<b>PERSPECTIVAS</b> .....	52
<b>APÉNDICE</b> .....	53
<b>Tamaño de lesión</b> .....	53
<b>Citometría de flujo</b> .....	54
Control de Autofluorescencia.....	54
Controles de fluorescencia: <i>Fluorescence Minus One</i> (FMO), FITC y PercP .	55
Estrategia de análisis de la producción de CD107a en linfocitos T CD8 <sup>+</sup> .....	56
Estrategia de análisis de la producción de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ por linfocitos T CD8 <sup>+</sup>	57
Estrategia de análisis de la producción de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ de T CD4 <sup>+</sup> .....	58
Controles FMO-FITC y Pacific Blue.....	59
Estrategia de análisis de la producción de IL-4 e IL-10 de T CD4 <sup>+</sup> y T CD8 <sup>+</sup> .	60
<b>REFERENCIAS</b> .....	61

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Ciclo biológico de *Leishmania*.
- Figura 2** Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de SLA solo y SLA liposomal.
- Figura 3** Liposomas cargados con antígenos de *Leishmania mexicana*.
- Figura 4** Liposomas cargados con alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer).
- Figura 5** Análisis por citometría de flujo del marcador F4/80 en macrófagos derivados de médula ósea.
- Figura 6** Macrófagos derivados de médula ósea incubados con Lc-SLA en FITC (verde fluorescente) que expresan el marcador F4/80 en PE (rojo) y tinción nuclear con DAPI (Azul).
- Figura 7** Macrófagos derivados de médula ósea sin estímulo que expresan el marcador F4/80 en PE (rojo) y tinción nuclear con DAPI (Azul).
- Figura 8** Tamaño de la lesión de la almohadilla de ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L. mexicana* y previamente inmunizados con SLA, LV, Lc-SLA,  $\alpha$ -GalCer, Lc-  $\alpha$ -GalCer, Lc-SLA/Lc-  $\alpha$ -GalCer y SN TX.
- Figura 9** Carga parasitaria de la almohadilla de ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L. mexicana* y previamente inmunizados

con SLA, LV, Lc-SLA,  $\alpha$ -GalCer, Lc-  $\alpha$ -GalCer, Lc-SLA/Lc-  $\alpha$ -GalCer y SN TX.

- Figura 10** Porcentaje y proporción de población T CD4+/T CD8+ de ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L. mexicana* y previamente inmunizados con SLA, LV, Lc-SLA,  $\alpha$ -GalCer, Lc-  $\alpha$ -GalCer, Lc-SLA/Lc-  $\alpha$ -GalCer y SN TX.
- Figura 11** Citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias de linfocitos T CD8+ y T CD4+ en respuesta la infección por *L. mexicana*.
- Figura 12** Citotoxicidad de linfocitos T CD8+ en respuesta la infección por *L. mexicana*.
- Figura 13** Imagen ilustrativa del tamaño de la lesión de la almohadilla izquierda de ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L. mexicana*.
- Figura 14** Autofluorescencia.
- Figura 15** Controles de fluorescencia: *Fluorescence Minus One* (FMO), FITC y PerCP
- Figura 16** Expresión de CD107a.
- Figura 17** Expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por células T CD8+.
- Figura 18** Expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por células T CD4+.
- Figura 19** Controles FMO-FITC y Pacific Blue

**Figura 20** Expresión de IL-4 e IL-10 por células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>

## Abreviaturas

APC	Células presentadoras de antígeno
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
BSA	Albúmina sérica bovina
CTL	Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> citotóxicos
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC	Células dendríticas
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GIPL	Glicoinositolfosfolípidos
gp63	Glicoproteína inmunodominante de 63 kDa
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
iNKT	Células T asesinas naturales invariantes
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
Ip	Inyecciones intraperitoneales
ISS	Secuencias inmunoestimuladoras
KMP-11	Proteína de membrana de cinetoplastido de 11 kDa
LACK	Antígeno homólogo de <i>Leishmania</i> para receptores de cinasa C activada
LC	Leishmaniasis cutánea
Lc	Liposomas cargados
Lc- $\alpha$ -GalCer	Liposomas cargados con $\alpha$ -GalCer
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
Lc-SLA	Liposomas cargados con SLA
LMC	Leishmaniasis mucocutánea

LmSTI1	Proteína recombinante inducible por estrés de <i>L. major</i> 1
LPG	Lipofosfoglicano
LUV	Vesículas unilamelares grandes
LVs	Leishmaniasis visceral
LV	Liposomas cargados con PBS o vacíos
MET	Microscopio electrónico de transmisión
MHC-I	Complejo principal de histocompatibilidad de clase I
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
MLV	Vesículas multilamelares
MO	Macrófagos derivados de médula ósea
MO-Lc-SLA	Macrófagos derivados de médula ósea con liposomas cargados con antígenos solubles de <i>Leishmania</i>
MO-Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer	Macrófagos derivados de médula ósea con liposomas cargados con antígenos solubles de <i>Leishmania</i> y liposomas cargados con alfa-galactosilceramida
MO-Lc- $\alpha$ -GalCer	Macrófagos derivados de médula ósea con liposomas cargados con alfa-galactosilceramida
MO-LV	Macrófagos derivados de médula ósea con liposomas cargados con PBS o vacíos
MO-SLA	Macrófagos derivados de médula ósea con antígenos solubles de <i>Leishmania</i>
MO- $\alpha$ -GalCer	Macrófagos derivados de médula ósea con alfa-galactosilceramida
NK	Células asesinas naturales
ODN CpG	Oligodesoxinucleótidos de citosina fosfato guanina
p36	Péptido de 36 kDa que corresponde al antígeno LACK de <i>Leishmania spp</i>
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos

pDNA	ADN plasmídico no codificante
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína peridina-clorofila
PMA/I	Forbol-miristato-acetato/ionomicona
PPG	Proteofosfoglicano
RE	Retículo endoplásmico
SC	Subcutánea
SLA	Antígenos de <i>Leishmania</i> solubles
SN TX	Sin tratamiento
SUV	Vesículas pequeñas
TAP	Transportador asociado con las proteínas de procesamiento de antígenos
TLR2	Receptor tipo Toll 2
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
$\alpha$ -GalCer	Alfa-galactosilceramida

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad tropical zoonótica presente en alrededor de 98 países incluido México. Se estima que existen entre 12 y 15 millones de personas infectadas y 350 millones en riesgo de infección; además, se calcula que cada año se producen entre 700,000 y un millón de nuevos casos y de 26,000 a 65,000 defunciones (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2019).

Esta enfermedad es ocasionada por parásitos protozoarios del género *Leishmania* de la familia Trypanosomatidae que son transmitidos por la picadura de flebótomos hembras infectadas del género *Lutzomyia* en América y *Phlebotomus* en Europa (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Actualmente se conocen 54 especies de *Leishmania* y al menos 20 de ellas son patógenas para el ser humano (Akhoundi *et al.*, 2017; Aronson *et al.*, 2017).

En México la especie prevalente es *Leishmania mexicana*, y es endémica principalmente en los estados del sureste como Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Veracruz (Berzunza-Cruz *et al.*, 2015). Puede infectar a diversos mamíferos salvajes y domésticos, mientras que los humanos son hospedadores accidentales (Berzunza-Cruz *et al.*, 2015). Como vectores del parásito las especies de importancia médica registradas en este país son: *Lutzomyia cruciata*, *L. ovallesi*, *L. longipalpis*, *L. olmeca olmeca*, *L. evansi* y *L. shannoni* (Ibáñez-Bernal *et al.*, 2004; Sánchez-García *et al.*, 2010).

### Ciclo biológico

La infección comienza con la picadura del flebotomino que transmite los parásitos en su fase de promastigotes metacíclicos al hospedador mamífero, donde infectan células del sistema fagocítico mononuclear. Una vez dentro de la célula el promastigote pierde el flagelo para cambiar a su forma de amastigote, el cual se divide por fisión binaria hasta lisis a la célula infectada, liberando así a los parásitos



que son fagocitados por distintas células fagocíticas, propagándose la infección (Figura 1) (Cantacessi *et al.*, 2015; Sunter y Gull, 2017). La evolución de la enfermedad y los signos clínicos típicos varían con la especie de *Leishmania* involucrada y del estado inmunológico del hospedador. En ocasiones las infecciones pueden permanecer asintomáticas (Akhoundi *et al.*, 2017).

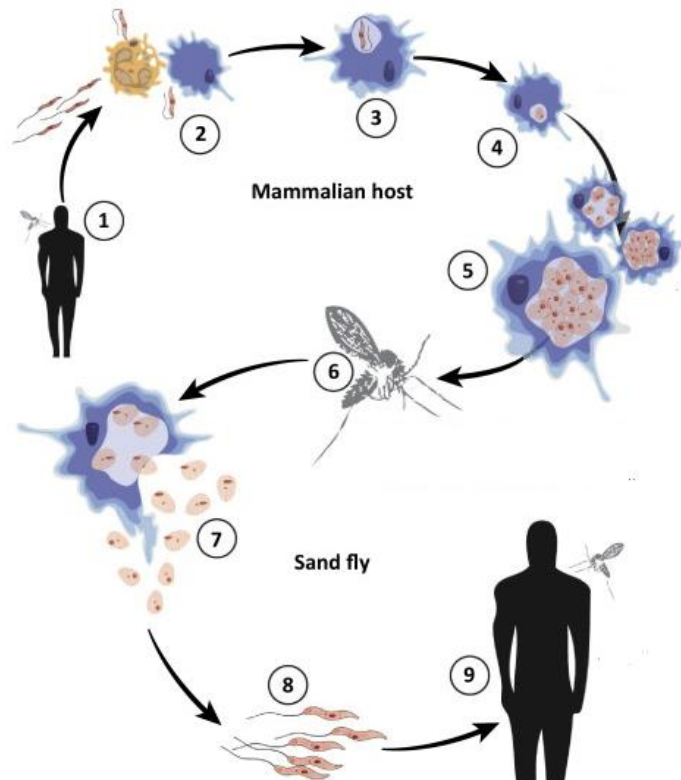


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania*. Las moscas de arena liberan a los promastigotes metacíclicos en los hospedadores mamíferos durante su alimentación con sangre (1); los parásitos invaden a las células del sistema fagocítico mononuclear (2 y 3) y se convierten en amastigotes dentro del fagolisosoma (4); los amastigotes se replican dentro del fagolisosoma por fisión binaria (5); luego, los macrófagos que contienen amastigotes son ingeridos por moscas de arena susceptibles durante la succión de sangre (6); los parásitos se liberan de los macrófagos dentro del intestino medio de la mosca de arena (7), donde se transforman en promastigotes procíclicos y se dividen. Luego, los parásitos migran hacia la válvula estomodeal (intestino medio anterior) y se transforman en diferentes subtipos de promastigotes que finalmente forman promastigotes metacíclicos (8). Estas etapas infecciosas se liberan en un

nuevo hospedador mamífero durante la siguiente succión de sangre (9) (Tomado de Cantacessi *et al.*, 2015).

En los seres humanos se observan dos formas de la leishmaniasis: cutánea y visceral. Algunos autores distinguen la forma mucocutánea, mientras que otros la consideran un subgrupo de leishmaniasis cutánea (Handler *et al.*, 2015; Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

### **Formas clínicas de la leishmaniasis**

La leishmaniasis cutánea (LC) es la forma clínica prevalente en todo el mundo, puede haber diferentes manifestaciones caracterizadas por úlceras cutáneas únicas, las cuales son las responsables de la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o úlceras cutáneas múltiples (de presentación diseminada) e incluso una forma crónica poco común pero grave denominada LC difusa (LCD). La LCD se caracteriza por el desarrollo de múltiples lesiones satélites que pueden unirse en placas que cubren grandes áreas de la piel, predominantemente de naturaleza nodular o papular, las cuales no llegan a ulcerarse y contienen una gran cantidad de amastigotes. En general todas las especies de *Leishmania* tienen la capacidad de generar la LC (de Vries *et al.*, 2015). Los principales agentes causales en América son *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis* (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

La leishmaniasis mucocutánea (LMC) es causada fundamentalmente por *L. braziliensis* y *L. panamensis* (Goto y Lindoso, 2010). Puede ocurrir como una complicación de LCL, en la cual se desarrolla una metástasis de la enfermedad a los tejidos mucosos de la boca y al tracto respiratorio superior e incluso al tracto digestivo a través de diseminación linfática o hematológica. Los cuadros severos se asocian a dificultad para respirar y deglutir; se presenta disfonía, afonía e incluso asfixia (de Vries *et al.*, 2015).

La leishmaniasis visceral (LVs) o también llamada Kala-azar se presenta en seis países principalmente: India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía y Brasil (Alvar *et al.*, 2012). En México, los estados en los cuales se han detectado casos de LVs son Chiapas, Puebla y Guerrero (la cuenca del Balsas). Los reportes de LVs corresponden a *L. chagasi*, esencialmente en Chiapas y Guerrero (Cruz-Hernández *et al.*, 2013). En esta forma clínica el parásito puede infectar órganos internos como el hígado, el bazo y la médula ósea, causando fallas multiorgánicas que pueden ser letales sin tratamiento (Sundar, 2015).

### **Tratamientos farmacológicos para la leishmaniasis**

Actualmente existen diversos tratamientos para curar a los pacientes con las diferentes manifestaciones de la leishmaniasis; los más empleados son los pentavalentes antimoniales como el estibogluconato de sodio y el antimonio de meglumina, además existen otras opciones como la pentamidina y la anfotericina B. Sin embargo, estos medicamentos son limitados debido a su alto costo, toxicidad y efectos secundarios. Aunado a esto, algunos estudios han demostrado que la resistencia a los medicamentos es una causa de recaída de infecciones en pacientes con esta enfermedad (Freitas-Junior *et al.*, 2012). Inclusive se ha utilizado la mitelfosina, un medicamento anticancerígeno que si bien ha tenido buenos resultados contra la LC y LVs, conlleva riesgos teratogénicos y resistencia (Dorlo *et al.*, 2014).

Por lo anterior se puede deducir que la terapia farmacológica no ha sido totalmente efectiva para el control y tratamiento de la leishmaniasis, siendo de suma importancia conocer otros factores que puedan tener impacto en el desarrollo de la enfermedad, como el papel que juegan los factores de virulencia del parásito y su interacción con el sistema inmunitario del hospedador para establecer una estrategia adecuada de tratamiento basada en este conocimiento.

### **Factores de virulencia del parásito y su interacción con el sistema inmunitario**

Algunos componentes del parásito se definen como factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis, ya que le permiten invadir e infectar al hospedador mamífero (Matlashewski, 2001). Entre los factores más estudiados se encuentran los glicoinositolfosfolípidos (GIPL), el lipofosfoglicano (LPG), la glicoproteína inmunodominante de 63 kDa (gp63), el proteofosfoglicano (PPG) y la proteína de membrana de cinetoplástido de 11 kDa (KMP-11) (Silva-Almeida *et al.*, 2012). Aunque la relación de cada factor de virulencia y la gravedad de las manifestaciones clínicas aún no está totalmente definida, cada vez hay más evidencia que demuestra su participación en las interacciones de *Leishmania* con las células inmunes del hospedador.

La respuesta inmune innata es la primera en intervenir ante la infección por *Leishmania*. Los receptores tipo Toll 2 (TLR2) presentes en macrófagos, células dendríticas (DC) y células asesinas naturales (NK) reconocen moléculas en la superficie del parásito, tales como el LPG y la gp63 lo que estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias, así como de moléculas coestimuladoras (Isnard *et al.*, 2012; Ruiz y Becker, 2007). El LPG y la gp63, a su vez, permiten evadir moléculas del sistema inmune como el sistema del complemento e incluso son opsonizados, facilitando la fagocitosis de las formas infectantes. Así, por ejemplo, la capa de LPG protege al parásito de la lisis mediada por el complemento, y junto con la actividad proteasa de gp63 el parásito puede ser opsonizado con ligandos para CR3 y/o CR. Además, el LPG de *Leishmania* retrasa la formación de los fagolisosomas y permite que los parásitos de *Leishmania* se diferencien en su forma intracelular, el amastigote (Isnard *et al.*, 2012; Vinet *et al.*, 2009). En el caso de los GIPL, estos favorecen la supervivencia de *Leishmania* dentro de los macrófagos al inhibir a la proteína quinasa C y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), la cual estimula la producción de óxido nítrico que elimina al parásito (Wilkins-Rodríguez *et al.*, 2010). En esta enfermedad, los macrófagos desempeñan un papel triple debido a que son células hospedadoras, células microbicidas, cuya actividad leishmanicida dependerá de la presencia de citocinas como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) que

desencadena la síntesis de la iNOS y, además, participan como células presentadoras de antígeno (APC) que activan a los linfocitos T (Isnard *et al.*, 2012; Ruiz y Becker, 2007).

### **Respuesta de células T en la leishmaniasis**

Existen dos subconjuntos principales de células T, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> que desempeñan diferentes funciones en la leishmaniasis (da Silva Santos y Brodskyn, 2014; Taniuch, 2018). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, conocidos como células T *helper*, se subdividen en dos grupos principalmente: linfocitos Th1 capaces de producir citocinas pro-inflamatorias como el IFN- $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), y linfocitos Th2 caracterizados por la producción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-4 e IL-13 que realizan una función antagónica (da Silva Santos y Brodskyn, 2014; Taniuch, 2018). Debido a la inducción de la iNOS en los macrófagos, las células Th1 han sido relacionadas con la resistencia a la infección, mientras que la respuesta de tipo Th2 da como resultado una enfermedad progresiva (da Silva Santos y Brodskyn, 2014; Taniuch, 2018; Wilkins-Rodríguez *et al.*, 2010). Por otro lado, las células T CD8<sup>+</sup> tienen una función citotóxica y también son capaces de producir IFN- $\gamma$  en diferentes enfermedades (Janeway *et al.*, 2001). Estas células se activan mediante la presentación de péptidos cargados en el complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) que pueden tener su origen a partir de proteínas internas de la célula o bien de origen externo por medio de la presentación cruzada de antígenos (Embgenbroich y Burgdorf, 2018; Neefjes *et al.*, 2011).

### **Presentación cruzada de antígeno**

Aunque la presentación cruzada de antígeno todavía no ha sido claramente dilucidada, se han descrito al menos dos vías diferentes por las cuales se podría llevar a cabo, la vía citosólica y la vía vacuolar (Cruz-Leal *et al.*, 2018; Embgenbroich y Burgdorf, 2018). En la ruta citosólica, los antígenos internalizados se podrían transferir desde el lumen de los compartimentos endocíticos al citosol donde el

proteosoma se encargaría de degradarlos, dicha transferencia podría ser llevada a cabo por una proteína translocadora de polipéptidos llamada de Sec61 (Ruiz y Becker, 2007; Zehner *et al.*, 2015).

Los productos de degradación del proteosoma son transportados por el transportador asociado con las proteínas de procesamiento de antígenos (TAP), ya sea al retículo endoplásmico o al lumen de los endosomas o fagosomas, lo que permite la formación de complejos de péptido-MHC-I (Fehres *et al.*, 2014; Joffre *et al.*, 2012; Shen y Rock, 2006). En la vía vacuolar, las proteasas lisosomales degradan los antígenos capturados dentro de los compartimentos endocíticos donde se unen directamente al MHC-I (Fehres *et al.*, 2014; Joffre *et al.*, 2012; Shen y Rock, 2006). Los péptidos antigénicos se cargan en el MHC-I con la ayuda del complejo de carga de péptidos que es transportado a los fagosomas mediante un mecanismo dependiente de Sec22b, proteína que participa en la fusión de la membrana en el tráfico vesicular (Cebrian *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2020). Cuando se forma el complejo péptido-MHC-I este es transportado a través del aparato de Golgi a la superficie celular (Neefjes *et al.*, 2011).

Se puede deducir que estas vías de presentación de antígeno intervienen en la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la infección por *Leishmania* (Matheoud *et al.*, 2013; Ruiz y Becker 2007).

### **Activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>**

Uno de los modelos planteados hasta el momento sobre la activación de células T CD8<sup>+</sup> en la leishmaniasis señala que las DC capturan el antígeno por varias vías y que pueden fagocitarlo directamente si se encuentra libre en el medio extracelular o bien adquirirlo de células apoptóticas o necróticas. Posteriormente lo procesan y presentan a través de MHC-II a las células T CD4<sup>+</sup>, las cuales sobre-regulan la expresión de CD40L y, mediante la interacción con CD40, activan o inducen a las DC para estimular la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> vírgenes que reconocen el

antígeno en el MHC-I de las DC (Hernández *et al.*, 2002; Ridge *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2004). Posterior a su activación, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> podrían llevar a cabo un proceso citotóxico y/o producción de citocinas (Ruiz y Becker, 2007).

### **Citotoxicidad por linfocitos T CD8<sup>+</sup>**

Para lograr su función citotóxica, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL) emplean dos mecanismos de muerte celular, la vía intrínseca y la extrínseca de la apoptosis. El primero es mediado por la exocitosis de gránulos líticos que contienen moléculas como la perforina, que tiene la capacidad de insertarse en la membrana lipídica y formar poros, lo que resulta en el colapso del potencial de membrana; sin embargo, su principal función es dar paso a la granzima que activa directamente la cascada de señalización de apoptosis mediada por caspasa 3. Tras su activación, permite la translocación de moléculas pro-apoptóticas (ej. Bax) a la mitocondria, induciendo la liberación de factores apoptogénicos mitocondriales (citocromo c) al citosol. Esto activa a la caspasa iniciadora 9 y posteriormente la vía efectora, lo que culmina con el daño mitocondrial, alteraciones nucleares y, eventualmente la muerte celular. Por otro lado, la vía extrínseca comienza con la expresión de FasL/CD95L en membrana lo cual provoca la trimerización de su receptor Fas/CD95 en las células blanco para inducir apoptosis a través de la activación de la caspasa 8 (da Silva Santos y Brodskyn 2014; Harty *et al.*, 2000; Taniuch, 2018).

El papel citotóxico de los CTL en la leishmaniasis sigue siendo desconocido, puesto que no se sabe si los parásitos intracelulares son degradados a lo largo de la apoptosis o bien, si dicho proceso permite la liberación de los amastigotes. Inclusive, los CTL podrían segregar citocinas inhibitorias tales como IL-4, IL-10 y factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) que disminuyan la respuesta inmune celular (Novais *et al.*, 2013; Ruiz y Becker, 2007).

## **Papel de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la leishmaniasis**

Las células T CD8<sup>+</sup> se han asociado con la recuperación de diversas enfermedades infecciosas (Kalia *et al.*, 2013). En el caso de la leishmaniasis, las células T CD8<sup>+</sup> han sido ligadas con protección y curación tanto en seres humanos como en ratones.

En ratones C57BL/6 inoculados intradérmicamente con dosis bajas de *L. major* para simular la infección natural, se mostró que los T CD8<sup>+</sup> son cruciales para controlar las infecciones primarias (Belkaid, 2002). Además, los ratones que han resuelto una infección primaria con este parásito son altamente resistentes a la reinfección; inclusive varios estudios han demostrado que las células T CD8<sup>+</sup> contribuyen a esta inmunidad (Müller *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 1994). Al igual que con una infección primaria, esta función protectora se debe a la capacidad de los T CD8<sup>+</sup> para producir altos niveles de IFN- $\gamma$ .

En los seres humanos se han observado grandes cantidades de células T CD8<sup>+</sup> durante la fase aguda de la infección, tanto en las lesiones como en la sangre periférica, así como en el proceso de curación de los pacientes con LCL infectados con *L. major* (Da cruz *et al.*, 1994; Da cruz *et al.*, 2002; Da cruz *et al.*, 2005; Gaafar, 1999) y *L. mexicana* (Salaiza *et al.*, 1999). Adicionalmente, los pacientes con LCD muestran baja presencia de células T CD8<sup>+</sup> en el infiltrado inflamatorio de sus lesiones, mostrando baja citotoxicidad, baja proliferación específica de antígeno y baja producción de IFN- $\gamma$  (Hernández-Ruiz *et al.*, 2010).

Debido a la importancia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis (Bertholet *et al.*, 2005), estos han sido el objetivo de estudio de muchos grupos de investigación. Por ejemplo, en ratones vacunados con ADN o el antígeno homólogo de *Leishmania* para receptores de cinasa C activada (LACK), y que fueron posteriormente desafiados con *L. major*, la protección fue dependiente de las células T CD8<sup>+</sup> (Gurunathan, 1997). Otras estrategias de vacunación contra



la LC también demostraron un papel crítico de las células T CD8<sup>+</sup> en la protección contra la exposición a parásitos vivos, debido a que el agotamiento de estos linfocitos anuló la protección inducida por la vacunación (Jayakumar *et al.*, 2011; Rhee *et al.*, 2002). Si bien, la mayoría de los estudios que examinan el papel de las células T CD8<sup>+</sup> en las vacunas indican que su capacidad protectora se debe a la producción de IFN- $\gamma$ ; en otro estudio se mostró que la producción de perforina e IFN- $\gamma$  era crucial para la inmunidad inducida por la vacuna contra *L. amazonensis* (Colmenares *et al.*, 2003).

Tomando en conjunto estos datos, se puede deducir que las células T CD8<sup>+</sup> participan de manera activa en la enfermedad y pueden correlacionarse con la cura. Sin embargo, para estimular a estas células y crear una vacuna adecuada primero se requiere contar con un buen inmunógeno.

### **Antígenos vacunales de *Leishmania***

Existen diferentes preparados antigénicos de *Leishmania*, entre ellos parásitos completos muertos, antígenos solubles de *Leishmania* (SLA), antígenos de parásitos fraccionados y proteínas recombinantes o nativas, los cuales han sido analizados en modelos animales, y se ha observado que pueden proteger contra la leishmaniasis cuando se usan con un adyuvante apropiado (Badiie *et al.*, 2013; Copland *et al.*, 2005; Palatnik-de-Sousa, 2008). No obstante, a pesar de los intensos esfuerzos realizados durante las últimas décadas, solo unas pocas vacunas de primera generación a base de parásitos muertos, solos o mezclados con Bacilo de Calmette-Guérin (BCG, llegaron a los ensayos clínicos de fase 3. Sin embargo, los resultados de los ensayos de eficacia indicaron que esta era limitada y no se observaron mejoras con las inyecciones de refuerzo (Khalil *et al.*, 2000; Modabber, 2000; Noazin *et al.*, 2008).

Se informó que una vacuna eficaz contra la leishmaniasis requiere un cóctel multivalente de varios antígenos que contienen un amplio espectro de epítomos

protectores que cubren una amplia gama de tipos de MHC en una población heterogénea (Skeiky *et al.*, 2002). Con base en los resultados de la leishmanización, donde a través de la inoculación intradérmica de parásitos vivos se inducía una lesión de LC artificial, disminuyendo significativamente la tasa de incidencia de LC natural en áreas endémicas de algunos países (Mohebbali *et al.*, 2019), se determinó que el SLA, compuesto a su vez de muchos epítomos de antígenos como gp63, KMP-11, PSA, gp46, etc., se podía considerar como un candidato prometedor para la preparación de vacunas (Bhowmick *et al.*, 2007). Sin embargo, los antígenos solos son generalmente inmunógenos débiles y requieren un adyuvante para inducir la inmunidad protectora.

Para activar a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, el candidato vacunal debe protegerse de la degradación extracelular y facilitarse su presentación por MHC-I, por ejemplo, a través de micelas, liposomas, arqueosomas, polimerosomas y complejos inmunoestimulantes (Askarizadeh *et al.*, 2017; Eiji, 2018). De los anteriores, los liposomas son prometedores como vehículos de administración citosólica en las APCs debido a que su sensibilidad al pH les permite liberar su contenido en el citosol celular; además, son capaces de desestabilizar la membrana endosómica (Eiji, 2018), lo que permite inducir la vía citosólica de presentación de antígeno (Akbarzadeh *et al.*, 2013; Watson *et al.*, 2012). Es de destacar que ya se ha demostrado su utilidad como adyuvantes para varios antígenos de *Leishmania* (Askarizadeh *et al.*, 2017).

## **Liposomas**

Los liposomas son vesículas esféricas compuestas de fosfolípidos anfipáticos. Se clasifican según el número de lípidos en la bicapa, ya sea como vesículas multilamelares (MLV), vesículas pequeñas (SUV) o vesículas unilamelares grandes (LUV) con un rango de tamaño entre 0.02 y 10 µm de diámetro (Askarizadeh *et al.*, 2017). El tamaño y la morfología de los liposomas están regulados por su composición y método de preparación (Kshirsagar *et al.*, 2005).

Los liposomas a menudo están compuestos de lípidos que se producen naturalmente en las membranas celulares, como la fosfatidilcolina y el colesterol, lo que hace que estas formulaciones sean completamente biodegradables. La fase central acuosa liposomal es un compartimento para el encapsulamiento de moléculas hidrofílicas, mientras que la fase de bicapa lipídica se puede usar para compuestos hidrófobos (Sharma, 1997). Por lo tanto, todos los tipos de antígenos tales como péptidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas se pueden usar en liposomas.

Los liposomas por sí solos tienen muchos beneficios debido a su seguridad en el uso clínico, efecto de depósito y simplicidad de preparación. En cuanto a su efecto adyuvante, varios estudios han demostrado que pueden aumentar sinérgicamente las propiedades inmunogénicas de muchos inmunógenos e inclusive limitar sus efectos adversos al restringir su circulación sistémica y protegerlos de la degradación enzimática en el sitio de inyección (Askarizadeh *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2007).

Dados estos antecedentes, los liposomas han sido ampliamente utilizados para mejorar la adyuvancia de diversas moléculas en vacunas contra la leishmaniasis. En un estudio utilizando el modelo murino de leishmaniasis, se emplearon liposomas de diesteiroilfosfatidilcolina como vehículo de entrega para mejorar la actividad adyuvante de los oligodesoxinucleótidos de citosina fosfato guanina (ODN CpG) con el antígeno de la proteína recombinante inducible por estrés de *L. major* 1 (LmSTI1). Los resultados mostraron la superioridad de ODN CpG en su forma liposomal sobre su forma soluble para inducir una respuesta Th1, por lo que algunos de los ratones lograron controlar la infección. Inclusive esta formulación contribuyó a la protección contra las endonucleasas en el sitio de inyección (Badiie *et al.*, 2008). En otra investigación, se utilizaron liposomas catiónicos con SLA co-encapsulado con ODN CpG contra LC en ratones BALB/c. Dicha formulación tuvo un impacto positivo en el tamaño de la lesión en comparación con los controles, lo

que permitió concluir que la forma liposomal de ODN CpG indujo más protección durante un período más largo (Shargh *et al.*, 2012).

Los liposomas catiónicos cargados con SLA también se han empleado con ADN plasmídico no codificante (pDNA), con secuencias inmunoestimuladoras (ISS) o CpG para proveer protección contra el desafío por *L. donovani* (Mazumder *et al.*, 2007). En ese estudio, la inmunización protegió a casi todos los ratones BALB/c y desencadenó fuertes respuestas inmunes contra la enfermedad. Se observó un aumento notable en la eficacia protectora cuando el antígeno y el pDNA se cargaron dentro del mismo liposoma. No obstante, si bien se han probado varias combinaciones liposomales junto con otros adyuvantes, aún no se encuentra una combinación cien por ciento satisfactoria (Askarizadeh *et al.*, 2017; Moafi *et al.*, 2019).

Un adyuvante que aún no ha sido probado en formulación liposomal en la leishmaniasis y que ha demostrado generar una buena estimulación inmunológica en diferentes modelos de infección incluida esta enfermedad, es el alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer) (Gillespie *et al.*, 2016; Zamora-Chimal *et al.*, 2017).

### **Alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer)**

El  $\alpha$ -GalCer es un esfingolípido  $\alpha$ -galactosilado sintético compuesto de un azúcar con enlaces  $\alpha$  y restos de lípidos; fue aislado del extracto de una esponja marina de Okinawa, llamada *Agelas mauritanicus* (Woods *et al.*, 2017). Es reconocido como un adyuvante único que permite la activación de respuestas inmunes tanto específicas como no específicas; es presentado por el receptor CD1d, una molécula presentadora de antígenos glicolipídicos en las APC que es reconocido por el TCR de las células T asesinas naturales invariantes (iNKT) (Taniguchi y Nakayama, 2000). La interacción entre las iNKT y las APC mediante el complejo  $\alpha$ -GalCer/CD1d estimula a ambas células, lo que induce la secreción de varias citocinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$  e IL-12 que activan un amplio espectro de células inmunes

(Shimizu *et al.*, 2007); no obstante, lo más destacable es la capacidad de estas citocinas de cambiar la respuesta inmune a favor de una respuesta de tipo Th1 (Okazaki *et al.*, 2018). Además, la ligadura de CD40-CD154 durante la presentación de glicolípidos a las células iNKT evoca la maduración de la DC que regula otros ligandos coestimuladores como CD40, CD80 y CD86 (Fujii *et al.*, 2004). Estos cambios constituyen una cascada adyuvante que aumenta la activación de las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> específicas de antígeno peptídico (Fujii *et al.*, 2003; Stober *et al.*, 2003). Con base en estas características,  $\alpha$ -GalCer ha sido considerado como un potente adyuvante en candidatos vacunales (Fujii *et al.*, 2013; Woods *et al.*, 2017).

### **$\alpha$ -GalCer en la leishmaniasis**

En el caso particular de la leishmaniasis, el  $\alpha$ -GalCer se ha empleado en algunos estudios donde su uso ayudó a reducir la carga parasitaria en ratones BALB/c infectados con *L. major* (Griewank *et al.*, 2014). Además,  $\alpha$ -GalCer también se ha utilizado como adyuvante en las vacunas de *Leishmania*. En un estudio en el que se empleó una vacuna de ADN que expresa el antígeno LACK (p36) con  $\alpha$ -GalCer como adyuvante, se demostró que la inmunización de ratones BALB/c condujo a reducir aproximadamente diez veces la carga parasitaria después del desafío con *L. major* en comparación con los ratones inmunizados solo con p36. La protección se relacionó con una mayor producción de IFN- $\gamma$  por las células T CD4<sup>+</sup> y una mayor citotoxicidad de las células T CD8<sup>+</sup> (Dondji *et al.*, 2008).

Los antecedentes de  $\alpha$ -GalCer para inducir la producción de IFN- $\gamma$ , moléculas coestimuladoras y la activación de los linfocitos T deben tenerse en cuenta para futuros ensayos de inmunización contra infecciones por *Leishmania*. Sin embargo, se ha informado que las DC no absorben eficientemente el  $\alpha$ -GalCer soluble (Schneiders *et al.*, 2011). Por lo tanto, para inducir una respuesta inmune eficaz mediante la administración de  $\alpha$ -GalCer, sería necesario controlar la disposición y la absorción celular de  $\alpha$ -GalCer con los sistemas de administración disponibles

actualmente como los liposomas. Hasta ahora muy pocos estudios se han dedicado a examinar los efectos adyuvantes de  $\alpha$ -GalCer mediante su incorporación en los sistemas de administración.

### **Liposomas y $\alpha$ -GalCer**

Los liposomas cargados con  $\alpha$ -GalCer y antígenos se han empleado en modelos de enfermedades similares a la forma crónica de la leishmaniasis como son las neoplasias. En un estudio realizado por Okazaki *et al.* (2018), se investigó la capacidad de los liposomas sensibles al pH co-cargados con antígeno tumoral y  $\alpha$ -GalCer para inducir linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de antígeno tumoral y su efecto antitumoral *in vivo*. Los hallazgos indicaron que el antígeno tumoral y los liposomas sensibles al pH modificados con  $\alpha$ -GalCer, no solo estimulaban eficazmente a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de antígeno tumoral, sino que también inducían efectos profilácticos y terapéuticos en el modelo de tumor de ratón.

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La leishmaniasis es ocasionada por parásitos intracelulares del género *Leishmania* que infectan principalmente a los macrófagos, éstos al ser incapaces de erradicar al agente infeccioso necesitan de la activación de los linfocitos T para la eliminación del parásito. Se ha observado una gran cantidad de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el infiltrado inflamatorio de las lesiones provenientes de los individuos resistentes a la enfermedad. Además, se ha demostrado que son capaces de eliminar a los macrófagos infectados y de producir IFN- $\gamma$  que desencadena la síntesis de la iNOS en estas células, eventos que favorecen la eliminación del parásito. Estudios anteriores han mostrado que el empleo de liposomas catiónicos y  $\alpha$ -GalCer induce respuestas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en diferentes modelos infecciosos y cáncer. Por lo que el desarrollo de vacunas utilizando dicho modelo para activar la respuesta de T CD8<sup>+</sup> es una alternativa potencial para prevenir este padecimiento de enorme importancia tanto en nuestro país como en otros en los que representa un problema importante de salud.

## JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica que constituye un importante problema de salud pública en zonas endémicas, se encuentra entre las diez enfermedades tropicales desatendidas con más de 12 millones de personas infectadas, 26,000 a 65,000 defunciones y 350 millones de personas a riesgo de infectarse (OPS, 2021). Los tratamientos convencionales son muy costosos, en muchos casos poco efectivos ya que hay presencia de resistencia y pueden conllevar diversos efectos secundarios. Por lo que respecta a vacunas para seres humanos, a pesar de un extenso programa de investigación y desarrollo, la mayoría no ha avanzado más allá de las primeras fases de investigación. Por lo anterior, en este proyecto se pretende evaluar si la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> mediante liposomas que contengan antígenos de *L. mexicana* y  $\alpha$ -GalCer es de utilidad para prevenir la infección por el parásito.

## HIPÓTESIS

La inoculación de liposomas que contienen antígenos de *L. mexicana* y  $\alpha$ -GalCer en ratones BALB/c activa a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> contribuyendo al control de la enfermedad.

## OBJETIVO GENERAL

Activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> mediante liposomas que contienen antígenos de *Leishmania mexicana* y  $\alpha$ -GalCer para evaluar si altera el desarrollo de la enfermedad.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar liposomas con antígenos de *L. mexicana* y  $\alpha$ -GalCer.
2. Evaluar mediante microscopía confocal la internalización de antígenos de *L. mexicana* marcados con FIT-C en macrófagos *in vitro*.

3. Evaluar si la inoculación intraperitoneal de liposomas con antígenos de *L. mexicana* y  $\alpha$ -GalCer en ratones BALB/c induce la producción de IFN- $\gamma$  y la expresión de CD107a en los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.
4. Comparar la proporción de población celular y producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 por parte de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup>.
5. Evaluar si con esta vía de activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> se reduce la carga parasitaria y/o se protegen ratones infectados con *L. mexicana*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Unidades experimentales**

Se utilizaron 42 ratones hembra de la cepa BALB/c de entre ocho y diez semanas de edad, proporcionados por el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron manejados bajo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El protocolo fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio 123-2019/038-CIC-2019.

### **Aislado de *L. mexicana***

Se utilizaron parásitos previamente cultivados en el laboratorio de la cepa Lacandona MHOM/MX/2011/de *L. mexicana* (Escalona-Montaña *et al.*, 2016), los cuales mantuvieron su virulencia mediante pases por ratones BALB/c. Brevemente, para aislar a los parásitos de los ratones se utilizaron jeringas de insulina de calibre 25 G para aspirar a los parásitos de las lesiones, los cuales se cultivaron de manera axénica. Los cultivos para promastigotes se iniciaron con  $0.5 \times 10^6$  promastigotes/mL en medio de cultivo M199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) descomplementado por calor a 56 °C durante 30 min. Se colocó un volumen de 10 mL de medio en botellas de 25 cm<sup>2</sup> para su incubación a temperatura ambiente. Con el fin de mantener la viabilidad del cultivo, cada tres a cuatro días se transfirió



el mismo número de parásitos en fase logarítmica a botellas con medio fresco, empleando un máximo de cinco pases por aislado. Se emplearon parásitos en fase estacionaria para infectar ratones o para aislar antígenos (Zamora-Chimal *et al.*, 2017).

### **Diferenciación de macrófagos derivados de células de la médula ósea**

Las células de la médula ósea fueron extraídas del fémur y la tibia de ratones BALB/c que previamente fueron eutanasiados por dislocación cervical. Las células fueron aisladas en condiciones de esterilidad utilizando solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH 7.4) que fue inoculada a través del canal medular bajo presión con jeringa. Las células obtenidas se cultivaron en cajas de Petri donde fueron suspendidas en 10 mL de medio RPMI que contenía 20% de SFB suplementado con el 20% del sobrenadante de la línea celular L929, productora de M-CSF para la diferenciación de colonias de macrófagos (de Brito *et al.*, 2020). Las cajas de Petri se mantuvieron en incubación durante siete días a 37 °C con una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Posterior a este periodo, las células adheridas a la caja de Petri fueron desprendidas en frío con PBS para su análisis de pureza.

### **Análisis de pureza de macrófagos**

Se analizó la pureza de la población de macrófagos derivados de médula ósea (MO) mediante citometría de flujo utilizando el marcador F4/80. Una alícuota de  $1 \times 10^6$  de macrófagos en cultivo se resuspendió en 200  $\mu$ L de PBS y se centrifugó a 2000 rpm/min durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se decantó, la pastilla se resuspendió en albúmina al 20% y se incubó durante 30 min a 4 °C. Posteriormente se lavó con 1 mL de PBS y se centrifugó a 2000 rpm 10 min a 4 °C. Nuevamente se decantó el sobrenadante para marcar las células con ficoeritrina (PE) F4/80 anti-ratón en una dilución 1:50 para su posterior análisis en un citómetro de flujo FACS CANTO II BD. Los datos fueron analizados con el *software* FlowJo v.10.

## **Obtención de antígenos**

La preparación de antígenos de *L. mexicana* se llevó a cabo utilizando el protocolo desarrollado por Jamal *et al.* (2017) con algunas modificaciones. Brevemente, los parásitos se cosecharon en la fase estacionaria y se lavaron tres veces utilizando PBS. Posteriormente los parásitos se lisaron utilizando el método de congelación y descongelación seguido de sonicación. La suspensión con los parásitos lisados se centrifugó a 20,000 g durante 30 min. El sobrenadante se recolectó y almacenó a una temperatura de -70 °C hasta su uso. La concentración de proteínas del antígeno se determinó usando el método de Bradford (1976).

## **Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Para cuantificar la cantidad de proteína a través del método de Bradford (1976) se empleó una placa de 96 pozos, y se preparó una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) a concentración de 0 µg, 1 µg, 2 µg, 5 µg, 10 µg y 15 µg. El volumen de muestra fue de 5 µL.

Posteriormente se agregaron 250 µL de reactivo de Bradford tanto a los tubos de la curva patrón como a los de las muestras. La placa se leyó a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU® 530). Todo lo anterior se realizó por duplicado.

## **Incorporación de antígeno dentro de liposomas**

Se prepararon liposomas cargados con SLA (Lc-SLA), liposomas cargados con PBS o liposomas vacíos (LV) y liposomas cargados con  $\alpha$ -GalCer (Lc-  $\alpha$ -GalCer). Para preparar los Lc-SLA se utilizó un *kit* de liposomas comercial (L4395-5VL, Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. La incorporación del antígeno se llevó a cabo agregando 1 mL de la solución acuosa con 2.5 mg de antígeno en el vial a 4 °C y se mezcló agitando en vórtex durante 30 segundos, posterior a esto se sonicó en tres ciclos de tres min con cinco segundos de pausa por ciclo.

El exceso de antígeno libre se eliminó mediante centrifugación a 20,000 g durante 1 h a 4 °C y se cuantificó el antígeno no encapsulado por el método de Bradford. La eficacia de encapsulación se determinó por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Eficacia de encapsulación} = \frac{\text{Proteína cargada en los liposomas después de la purificación}}{\text{Proteína cargada en los liposomas antes de la purificación}} \times 100.$$

Para los LV y Lc- $\alpha$ -GalCer se utilizó la misma metodología, empleando 1 mL de PBS para LV y 200  $\mu$ g de  $\alpha$ -GalCer/DMSO diluidos en 600 mL de PBS.

### **Caracterización de los liposomas**

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para caracterizar tanto el SLA solo y el encapsulado en el liposoma. Se corrió un gel al 10% de acrilamida con tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1%, pH 8.3). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 140 V por 45 min. Por último, los geles se tiñeron con plata para la detección de proteínas.

### **Determinación del tamaño de los liposomas**

Para estimar el tamaño liposomal se tomó una muestra de 50  $\mu$ L de los liposomas, los cuales se fijaron con 50  $\mu$ L de acetato de uranilo al 1% durante cinco min. Se tomó una muestra de liposomas fijados utilizando rejillas de película de carbono. El excedente se retiró con papel filtro. Una vez listas las rejillas con los liposomas se observaron con un microscopio electrónico de transmisión (MET).

### **Internalización de antígenos cargados en liposomas por macrófagos derivados de médula ósea**

Se incubaron MO con Lc-SLA para observar su internalización. Se utilizaron 250,000 MO que fueron adheridos a un cubreobjetos redondo de 18 mm de diámetro y 0.13-0.17 mm de grosor, posteriormente fueron incubados con Lc-SLA durante 18 h en 1 mL de medio RPMI con 10% de SFB a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez

transcurrido el tiempo se marcaron con F4/80 anti-ratón para contrarrestar la membrana celular en una dilución 1:50 durante 20 min a 4 °C; se lavaron con PBS y posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% durante 20 min a 4 °C. Después se permearon con acetona para realizar la marca intracelular de los Lc-SLA con un anticuerpo primario de suero de conejo anti-*Leishmania* en dilución 1:40 durante 30 min a 4 °C; subsecuentemente se lavaron con PBS y se marcaron con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en dilución 1:40 por 30 min a 4 °C. Por último, se realizó una tinción nuclear con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en dilución 1:1000 por un min y se montaron en un portaobjetos con glicerol al 30% para su posterior observación en el microscopio confocal. Como controles se utilizaron macrófagos sin estímulo y otro grupo sin anticuerpo primario.

### **Inmunización de ratones**

Se inmunizaron seis ratones BALB/c por grupo experimental mediante tres inyecciones intraperitoneales (ip) a intervalos de dos semanas con cualquiera de las siguientes formulaciones en un volumen de 100 µL con PBS: SLA (25 µg), LV, Lc-SLA (25µg), α-GalCer (4 µg), Lc- α-GalCer y Lc-SLA/Lc- α-GalCer. Se contó con un grupo control al que no se le aplicó ningún tratamiento.

### **Infección de ratones BALB/c con *L. mexicana***

La infección estaba planificada para llevarse a cabo tres semanas después de la última inmunización (Eskandari *et al.*, 2014; Firouzmand *et al.*, 2013); sin embargo; se realizó siete meses después debido a la pandemia de COVID 19 ocasionada por el virus SARS-CoV-2.

Los ratones se inocularon por vía subcutánea (SC) en el cojinete plantar con  $1 \times 10^6$  de promastigotes de *L. mexicana* en fase estacionaria en un volumen de 10 µL. Se emplearon jeringas de insulina con agujas calibre 30G.

### **Cuantificación del tamaño de lesión y carga parasitaria**

El progreso de la infección fue monitoreado una vez a la semana mediante la medición del grosor de la almohadilla de la pata usando un calibrador métrico. La clasificación del tamaño de la lesión se realizó restando el grosor de la almohadilla contralateral no infectada de la infectada. En la semana siete post-infección se realizó la eutanasia de los ratones por dislocación cervical, posteriormente se amputó y se maceró el miembro infectado para determinar la carga parasitaria contabilizando los amastigotes en cámara de Neubauer.

### **Producción intracelular de citocinas y citotoxicidad de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup>**

La citotoxicidad y las células positivas a IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 se analizaron por citometría de flujo. Se colectó el ganglio linfático poplíteo del miembro infectado de los ratones de los diferentes grupos experimentales. Se maceró y se contabilizaron las células en cámara de Neubauer. Para analizar la estirpe celular y producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  intracelular, se cultivaron  $6 \times 10^5$  células en medio RPMI con SFB al 10% utilizando los siguientes controles: células sin estímulo (S/E) y células con 50 ng de forbol-miristato-acetato y 1  $\mu$ g de ionomicina (PMA/I); las condiciones de cultivo fueron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 h. Posteriormente se agregó monensina a 1  $\mu$ g/mL por 4 h para detener el tráfico vesicular. Pasado el tiempo se bloqueó con anti CD-16/32 en dilución 1:100. Después de lavar, se marcó con anti-CD3 en APC, anti-CD8 en PE y anti-CD4 en PE-Cy7A, en dilución 1:100. Se fijaron las células con paraformaldehído al 2% durante 20 min a 4 °C, se lavaron y se permeabilizaron con PERM/WASH en dilución 1:10. Se realizó la marca de anti-IFN- $\gamma$  en FITC y anti-TNF- $\alpha$  en Per-CP con PERM/WASH. Tras lavar las células con PERM/WASH, se retiró la solución y se resuspendió en 200  $\mu$ L de PBS. Todas las marcas con anticuerpos se realizaron en dilución 1:100 durante 20 min a 4 °C. Siguiendo la metodología anterior se realizó la marca intracelular para IL-4 e IL-10 con anti-IL-4 en FITC y anti-IL-10 en Pacific Blue respectivamente.

Se emplearon las mismas condiciones experimentales para determinar la citotoxicidad por medio de la expresión de CD107a en la membrana extracelular, puesto que CD107a es un marcador de degranulación en células citotóxicas como T CD8<sup>+</sup> y NK (Campos *et al.*, 2017). Siguiendo la metodología antes descrita, se colocó el anti-CD107a en FITC junto con la monensina durante 2 h, subsecuentemente se bloqueó y se realizó la marca de estirpe celular para T CD8<sup>+</sup>. Posteriormente se lavaron las células, se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 20 min a 4 °C y se resuspendieron en 200 µL de PBS.

### **Análisis estadístico**

Se empleó el programa Graph Pad Prism versión 7.0 (*Software* Graphpad, v. 4.0, San Diego, CA) para el análisis de los datos. Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para evaluar la significancia de las diferencias entre varios grupos con datos normales se realizó un ANOVA de una vía; en el caso de los datos que no pasaron la prueba de normalidad se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. Cuando la comparación múltiple dio un valor de p significativo se utilizó la prueba de Tukey-Kramer para comparar las medias de diferentes grupos. Para evaluar la evolución de la lesión se utilizó un ANOVA de dos vías. Los resultados con  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## **RESULTADOS**

### **Obtención de antígeno y preparación de liposomas**

Se obtuvieron  $6.3 \times 10^9$  parásitos que fueron lisados para conseguir 7.5 mg de SLA. Se utilizó 1 mL del antígeno para reconstituir los liposomas y el sobrante se eliminó para determinar una eficiencia de encapsulación del 50%.

### **Caracterización de antígeno dentro de liposomas**

Se utilizó un SDS-PAGE analítico para caracterizar tanto el SLA solo y el encapsulado en los liposomas, así como liposomas cargados con PBS (Figura 2).

El análisis SDS-PAGE de SLA solo reveló varias bandas de proteínas con un peso molecular en el rango de entre 37 y 250 kDa (Figura 2). El análisis SDS-PAGE de SLA liposomal mostró las mismas bandas que en el SLA solo, por lo que muestra su eficiencia de encapsulación. Como control negativo se utilizaron liposomas cargados con PBS que no mostraron bandas.

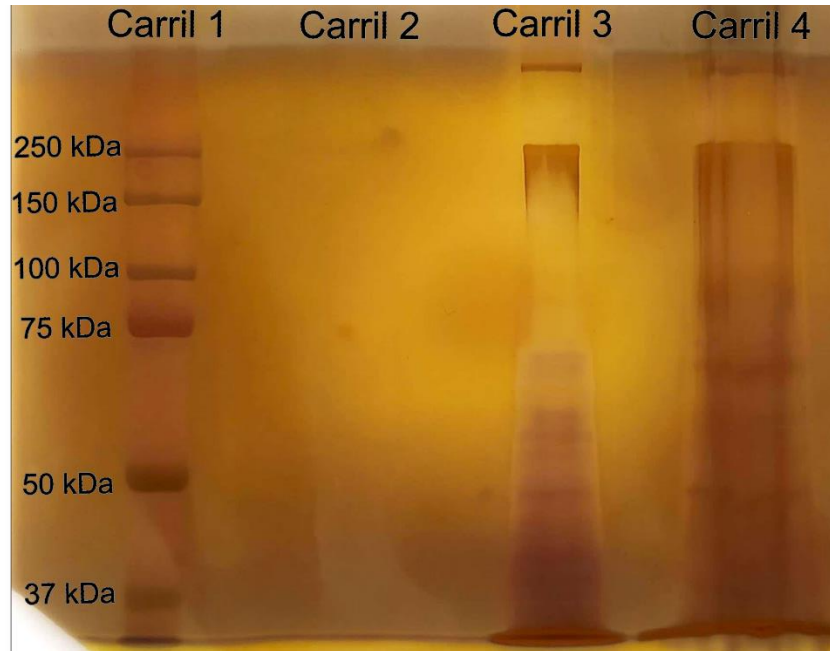


Figura 2. Análisis SDS-PAGE de SLA solo y SLA liposomal. Carril 1, estándar de proteína de peso molecular de bajo rango; carril 2, liposomas con PBS; carril 3, SLA; carril 4, SLA liposomal.

### **Caracterización de liposomas cargados**

Para la caracterización de liposomas se empleó un MET y se determinó un tamaño de entre 50 y 500 nm de diámetro (Figuras 3 y 4).

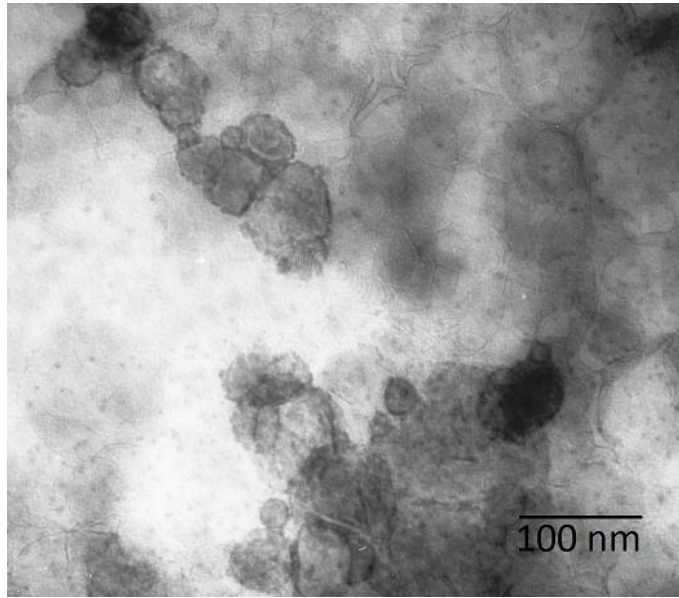


Figura 3. Liposomas cargados con antígenos de *Leishmania mexicana*. Microscopía electrónica de transmisión 100,000 X.

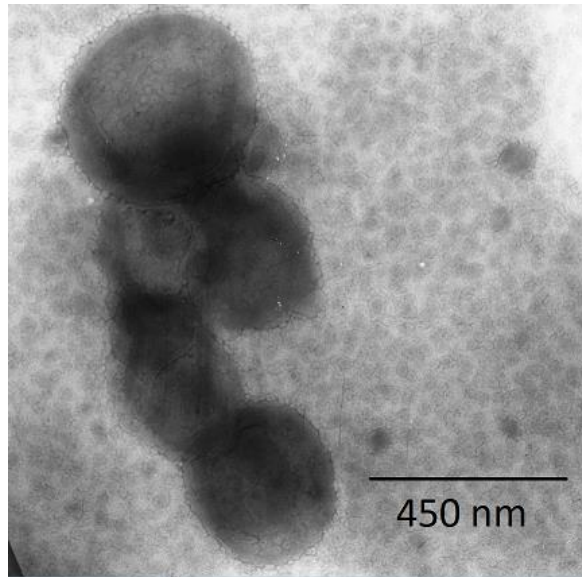


Figura 4. Liposomas cargados con alfa-galactosilceramida. Microscopía electrónica de transmisión 40,000 X.



### Análisis de pureza de macrófagos

Se determinó la pureza de los MO por medio del marcador F4/80 utilizando citometría de flujo, y se demostró que el cultivo era 95% puro (Figura 5).

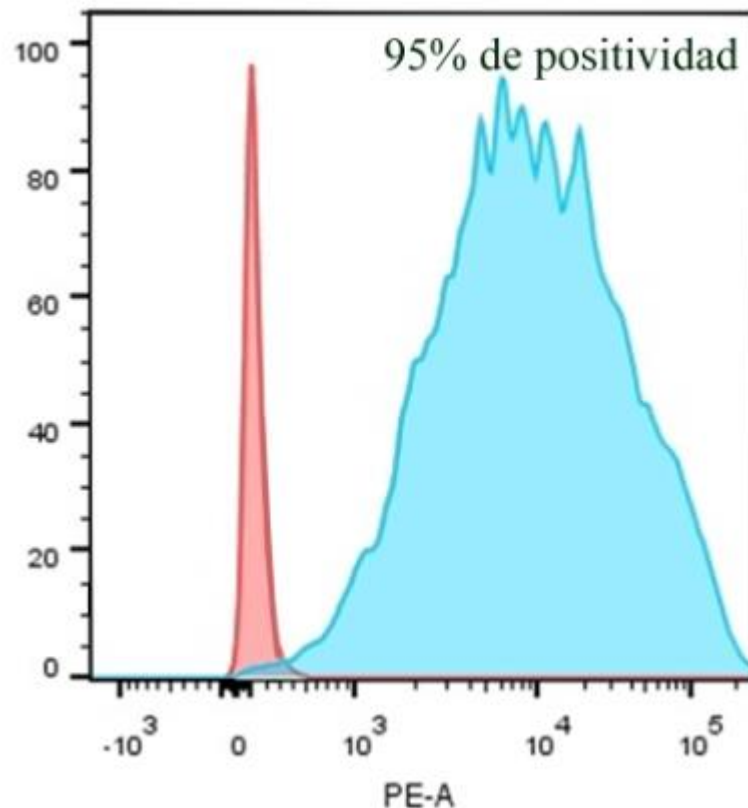


Figura 5. Análisis por citometría de flujo del marcador F4/80 en macrófagos derivados de médula ósea. Rojo: autofluorescencia. Azul: macrófagos que expresan F4/80.

### Internalización de antígenos

Para demostrar que las APCs podían internalizar liposomas cargados con SLA se observaron MO incubados con Lc-SLA por microscopía confocal. Se demostró que los MO que revelaban la tinción verde fluorescente habían internalizado los liposomas cargados con antígenos de *L. mexicana* (Figura 6). En los controles

negativos no se encontraron células que revelaran la presencia el antígeno (Figura 7).

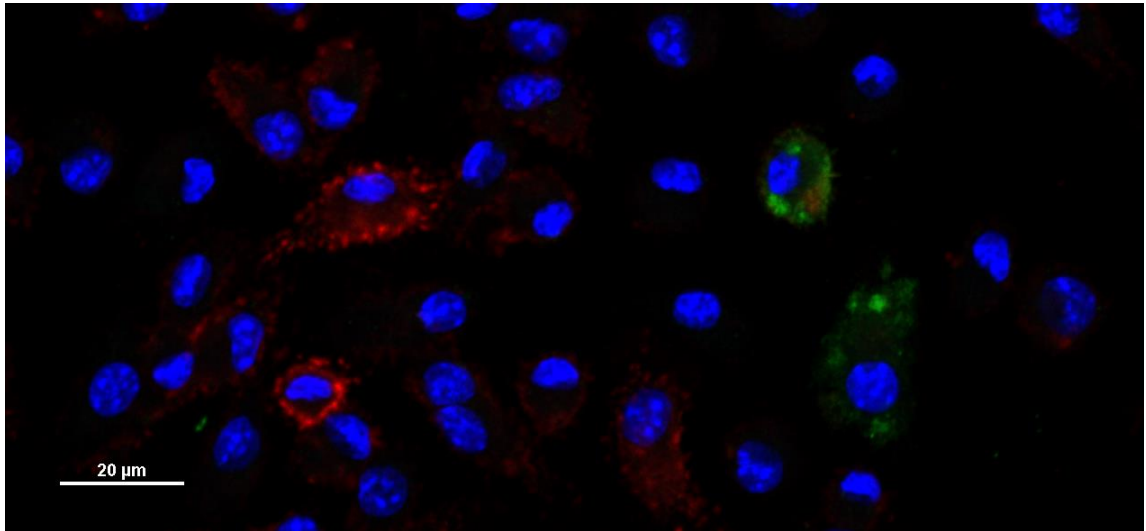


Figura 6. MO incubados con Lc-SLA en FITC (verde fluorescente) que revelan el marcador F4/80 en PE (rojo) y tinción nuclear con DAPI (Azul). Imagen de microscopía confocal.

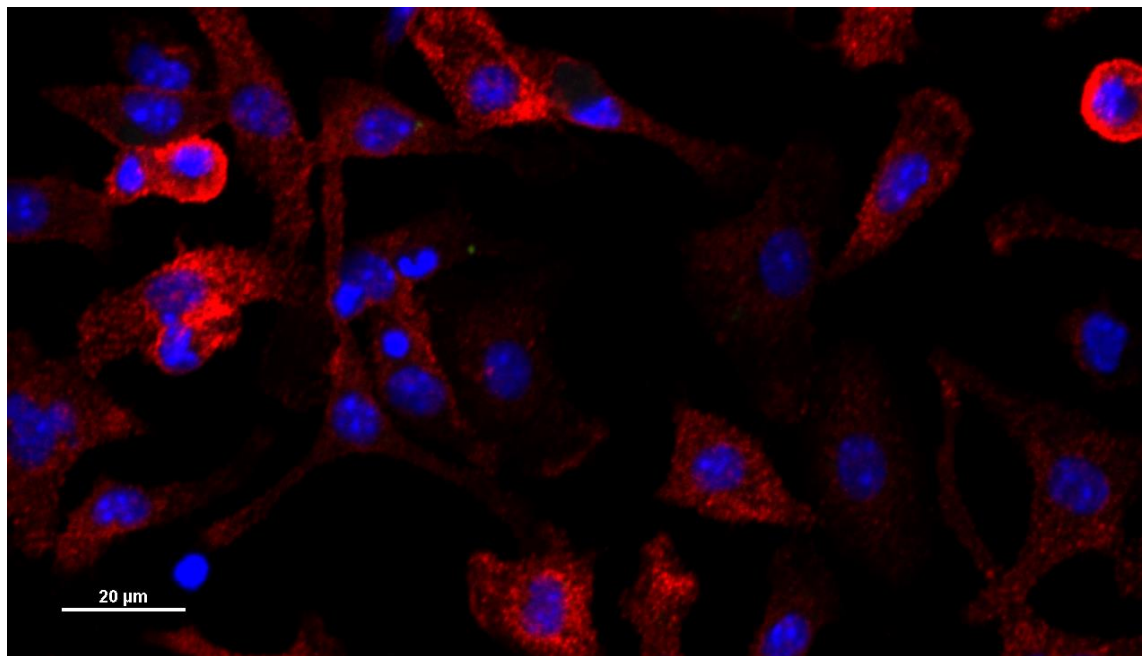


Figura 7. MO sin estímulo que revelan el marcador F4/80 en PE (rojo) y tinción nuclear con DAPI (Azul). Imagen de microscopía confocal.

## Cuantificación del tamaño de la lesión y carga parasitaria de los grupos experimentales

Tras la infección se monitoreó el progreso del tamaño de la lesión durante siete semanas. Se observó un aumento en el tamaño de la lesión más prematuro en los ratones SN TX y en el grupo con  $\alpha$ -GalCer. En contraste, el grupo con Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer mostró un ligero incremento en el tamaño de la lesión, siendo poco evidente a simple vista. Adicionalmente, este grupo mostró una diferencia estadísticamente significativa respecto a los grupos SN TX,  $\alpha$ -GalCer y Lc-SLA con un valor de  $p < 0.0001$ , y con respecto al grupo SLA un valor de  $p < 0.001$ . Los grupos con LV y Lc- $\alpha$ -GalCer presentaron una tendencia hacia una lesión de menor tamaño con respecto al resto de los grupos control (Figura 8). Posteriormente se obtuvieron los miembros infectados para cuantificar la carga parasitaria. El grupo inmunizado con Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer también reveló una carga parasitaria menor con respecto al grupo SN TX y  $\alpha$ -GalCer ( $p < 0.001$ ). Los grupos con Lc-SLA y LV mostraron una tendencia a una menor carga parasitaria con respecto al resto de los grupos control (Figura 9).

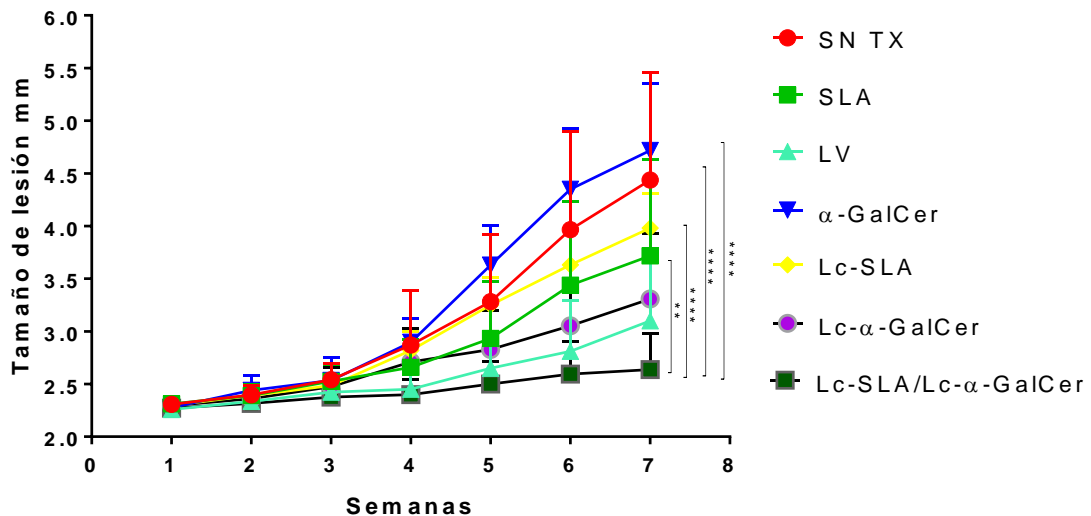


Figura 8. Tamaño de la lesión de la almohadilla de ratones BALB/c infectados con promasigotes de *L. mexicana* y previamente inmunizados con SLA, LV, Lc-SLA,  $\alpha$ -GalCer, Lc- $\alpha$ -GalCer, Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer y SN TX. Cada punto representa el tamaño promedio en el grosor de la almohadilla de la pata.  $\pm$  DE (n=6 para todos los grupos excepto Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer n=4). Los asteriscos sobre la línea indican diferencias significativas entre los grupos. \*\*,  $p < 0.01$  y \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .

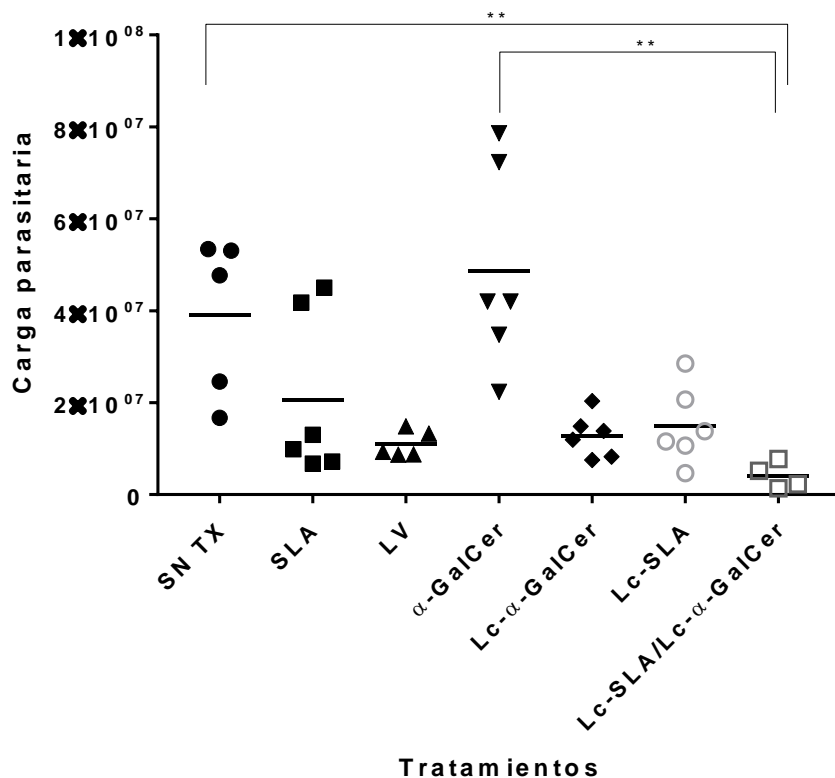


Figura 9. Carga parasitaria de la almohadilla de ratones BALB/c infectados con promasigotes de *L. mexicana* y previamente inmunizados con SLA, LV, Lc-SLA,  $\alpha$ -GalCer, Lc- $\alpha$ -GalCer, Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer y SN TX. Cada símbolo representa a un individuo (SLA, Lc-SLA,  $\alpha$ -GalCer,  $\alpha$ -GalCer n=6, LV y SN TX n=5 y Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer n=4). Los asteriscos sobre la línea indican diferencias significativas entre los grupos. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01 y \*\*\*, p<0.001.

### Proporción de población de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>

Se analizó el porcentaje de población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, así como su proporción mediante citometría de flujo. En el grupo SN TX presentó un 57% de células T CD4<sup>+</sup> y un 36% de células T CD8<sup>+</sup>, obteniéndose una proporción T CD4<sup>+</sup>/T CD8<sup>+</sup> cercana a 1.8, mientras que los grupos Lc-SLA y Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer presentaron un porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> entre 40 y 44% con una relación de 1.2 y 1.1, respectivamente. El resto de los grupos revelaron un porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> alrededor del 50% y de T CD8<sup>+</sup> alrededor del 35% con una relación cercana a 1.5 (Figura 10).

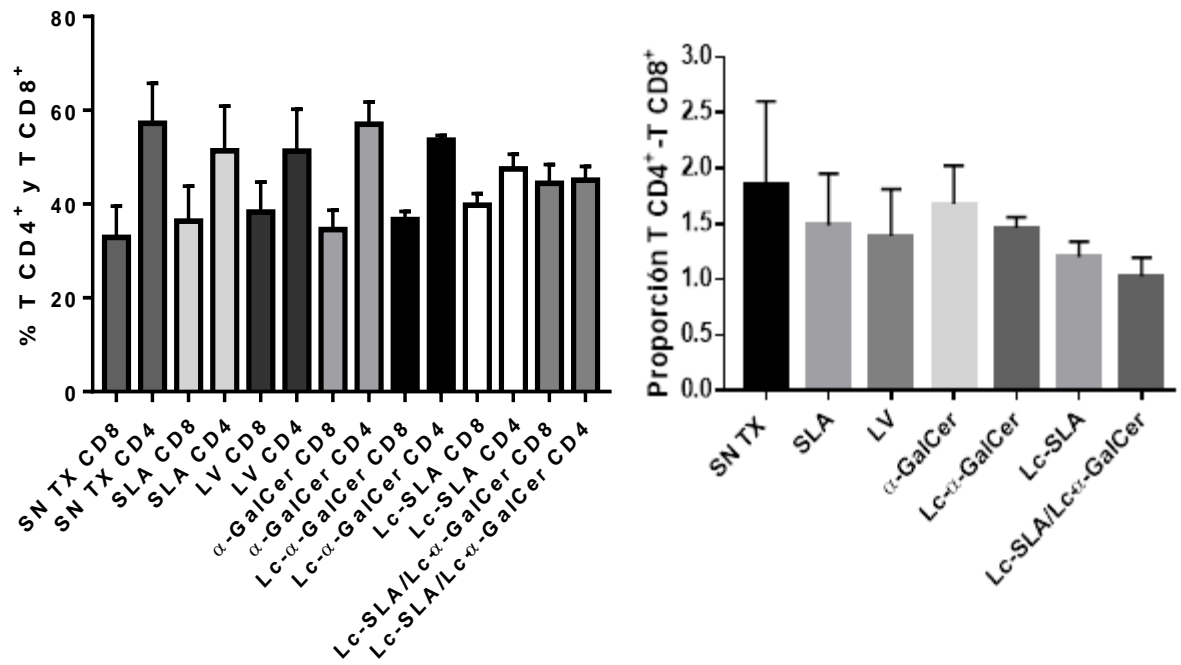


Figura 10. Porcentaje y proporción de población T CD4<sup>+</sup>/T CD8<sup>+</sup> de ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L. mexicana* y previamente inmunizados con SLA, LV, Lc-SLA, α-GalCer, Lc- α-GalCer, Lc-SLA/Lc- α-GalCer y SN TX. Los datos representan la media del porcentaje y de la proporción ± DE (n=4), respectivamente.

### **Citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias de linfocitos T CD8+ y T CD4+**

Se analizó la producción intracelular de citocinas pro y anti-inflamatorias por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> mediante citometría de flujo. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> positivos a IFN- $\gamma$  fue mayor ( $p < 0.05$ ) en el grupo con Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer que en el resto de los grupos (Figura 11 A y B). En cuanto a las células positivas a TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 no hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos (Figura 11 C, D, E, F, G y H). Sin embargo, se observó en general una mayor cantidad de células CD4 positivas a estas citocinas en comparación con las células T CD8<sup>+</sup>.

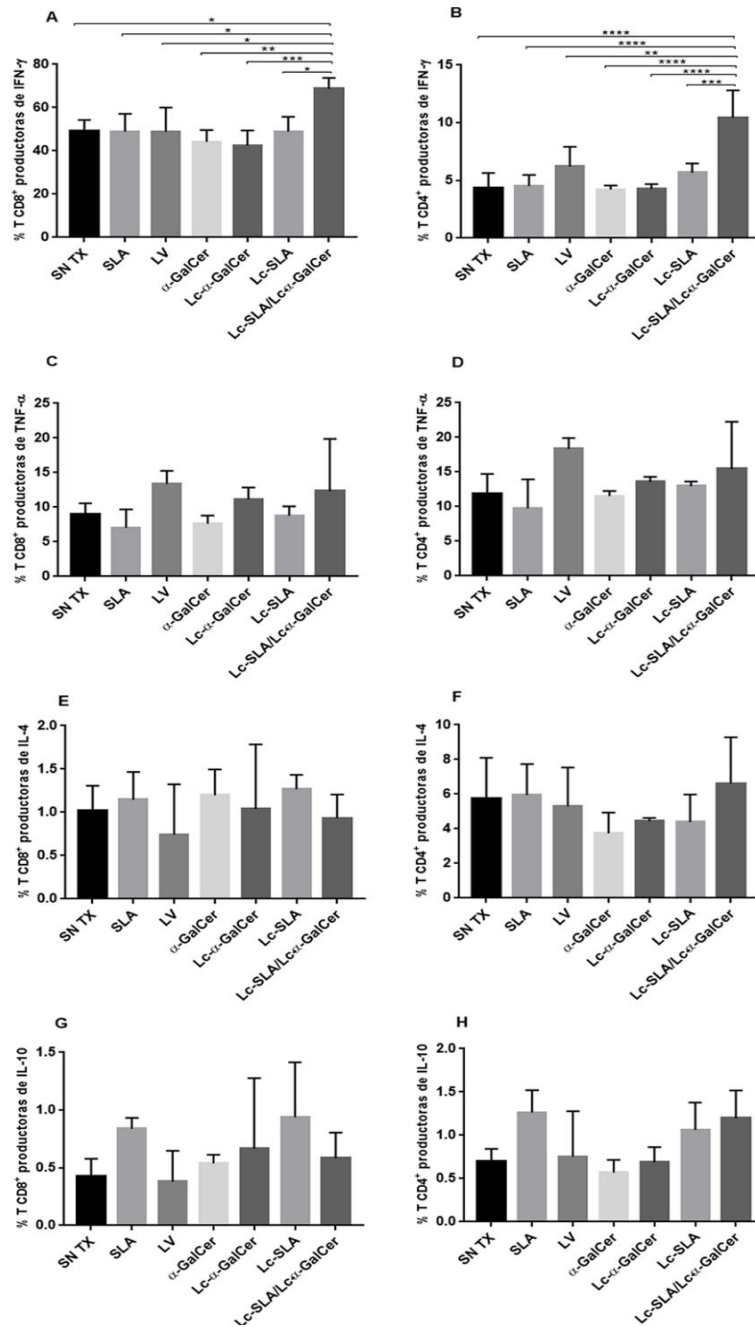


Figura 11. Citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup> en respuesta a la infección por *L. mexicana*. Se aislaron las células de los ganglios poplíteos provenientes de ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L. mexicana* y previamente inmunizados con SLA, LV, Lc-SLA,  $\alpha$ -GalCer, Lc-  $\alpha$ -GalCer, Lc-SLA/Lc-  $\alpha$ -GalCer y SN TX. Se analizaron por medio de citometría de flujo las células T CD8<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup> estimuladas con PMA e Ionomicina para la expresión intracelular de IFN- $\gamma$  (A y B), TNF- $\alpha$  (C y D), IL-4(E y F) e IL-10 (G y H). Los datos representan la media del porcentaje  $\pm$  DE (n=4). Los asteriscos sobre la línea indican diferencias significativas entre los grupos. \*, p<0,05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001 y \*\*\*\*, p<0.0001.

## Citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad por parte de los T CD8<sup>+</sup> se analizó el porcentaje de expresión de CD107a mediante citometría de flujo. El grupo con Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer mostró una mayor expresión de CD107a en comparación al resto de los grupos ( $p < 0.05$ ).

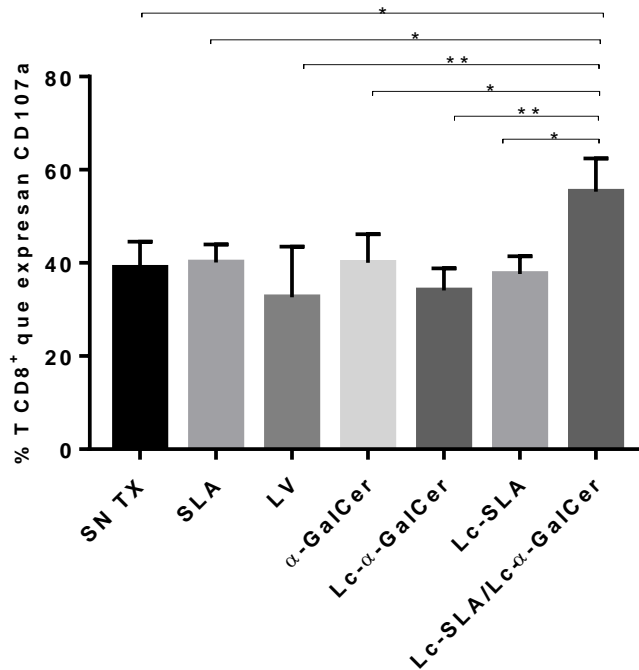


Figura 12. Citotoxicidad de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en respuesta a la infección por *L. mexicana*. Se aislaron las células de los ganglios poplíteos provenientes de ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L. mexicana* y previamente inmunizados con SLA, LV, Lc-SLA,  $\alpha$ -GalCer, Lc- $\alpha$ -GalCer, Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer y SN TX. Se analizaron por medio de citometría de flujo las células T CD8<sup>+</sup> para la expresión extracelular de CD107a. Los datos representan la media del porcentaje  $\pm$  DE ( $n=4$ ). Los asteriscos sobre la línea indican diferencias significativas entre los grupos. \*,  $p < 0.05$  y \*\*,  $p < 0.01$ .

## DISCUSIÓN

Actualmente la leishmaniasis sigue siendo un problema de salud pública en países endémicos, por lo que los esfuerzos están enfocados a generar respuestas inmunoprotectoras tanto de linfocitos T CD4<sup>+</sup> como T CD8<sup>+</sup>; estos últimos han



despertado un creciente interés debido a su papel controvertido en la enfermedad. Mientras que algunas investigaciones los han correlacionado con la exacerbación de la enfermedad (Belkaid *et al.*, 2002; Novais *et al.*, 2013), otras han demostrado que participan en la resistencia y control de la leishmaniasis al ser capaces de eliminar a los macrófagos infectados y de producir IFN- $\gamma$  que activa al macrófago permitiendo la eliminación del parásito (Novais y Scott, 2015). Estudios por otros autores han demostrado que el empleo de liposomas catiónicos y  $\alpha$ -GalCer induce respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en diferentes modelos infecciosos y cáncer (Okazaki *et al.*, 2018). Es por ello que, para evaluar la utilidad potencial de estos elementos inmunoestimuladores, en este trabajo se utilizaron liposomas cargados con antígenos de *L. mexicana* y  $\alpha$ -GalCer con el fin de activar a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, ya que ha sido observado que participan en el control de la infección en la leishmaniasis.

Se empleó el SLA que es una mezcla de antígenos que tiene muchos epítomos y ha sido considerado como un candidato vacunal cuando se utiliza junto con un sistema de administración como los liposomas, potenciando respuestas proliferativas de células T específicas de antígenos y en la producción de anticuerpos (Bhowmick *et al.*, 2007). Uno de los primeros pasos en el estudio consistió en analizar el SLA mediante electroforesis. Se pudieron apreciar fracciones de diferentes pesos moleculares incluido una de 63 kD, la cual podría representar a la proteína inmunodominante gp63, que se ha propuesto como candidato vacunal (Bhowmick *et al.*, 2008).

Debido a la eficiencia reportada de SLA asociada con el sistema de administración (Afrin *et al.*, 2002), en este trabajo se utilizaron liposomas a base de L-fosfatidilcolina, un fosfolípido de carga neutra, junto con colesterol y esterilamina. Este último compuesto sintético posee una carga positiva, por lo que los liposomas generados fueron catiónicos.

Se ha reportado que los liposomas catiónicos son absorbidos por las APC de manera más eficiente que los liposomas neutrales o cargados negativamente (Bhowmick *et al.*, 2007; Maji *et al.*, 2016). Esto se debe a que las cargas positivas son capaces de interactuar con moléculas con carga negativa en la superficie de las APC, permitiendo que los antígenos sean endocitados (Lonez *et al.*, 2008). Por otro lado, es conocido que los liposomas tienen cualidades fusogénicas que permiten el acceso de los antígenos al citosol e inducen la presentación a través del MHC-I para la activación de células T CD8<sup>+</sup> (Eiji, 2018).

En la leishmaniasis ha sido demostrado que los liposomas cargados con antígenos mejoran su potencial al inocularse con otro adyuvante como como BCG (Sohrabi *et al.*, 2005), MPL-TDM (dicorinomicolato de monofosforil lípido-trehalosa) (Ravindran *et al.*, 2012) o CpG ODN (oligodesoxinucleótidos de citosina fostato guanina) (Shargh *et al.*, 2012). Considerando dichas observaciones, se optó por utilizar  $\alpha$ -GalCer, un adyuvante que no ha sido probado en formulación liposomal en la leishmaniasis, aunque ha demostrado generar una buena estimulación inmunológica en esta enfermedad. Además, se ha mostrado que  $\alpha$ -GalCer induce la maduración de las APC, permitiendo una activación eficiente de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en modelos de cáncer (Dondji *et al.*, 2008, Gillespie *et al.*, 2016; Okazaki *et al.*, 2018; Zamora-Chimal *et al.*, 2017).

Una vez determinada la composición de los liposomas, calculamos una eficiencia de encapsulación de alrededor del 50%, lo cual está dentro del rango reportado en trabajos como el de Firouzmand *et al.* (2013), quienes obtuvieron una eficiencia de encapsulación del SLA de  $61.0 \pm 13.9$ , y el de Eskandari *et al.* (2014), quienes reportaron una eficiencia de  $45.9 \pm 6.2\%$ .

Es reconocido que el tamaño de las partículas juega un papel significativo en el tráfico de vesículas a los ganglios linfáticos, y en la absorción y procesamiento de antígenos por las APC (Oussoren y Storm, 2001). Las partículas grandes de 500 nm a 2  $\mu$ m suelen ser absorbidas por DC en el lugar de la inoculación, mientras que

las partículas pequeñas (<200 nm) se drenan libremente hacia los linfonodos de drenaje (LNd), ahí son absorbidas por las células fagocíticas (DC y macrófagos) (Henriksen-Lacey *et al.*, 2011).

Los resultados de MET en este estudio mostraron Lc-SLA de entre 50 y 150 nm, y Lc- $\alpha$ -GalCer de 300 a 500 nm, parecido a lo reportado diversos autores (Eskandari *et al.*, 2014; Firouzmand *et al.*, 2013; Maji *et al.*, 2016). Lo anterior sugiere que los Lc-SLA pudieron llegar a los LNd y ser captados por DC y macrófagos. Por su parte, los Lc- $\alpha$ -GalCer también pudieron ser más fácilmente captados por células en el sitio de inoculación.

La distribución intracelular de liposomas fue descrita por Maji *et al.* (2016), incubando liposomas catiónicos con DC. Ellos observaron por microscopía confocal que una parte de los liposomas se encontraba en compartimentos fagocíticos y otra se encontró dispersa en el citosol. Estos liposomas al ser cargados con gp63 fueron capaces de inducir la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> cuando se inocularon *in vivo* en ratones BALB/c y dicho efecto se vio potenciado cuando se inocularon junto con el adyuvante MPL-TDM. En nuestro estudio, antes de inocular los liposomas *in vivo* se verificó si estos podían ser internalizados por macrófagos *in vitro*. La microscopía confocal mostró antígenos de *Leishmania* dentro de los macrófagos. La observación detallada mostró zonas de antígeno con bordes definidos compatibles con compartimentos endosómicos, mientras que otra parte del antígeno se observó disperso en el citosol. Posiblemente estos antígenos dispersos estuvieron disponibles para la degradación por el proteosoma y la subsecuente carga en el MHC-I, permitiendo la presentación de antígenos y la subsecuente activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>

Después de confirmar que los liposomas fueron internalizados por una APC *in vitro*, se analizó si eran capaces de activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> *in vivo*, y si esta activación se podía relacionar con la protección contra la LC causada por *L. mexicana*. Durante el seguimiento de la lesión se observó que los ratones del grupo inmunizado con

Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer mantuvieron durante todo el experimento una lesión de menor tamaño ( $p < 0.05$ ) con respecto a los ratones de los grupos SN TX,  $\alpha$ -GalCer, SLA y Lc-SLA. Esta observación fue consistente con la menor carga parasitaria observada en los ratones inoculados con liposomas cargados con SLA y el adyuvante.

El papel adyuvante del  $\alpha$ -GalCer fue reportado por Dondji *et al.* (2008), quienes emplearon ratones BALB/c inmunizados con el antígeno p36 y  $\alpha$ -GalCer, logrando reducir la carga parasitaria y el tamaño de la lesión en comparación con los ratones inmunizados solo con p36. Este fenómeno fue adjudicado a la producción de IFN- $\gamma$  por las células T CD4<sup>+</sup>, y una mayor citotoxicidad de las células T CD8<sup>+</sup>. A su vez, Jayakumar *et al.* (2011) mostraron que el control de la enfermedad era dependiente de la población T CD8<sup>+</sup>, puesto que su eliminación anuló la protección generada por la vacuna en el modelo de *L. panamensis*.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el los liposomas cargados con SLA junto con el adyuvante generaron una respuesta inmune protectora, puesto que con la administración de SLA solo o Lc-SLA se observaron lesiones de mayor tamaño incluso que los grupos con LV y Lc- $\alpha$ -GalCer. Se puede deducir que el inóculo de Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer promueve una respuesta Th1 a través de la activación de células iNKT, contribuyendo a la producción de varias citocinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$  e IL-12 (Shimizu *et al.*, 2007). El IFN- $\gamma$  a su vez podría permitir la activación de la iNOS con la subsecuente producción de NO en los macrófagos dándoles su capacidad leishmanicida (Wilkins-Rodríguez *et al.*, 2010)

Por otra parte, en este trabajo también se observó un desarrollo de la lesión más temprano en el grupo inmunizado únicamente con  $\alpha$ -GalCer, así como en los ratones SN TX. Así mismo, los ratones que únicamente fueron inoculados con  $\alpha$ -GalCer desarrollaron una lesión más grande y evidente, que se mantuvo en crecimiento hasta el final del experimento y en los cuales también se encontró una mayor carga parasitaria. Una respuesta negativa al  $\alpha$ -GalCer ya ha sido descrita en un modelo de LVs por *L. donovani*; donde se observó la exacerbación de la

enfermedad tras la estimulación con  $\alpha$ -GalCer en ratones C57BL/6. Este resultado fue relacionado con una disminución en la producción de IFN- $\gamma$  por parte de los T CD8<sup>+</sup> (Stanley *et al.*, 2008). Con base en estos antecedentes y por lo reportado en este estudio, se puede deducir que el  $\alpha$ -GalCer por sí solo no propicia una respuesta inmune eficiente.

Para el caso de SLA, el aumento en el tamaño de la lesión ya ha sido reportado, adjudicado a que en ausencia de cualquier adyuvante promotor de respuestas de tipo Th1, los ratones BALB/c continúan con su tendencia inherente a desarrollar respuestas de tipo Th2 (Afonso *et al.*, 1994; Bhowmick *et al.*, 2007). En este trabajo los Lc-SLA si bien no disminuyeron el tamaño de la lesión, en el análisis de la carga parasitaria se observó una carga menor que con el SLA solo, por lo que podrían estar generando una respuesta inmune que controla en cierto punto al parásito, pero no es capaz de contener la inflamación.

Para definir si el tamaño de la lesión y la carga parasitaria estaban relacionadas con la activación de T CD8<sup>+</sup>, se analizó el porcentaje de células CD8 positivas a citocinas tanto pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) como anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10), y la expresión de CD107a como marcador de citotoxicidad. Adicionalmente, se analizaron las mismas citocinas para T CD4<sup>+</sup> para poder definir si la respuesta favorable del grupo inmunizado con Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer era en su mayoría dependiente de estas células, y no de los T CD8<sup>+</sup>.

Normalmente la población T CD4<sup>+</sup> es mayor que la de T CD8<sup>+</sup>, presentándose proporciones entre 1.5 y 2.5 (McBride y Striker *et al.*, 2017; Sim *et al.*, 1998). En este estudio la citometría de flujo mostró que el grupo SN TX tenía una relación T CD4<sup>+</sup>/T CD8<sup>+</sup> cercana a 1.8, mientras que los grupos SLA, LV,  $\alpha$ -GalCer y Lc- $\alpha$ -GalCer expresaban una proporción cercana a 1.5. Interesantemente, los grupos de Lc-SLA y Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer presentaron una proporción 1.2 y 1.1, respectivamente, lo que muestra un aumento en la población de T CD8<sup>+</sup> aunque no de manera estadísticamente significativa. No obstante, existe la posibilidad de que

los liposomas cargados con antígenos con o sin adyuvante favorezcan la proliferación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Un aumento en la población de T CD8<sup>+</sup> en proporciones similares a las de T CD4<sup>+</sup> (1.1) ha sido reportado en el proceso de curación de pacientes con LCL causada por *L. braziliensis*. En contraste, cuando estas infecciones eran activas, se observaban proporciones más altas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que T CD8<sup>+</sup> (Da-Cruz *et al.*, 2002). El incremento en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> también ha sido reportado durante el proceso de curación de pacientes con LCL ocasionada por *L. mexicana* (Salaiza *et al.*, 1999). Con base en estos datos se puede sugerir que el aumento en la población T CD8<sup>+</sup> contribuyó al control de la enfermedad en este modelo.

En otro modelo experimental se había mostrado que es necesaria la participación tanto de células T CD4<sup>+</sup> como de células T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  para el control de la infección causada por *L. infantum* (Mary *et al.*, 1999) debido a que IFN- $\gamma$ , además de activar al macrófago, también induce la presentación cruzada de antígenos a través de la regulación positiva de moléculas del MHC-I (Zhou, 2009). Aunado a esto, el IFN- $\gamma$  mejora la motilidad y la citotoxicidad de los T CD8<sup>+</sup>.

En el presente trabajo, se observó un aumento significativo de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  en el grupo inmunizado con Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer, por lo que se puede deducir que todo el conjunto de liposomas cargados y el adyuvante favorecen la activación tanto de T CD8<sup>+</sup> como de T CD4<sup>+</sup>.

En relación a la capacidad citotóxica de los T CD8<sup>+</sup>, un estudio realizado por Kaushal *et al.* (2014) mostró un posible papel de estas células en la resistencia a la infección por *L. donovani* en pacientes recuperados de LVs, gracias a su actividad citotóxica a través de la producción de granzima B. Este efecto también se observó en un modelo de tumor de ratón donde se utilizaron liposomas cargados con antígeno tumoral y  $\alpha$ -GalCer donde se logró estimular eficazmente la producción de IFN- $\gamma$  y la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, generando efectos profilácticos y terapéuticos en contra del tumor. Estos resultados no se observaron

al utilizar el antígeno tumoral solo o los liposomas cargados con PBS (Okazaki *et al.*, 2018).

El presente trabajo también mostró que la expresión de CD107a en el grupo inmunizado con Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer fue significativamente mayor que en el resto de los grupos, por lo que la actividad citotóxica de los T CD8<sup>+</sup> podría estar relacionada con el control de la enfermedad.

El trabajo actual no mostró diferencias significativas en la producción de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> entre los grupos. Cabe mencionar que TNF- $\alpha$  es una citocina crucial en la cascada inflamatoria al activar la respuesta inmune Th1, que mejora la actividad de los macrófagos, y es esencial para la formación y mantenimiento de granulomas (Wallis *et al.*, 2005). Dado que esta citocina también puede ser producida por otras células del sistema inmune, como los macrófagos (Chu, 2013), se tendrían que analizar distintas células mediante estudios *in vitro* para poder evaluar su participación en este modelo. Lo mismo aplicaría para la citocina IL-10, que se ha relacionado con la persistencia del parásito (Belkaid *et al.*, 2001) y en la cual tampoco se encontraron diferencias significativas en los grupos.

Así mismo, en nuestro estudio la producción de IL-4 no fue significativamente distinta entre los grupos. El papel de esta citocina en inducir respuestas tipo Th1 o Th2 es controversial, ya que niveles altos se han asociado con una respuesta tipo Th2 y exacerbación de la enfermedad, sin embargo, también se ha asociada con una respuesta Th1 (Kamogawa *et al.*, 1993), dado que su secreción temprana impulsa la secreción de IFN- $\gamma$  (Noble y Kemeny, 1995; Platzer *et al.*, 1992; Hurdal y Brombacher, 2014). Así mismo, los estudios de Firouzmand *et al.* (2013) y Ravindran *et al.* (2012) mostraron que la IL-4 no siempre dicta el desenlace de la leishmaniasis, a diferencia de IFN- $\gamma$  que se correlacionó con mejor protección.

## CONCLUSIÓN

La administración de Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer en ratones indujo una mayor cantidad de linfocitos T CD4 y CD8 positivas a IFN- $\gamma$ , lo que sugiere una mayor expresión de esta citocina.

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> expresaron una mayor cantidad de CD107a en los ratones que fueron inmunizados con Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer, por lo que indica una mayor actividad citotóxica.

Los ratones inoculados con Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer mostraron lesiones de menor tamaño y severidad que los ratones de los otros grupos cuando fueron infectados con *L. mexicana*. Así mismo los ratones inoculados con Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer tuvieron una menor carga parasitaria que los ratones del grupo testigo, lo que indica una respuesta inmune protectora a través de la producción de IFN- $\gamma$  y la actividad citotóxica de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

## PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos durante esta investigación permiten plantear el posible desarrollo de un sistema de protección contra *L. mexicana*. Esto último debido a que se observó la disminución de la carga parasitaria y el tamaño de lesión en los ratones inoculados con Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer.



## APÉNDICE

### Tamaño de lesión

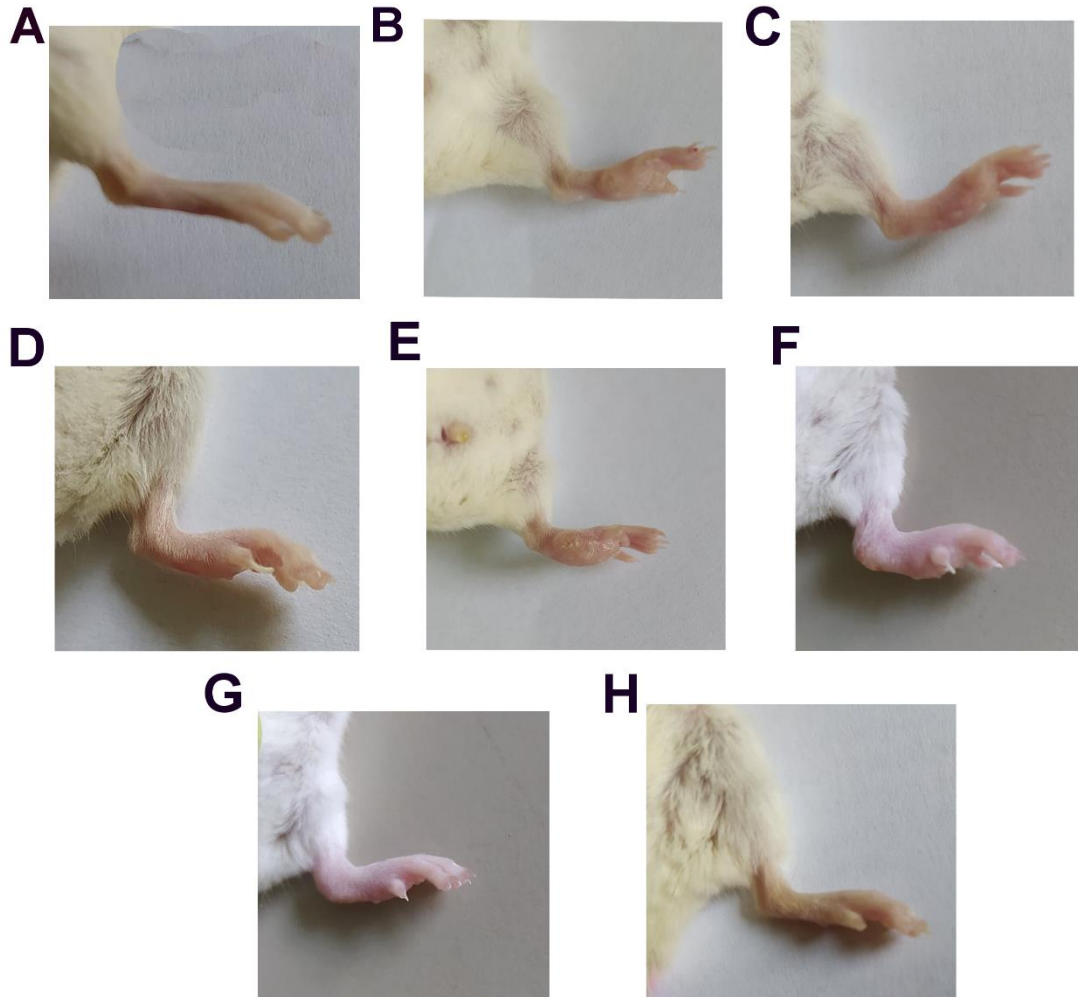


Figura 13. Imágenes ilustrativas del tamaño de la lesión de la almohadilla izquierda de ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L. mexicana* y previamente inmunizados con los siguientes protocolos: **A.** Sano. Almohadilla normal sin ninguna lesión **B.** SN TX. Almohadilla que presenta una lesión nodular rosa de aproximadamente 6 mm **C.** SLA, Almohadilla que presenta una lesión nodular rosa de aproximadamente 4 mm **D.** LV. Almohadilla que presenta una lesión nodular rosa de aproximadamente 4 mm **E.**  $\alpha$ -GalCer. Almohadilla que presenta una lesión nodular rosa de bordes irregulares de aproximadamente 6.5 mm con zonas erosionadas de 0.5 mm en los bordes laterales de la pata. **F.** Lc-SLA. Almohadilla que presenta una lesión nodular rosa de aproximadamente 5 mm y que se extiende hasta el talón. **G.** Lc- $\alpha$ -GalCer. Almohadilla que presenta una lesión nodular rosa de aproximadamente 4 mm y que se extiende hasta el talón **H.** Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer. La almohadilla no presenta lesión visible.

# Citometría de flujo

## Control de Autofluorescencia

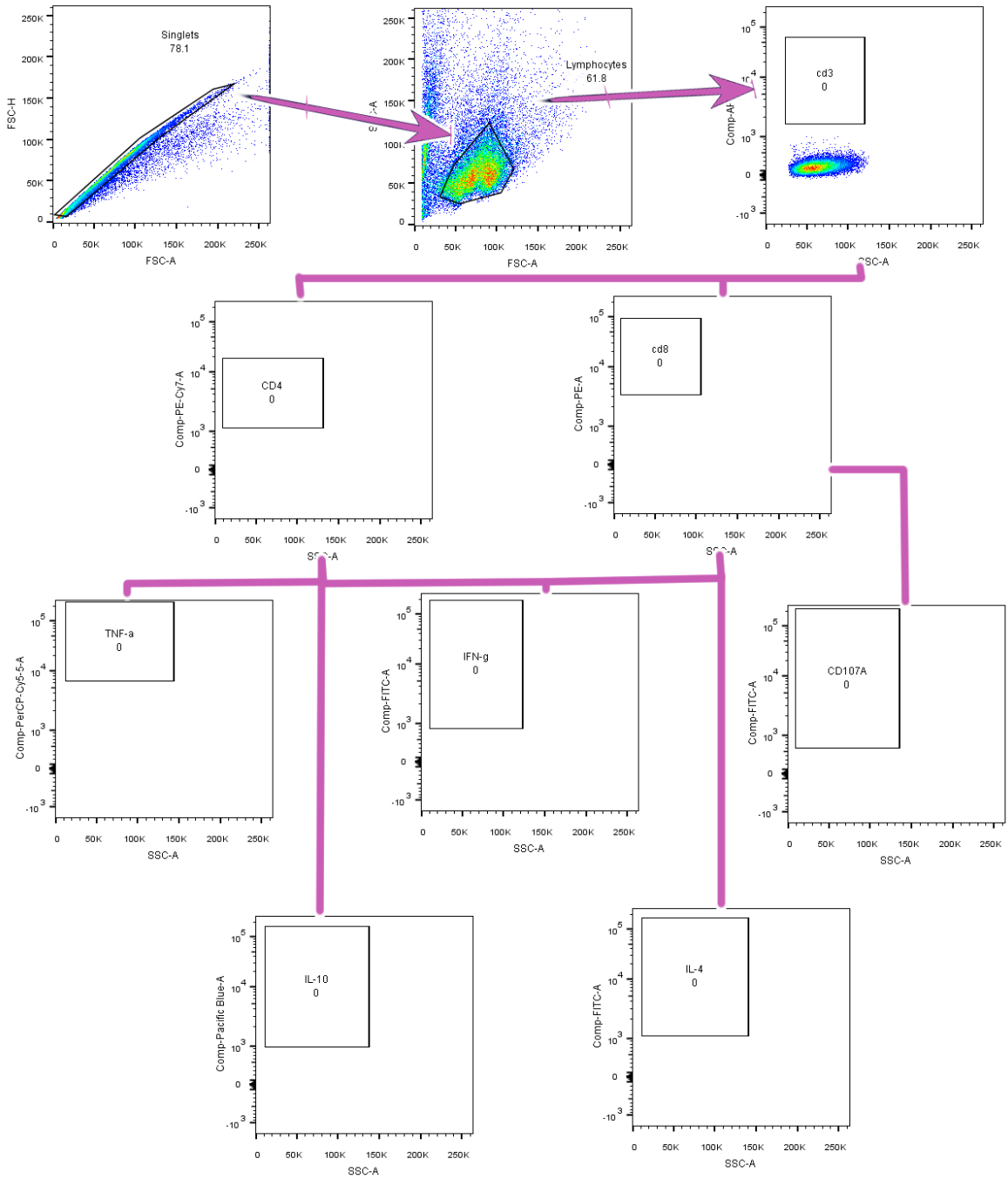


Figura 14. Autofluorescencia. Los gráficos *dotplot* de citometría de flujo muestran la autofluorescencia de las células en el canal de APC, donde se observó la expresión de CD3.

Controles de fluorescencia: *Fluorescence Minus One* (FMO), FITC y PercP

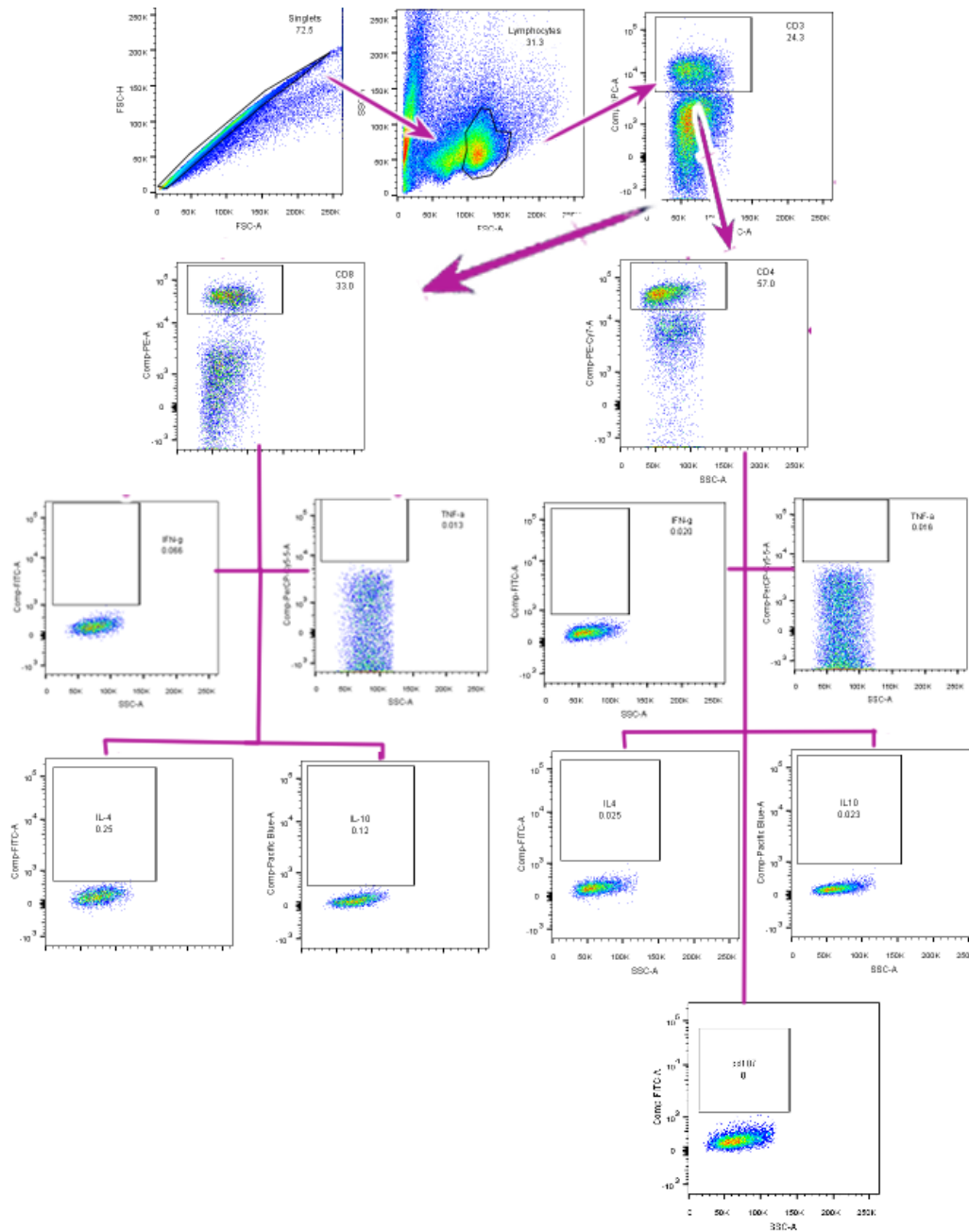


Figura 15. Controles de fluorescencia. *Dotplots* representativos de citometría de flujo para: *Fluorescence Minus One* (FMO), FITC y PerCP. El FMO es el control interno de la técnica para determinar el punto de corte entre la emisión de fluorescencia de fondo y las muestras analizadas para evaluar la producción de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-4, IL-10 y CD107a.

## Estrategia de análisis de la producción de CD107a en linfocitos T CD8<sup>+</sup>

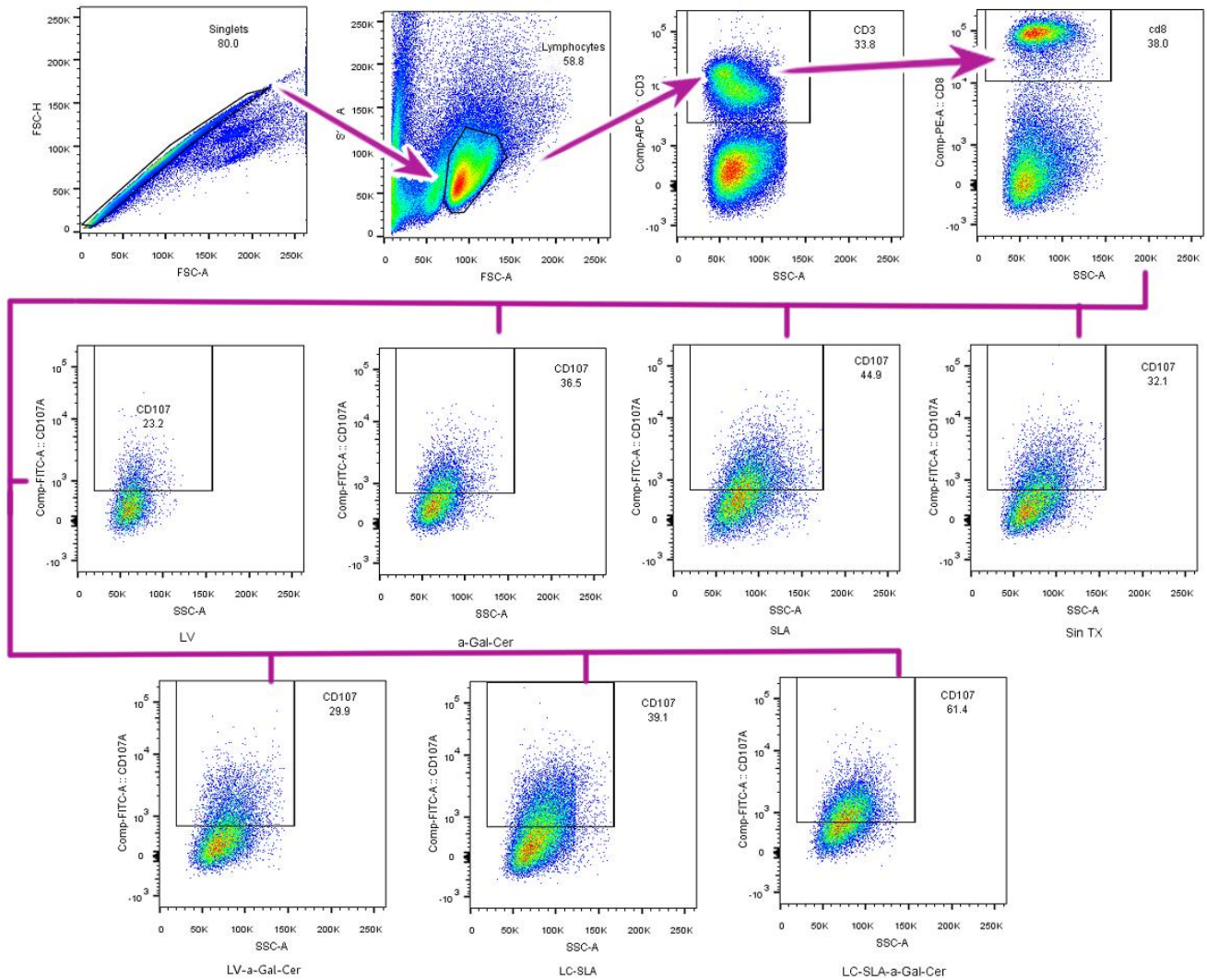


Figura 16. Expresión de CD107a. *Dotplots* representativos de citometría de flujo que muestran la frecuencia CD107a expresados por células T CD8<sup>+</sup>.

## Estrategia de análisis de la producción de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ por linfocitos T CD8<sup>+</sup>

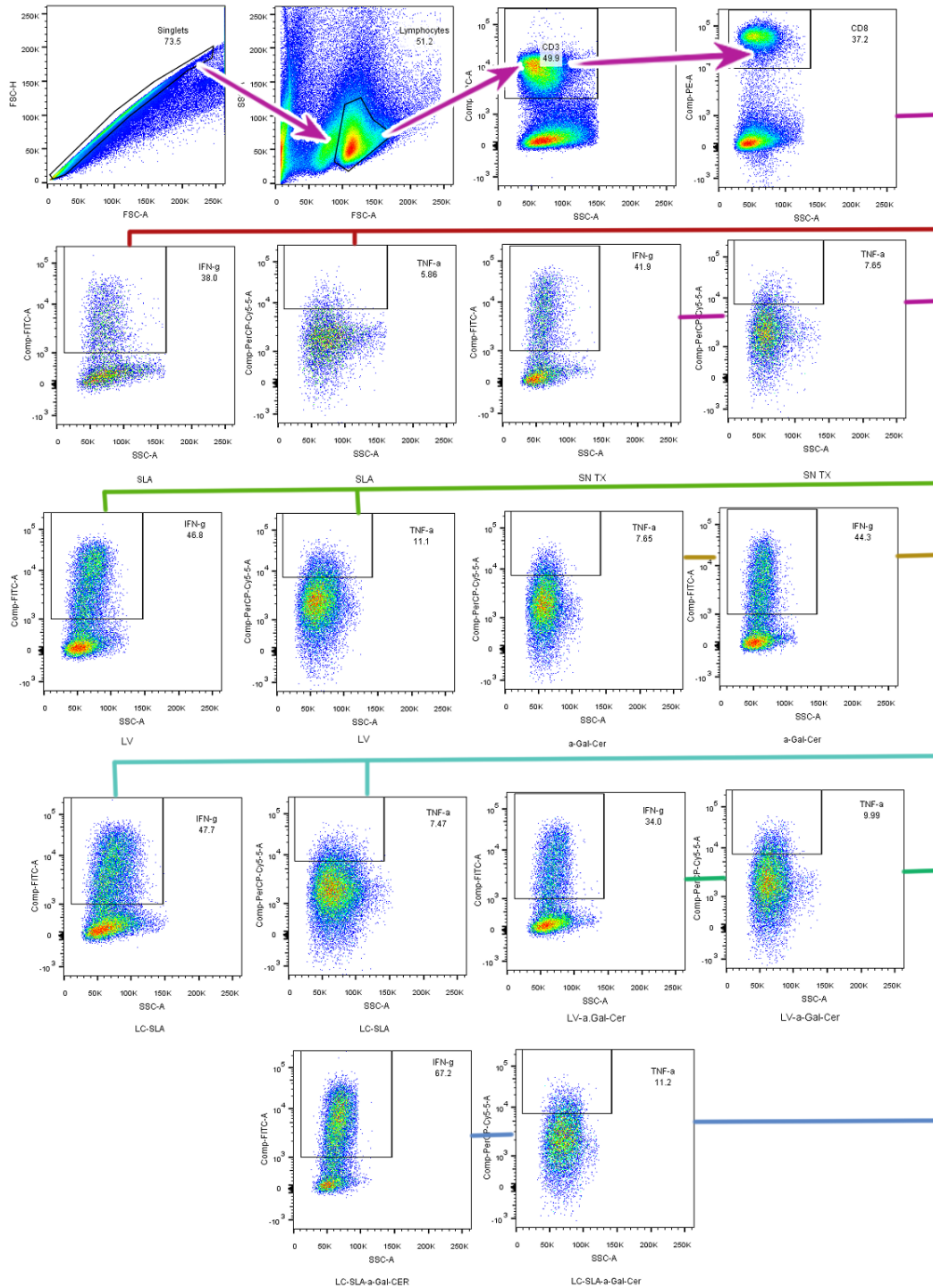


Figura 17. Expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por células T CD8<sup>+</sup>. Dotplots representativos de citometría de flujo que muestran la frecuencia de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  expresados por células T CD8<sup>+</sup> de ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L. mexicana*, y previamente inmunizados con SLA, LV, Lc-SLA,  $\alpha$ -GalCer, Lc- $\alpha$ -GalCer, Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer y SN TX.

## Estrategia de análisis de la producción de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ de T CD4<sup>+</sup>

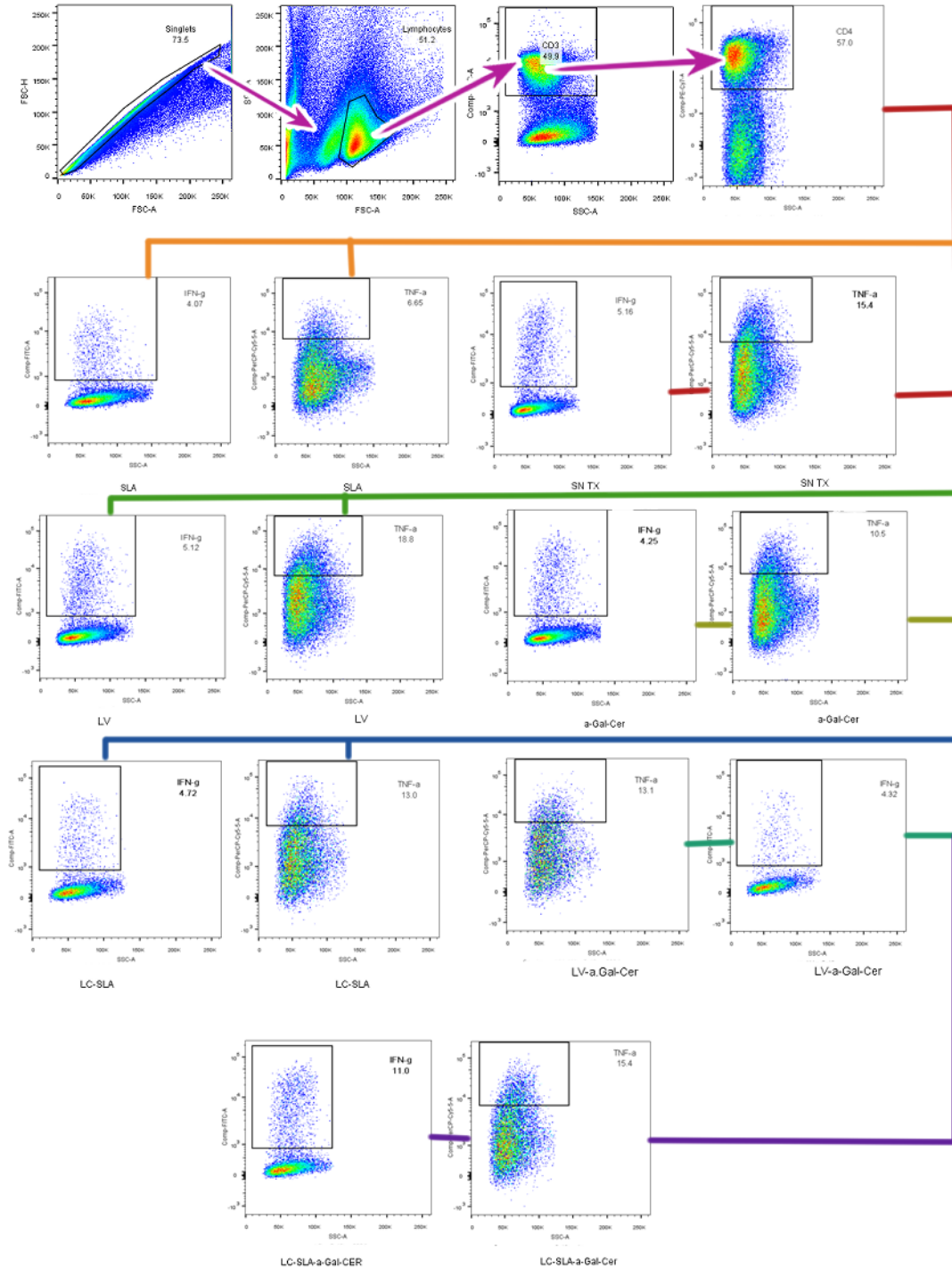


Figura 18. Expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por células T CD4<sup>+</sup>. *Dotplots* representativos de citometría de flujo que muestran la frecuencia de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  expresados por células T CD4<sup>+</sup> de ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L. mexicana*, y previamente inmunizados con SLA, LV, Lc-SLA,  $\alpha$ -GalCer, Lc- $\alpha$ -GalCer, Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer y SN TX.

## Controles FMO-FITC y Pacific Blue

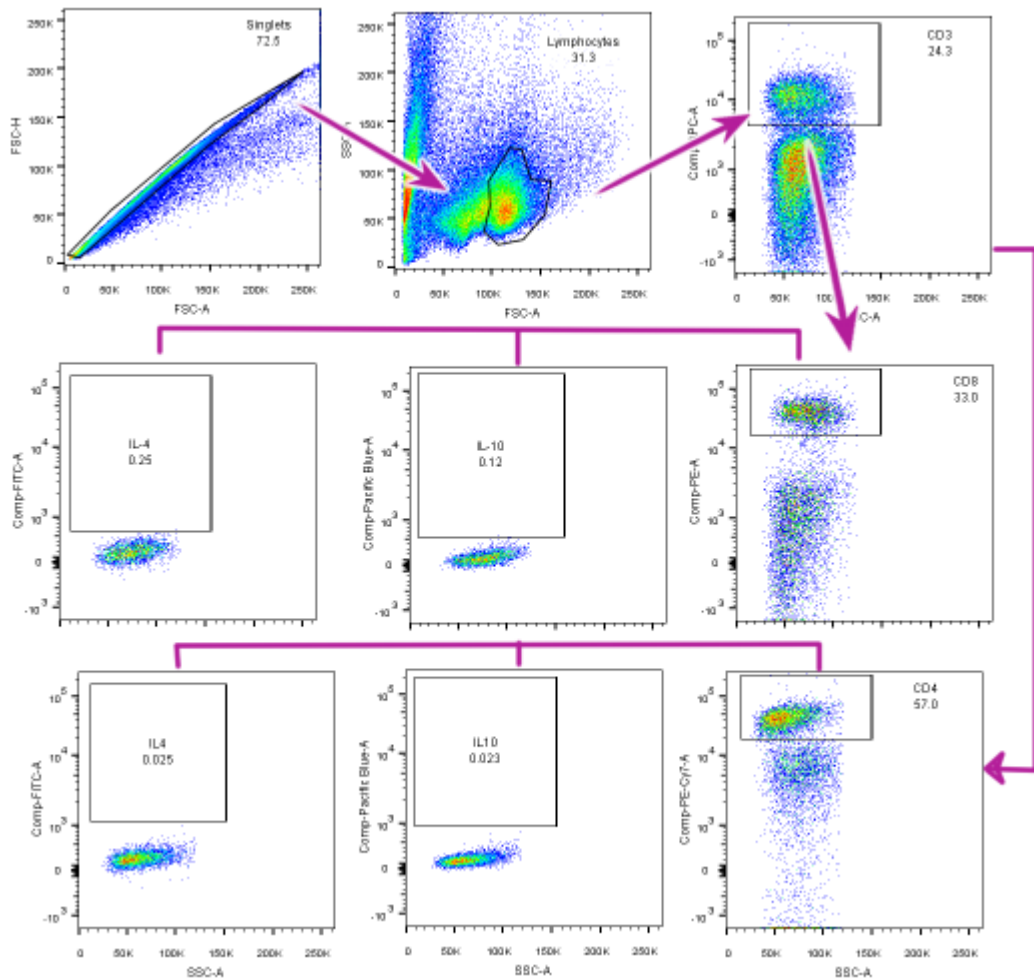


Figura 19. *Dotplot* representativos de citometría de flujo para el control interno de fluorescencia FMO, FITC y Pacific Blue. FMO corresponde al control interno de la técnica para determinar el punto de corte entre la emisión de fluorescencia de fondo y las muestras analizadas para evaluar la producción de IL-4 e IL-10.

Estrategia de análisis de la producción de IL-4 e IL-10 de T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>

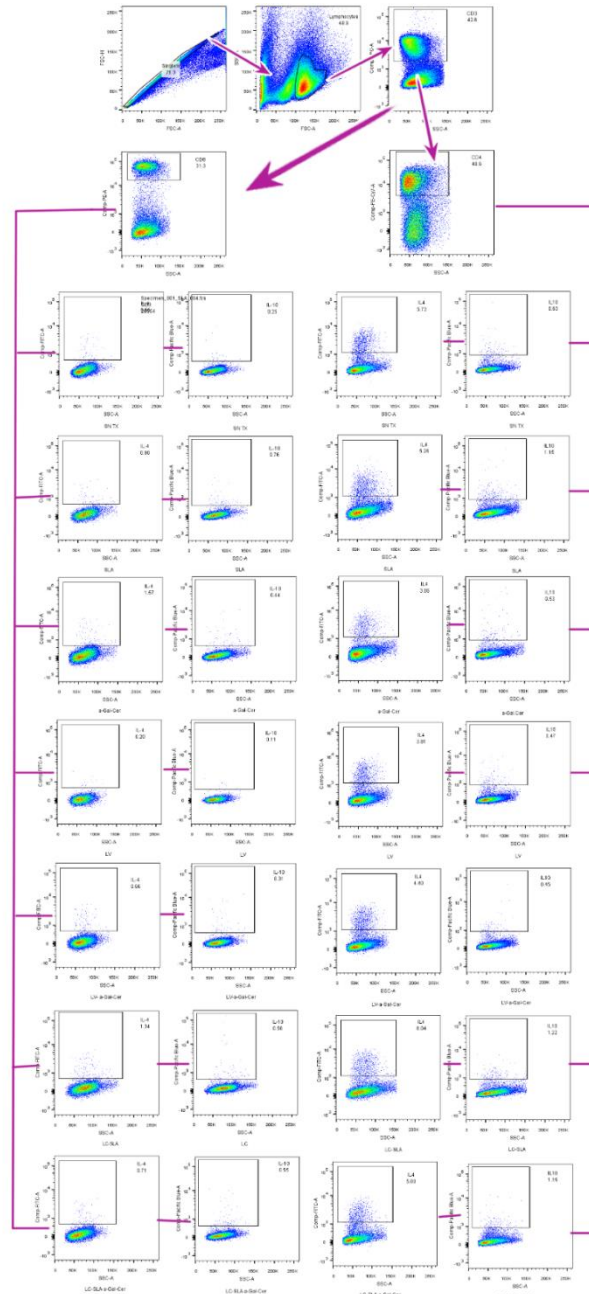


Figura 20. Expresión de IL-4 e IL-10. *Dotplots* representativos de citometría de flujo que muestran la frecuencia de IL-4 e IL-10 expresados por células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> de ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L. mexicana*, y previamente inmunizados con SLA, LV, Lc-SLA,  $\alpha$ -GalCer, Lc- $\alpha$ -GalCer, Lc-SLA/Lc- $\alpha$ -GalCer y SN TX.



## REFERENCIAS

1. Afonso, L. C., Scharton, T. M., Vieira, L. Q., Wysocka, M., Trinchieri, G., & Scott, P. (1994). The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5144), 235–237. <https://doi.org/10.1126/science.7904381>
2. Afrin, F., Rajesh, R., Anam, K., Gopinath, M., Pal, S., & Ali, N. (2002). Characterization of *Leishmania donovani* antigens encapsulated in liposomes that induce protective immunity in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, 70(12), 6697–6706. <https://doi.org/10.1128/iai.70.12.6697-6706.2002>
3. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
4. Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., & Sereno, D. (2017). *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 57, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
5. Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., & WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*, 7(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
6. 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>

7. Askarizadeh, A., Jaafari, M. R., Khamesipour, A., & Badiie, A. (2017). Liposomal adjuvant development for leishmaniasis vaccines. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 5(4-5), 85–101.  
<https://doi.org/10.1177/2051013617741578>
8. Badiie, A., Heravi Shargh, V., Khamesipour, A., & Jaafari, M. R. (2013). Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: Present and future trends. *Vaccine*, 31(5), 735–749.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.068>
9. Badiie, A., Jaafari, M. R., Samiei, A., Soroush, D., & Khamesipour, A. (2008). Coencapsulation of CpG oligodeoxynucleotides with recombinant *Leishmania major* stress-inducible protein 1 in liposome enhances immune response and protection against leishmaniasis in immunized BALB/c mice. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 15(4), 668–674.  
<https://doi.org/10.1128/CVI.00413-07>
10. Belkaid, Y., Hoffmann, K. F., Mendez, S., Kamhawi, S., Udey, M. C., Wynn, T. A., & Sacks, D. L. (2001). The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(10), 1497–1506. <https://doi.org/10.1084/jem.194.10.1497>
11. Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., & Sacks, D. (2002). 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:10.4049/jimmunol.168.8.3992>
12. 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+ 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>

13. Berzunza-Cruz, M., Rodríguez-Moreno, Á., Gutiérrez-Granados, G., González-Salazar, C., Stephens, C. R., Hidalgo-Mihart, M., Marina, C. F., Rebollar-Téllez, E. A., Bailón-Martínez, D., Balcells, C. D., Ibarra-Cerdeña, C. N., Sánchez-Cordero, V., & Becker, I. (2015). *Leishmania (L.) mexicana* infected bats in Mexico: novel potential reservoirs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1), e0003438. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003438>
14. Bhowmick, S., Ravindran, R., & Ali, N. (2008). gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity*, 76(3), 1003–1015. <https://doi.org/10.1128/IAI.00611-07>
15. Bhowmick, S., Ravindran, R., & Ali, N., (2007). Leishmanial antigens in liposomes promote protective immunity and provide immunotherapy against visceral leishmaniasis via polarized Th1 response. *Vaccine*, 25, 6544–6556. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.05.042>
16. Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
17. Campos, T. M., Costa, R., Passos, S., & Carvalho, L. P. (2017). Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(11), 733–740. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170109>
18. Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M. J., & Otranto, D. (2015). The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends in Parasitology*, 31(3), 100–108. <https://doi:10.1016/j.pt.2014.12.012>
19. 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 cross presentation by dendritic cells. *Cell*, 147(6), 1355–1368. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.021>

20. Chu W. M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Letters*, 328(2), 222–225. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.014>
21. Colmenares, M., Kima, P. E., Samoff, E., Soong, L., & McMahon-Pratt, D. (2003). Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infection and Immunity*, 71(6), 3172–3182. <https://doi.org/10.1128/iai.71.6.3172-3182.2003>
22. Copland, M.J., Rades, T., Davies, N.M., & Baird, M.A., (2005). Lipid based particulate formulations for the delivery of antigen. *Immunology and Cell Biology*, 83, 97–105. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01315.x>
23. Cruz-Hernández, V., León-Tapia, S., Cruz-Reyes, MA., Sosa-López, R., Arango-Díaz, A., González-Sánchez, E. (2013). Leishmaniasis visceral, reporte de cuatro casos y revisión de la bibliografía. *Medicina Interna de México*, 29, 204-209.
24. Cruz-Leal, Y., Grubaugh, D., Nogueira, C. V., Lopetegui-González, I., Del Valle, A., Escalona, F., Laborde, R. J., Alvarez, C., Fernández, L. E., Starnbach, M. N., Higgins, D. E., & Lanio, M. E. (2018). The Vacuolar Pathway in Macrophages Plays a Major Role in Antigen Cross-Presentation Induced by the Pore-Forming Protein Sticholysin II Encapsulated into Liposomes. *Frontiers in Immunology*, 9, 2473. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02473>
25. Da-Cruz, A. M., Bertho, A. L., Oliveira-Neto, M. P., & Coutinho, S. G. (2005). Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *British Journal of Dermatology*, 153(3), 537–543. <https://doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06647.x>
26. Da-Cruz, A. M., Bittar, R., Mattos, M., Oliveira-Neto, M. P., Nogueira, R., Pinho-Ribeiro, V., Azeredo-Coutinho, R. B., & Coutinho, S. G. (2002). T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clinical and Diagnostic*

*Laboratory Immunology*, 9(2), 251–256. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.2.251-256.2002>

27. Da-Cruz, A. M., Conceição-Silva, F., Bertho, A. L., & Coutinho, S. G. (1994). *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 62(6), 2614–2618.
28. da Silva Santos, C., & Brodskyn, C. I. (2014). The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in Public Health*, 2, 165. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00165>
29. de Brito Monteiro, L., Davanzo, G. G., de Aguiar, C. F., Corrêa da Silva, F., Andrade, J. R., Campos Codo, A., Silva Pereira, J., Freitas, L. P., & Moraes-Vieira, P. M. (2020). M-CSF- and L929-derived macrophages present distinct metabolic profiles with similar inflammatory outcomes. *Immunobiology*, 225(3), 151935. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151935>
30. de Vries, H. J., Reedijk, S. H., & Schallig, H. D. (2015). Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American Journal of Clinical Dermatology*, 16(2), 99–109. <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>
31. Dondji, B., Deak, E., Goldsmith-Pestana, K., Perez-Jimenez, E., Esteban, M., Miyake, S., & McMahon-Pratt, D. (2008). NKTi cell activation during DNA priming in heterologous prime-boost vaccination enhances T cell responses and protection against *Leishmania*. *European Journal of Immunology*, 38(3), 706–719. <http://doi.org/10.1002/eji.200737660>
32. Dorlo, T. P. C., Rijal, S., Ostyn, B., de Vries, P. J., Singh, R., Bhattarai, N., Huitema, A. D. R. (2014). Failure of Miltefosine in Visceral Leishmaniasis Is Associated with Low Drug Exposure. *Journal of Infectious Diseases*, 210(1), 146–153. <http://doi.org/doi:10.1093/infdis/jiu039>
33. Eiji, Y., (2018). Liposome-based immunity-inducing systems for cancer immunotherapy. *Molecular Immunology*, 98, 812. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.11.001>

34. Embgenbroich, M., & Burgdorf, S. (2018). Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. *Frontiers in Immunology*, 9, 1643. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01643>
35. Escalona-Montaña, A. R., Ortiz-Lozano, D. M., Rojas-Bernabé, A., Wilkins-Rodriguez, A. A., Torres-Guerrero, H., Mondragón-Flores, R., Mondragón-Gonzalez, R., Becker, I., Gutiérrez-Kobeh, L., & Aguirre-Garcia, M. M. (2016). *Leishmania mexicana*: promastigotes and amastigotes secrete protein phosphatases and this correlates with the production of inflammatory cytokines in macrophages. *Parasitology*, 143(11), 1409–1420. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000949>
36. Eskandari, F., Talesh, G. A., Parooie, M., Jaafari, M. R., Khamesipour, A., Saberi, Z., Abbasi, A., & Badiee, A. (2014). Immunoliposomes containing Soluble *Leishmania* Antigens (SLA) as a novel antigen delivery system in murine model of leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 146, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.08.016>
37. Fehres, C. M., Unger, W. W., 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. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00149>
38. Firouzmand, H., Badiee, A., Khamesipour, A., Heravi Shargh, V., Alavizadeh, S. H., Abbasi, A., & Jaafari, M. R. (2013). Induction of protection against leishmaniasis in susceptible BALB/c mice using simple DOTAP cationic nanoliposomes containing soluble *Leishmania antigen* (SLA). *Acta Tropica*, 128(3), 528–535. <https://doi:10.1016/j.actatropica.2013.07.021>
39. Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A., & Siqueira-Neto, J. L. (2012). Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, 2, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003>
40. Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Bonito, A. J., & Steinman, R. M. (2004). The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo

requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(12), 1607–1618. <https://doi.org/10.1084/jem.20040317>

41. Fujii, S., Shimizu, K., Okamoto, Y., Kunii, N., Nakayama, T., Motohashi, S., & Taniguchi, M. (2013). NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Frontiers in Immunology*, 4, 409. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00409>
42. Fujii, S., Shimizu, K., Smith, C., Bonifaz, L., & Steinman, R. M. (2003). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(2), 267–279. <https://doi.org/10.1084/jem.20030324>
43. Gaafar, A., Veress, B., Permin, H., Krarazmi, A., Theander, TG., & El-Hassan AM. (1999). Characterization of the local and systemic immune response in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clinical Immunology*, 91:314-320.
44. 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:10.1016/j.vaccine.2015.12.071>
45. Goto, H., & Lindoso, J. A. L. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(4), 419–433. <https://doi:10.1586/eri.10.19>
46. Griewank, K.G., Lorenz, B., Fischer, M.R., Boon, L., Lopez-Kostka, S., & von Stebut, E. (2014). Immune modulating effects of NKT cells in a physiologically low dose *Leishmania major* infection model after αGalCer analog PBS57 stimulation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(6), e2917. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002917>
47. Gurunathan, S., Sacks, D. L., Brown, D. R., Reiner, S. L., Charest, H., Glaichenhaus, N., & Seder, R. A. (1997). Vaccination with DNA encoding the

- immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(7), 1137–1147. <https://doi.org/10.1084/jem.186.7.1137>
48. Handler, M. Z., Patel, P. A., Kapila, R., Al-Qubati, Y., & Schwartz, R. A. (2015). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(6), 897–908. <https://doi:10.1016/j.jaad.2014.08.051>
49. Harty, J. T., Tvinnereim, A. R., & White, D. W. (2000). CD8+ T Cell Effector Mechanisms in Resistance to Infection. *Annual Review of Immunology*, 18(1), 275–308. <https://doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.275>
50. Henriksen-Lacey, M., Korsholm, K. S., Andersen, P., Perrie, Y., & Christensen, D. (2011). Liposomal vaccine delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(4), 505–519. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.558081>
51. Hernández, J., Aung, S., Marquardt, K., & Sherman, L. A. (2002). Uncoupling of proliferative potential and gain of effector function by CD8(+) T cells responding to self-antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(3), 323–333. <https://doi.org/10.1084/jem.20011612>
52. Hernández-Ruiz, J., Salaiza-Suazo, N., Carrada, G., Escoto, S., Ruiz-Remigio, A., Rosenstein, Y., Zentella, A., & Becker, I. (2010). CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11), e871. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000871>
53. Hurdal, R., & Brombacher, F. (2014). The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. *Immunology Letters*, 161(2), 179–183. <https://doi:10.1016/j.imlet.2013.12.022>
54. Ibáñez-Bernal, S., G. Rodríguez-Domínguez, C. H. Gómez-Hernández & J. R. Ricardez-Esquínca. (2004). First Record of *Lutzomyia evansi* (Nuñez-Tovar 1924) in Mexico (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Memórias do*



*Instituto Oswaldo Cruz*, 99, 127-129. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000200002>

55. Isnard, A., Shio, M. T., & Olivier, M. (2012). Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 72. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00072>
56. Jamal, F., Shivam, P., Kumari, S., Singh, M. K., Sardar, A. H., Pushpanjali, Murugesan, S., Narayan, S., Gupta, A. K., Pandey, K., Das, V., Ali, V., Bimal, S., Das, P., & Singh, S. K. (2017). Identification of *Leishmania donovani* antigen in circulating immune complexes of visceral leishmaniasis subjects for diagnosis. *PloS One*, 12(8), e0182474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182474>
57. Janeway, Jr., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, J.M. (2001). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; cell-mediated cytotoxicity. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27101/>
58. Jayakumar, A., Castilho, T. M., Park, E., Goldsmith-Pestana, K., Blackwell, J. M., & McMahon-Pratt, D. (2011). TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8+ T Cell responses providing protection against *Leishmania (Viannia)*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(6), e1204. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001204>
59. Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 557–569. <https://doi:10.1038/nri3254>
60. Kalia, V., Sarkar, S., Ahmed, R. (2013). CD8 T-Cell Memory Differentiation during Acute and Chronic Viral Infections. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28489/>
61. Kamogawa, Y., Minasi, L. A., Carding, S. R., Bottomly, K., & Flavell, R. A. (1993). The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by

- lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell*, 75(5), 985–995. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90542-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90542-x)
62. 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. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0653-6>
63. Khalil, E.A.G., Hassan, A.M.E., Zijlstra, E.E., Mukhtar, M.M., Ghalib, H.W., Musa, B., Ibrahim, M.E., Kamil, A.A., Elsheikh, M., Babiker, A., (2000). Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, doubleblind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* 356, 1565–1569. [https://doi:10.1016/s0140-6736\(00\)03128-7](https://doi:10.1016/s0140-6736(00)03128-7)
64. Kshirsagar, N. A., Pandya, S. K., Kirodian, G. B., & Sanath, S. (2005). Liposomal drug delivery system from laboratory to clinic. *Journal of Postgraduate Medicine*, 51 Suppl 1, S5–S15.
65. Lonz, C., Vandenbranden, M., & Ruyschaert, J. M. (2008). Cationic liposomal lipids: from gene carriers to cell signaling. *Progress in Lipid Research*, 47(5), 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.03.002>
66. Maji, M., Mazumder, S., Bhattacharya, S., Choudhury, S. T., Sabur, A., Shadab, M., Bhattacharya, P., & Ali, N. (2016). A Lipid Based Antigen Delivery System Efficiently Facilitates MHC Class-I Antigen Presentation in Dendritic Cells to Stimulate CD8(+) T Cells. *Scientific Reports*, 6, 27206. <https://doi.org/10.1038/srep27206>
67. Mary, C., Auriault, V., Faugère, B., & Dessein, A. J. (1999). Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. *Infection and Immunity*, 67(11), 5559–5566. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.11.5559-5566.1999>
68. Matheoud, D., Moradin, N., Bellemare-Pelletier, A., Shio, M. T., Hong, W. J., Olivier, M., Gagnon, E., 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>
69. Matlashewski, G. (2001). *Leishmania* infection and virulence. *Medical Microbiology and Immunology*, 190(1-2), 37–42.  
<https://doi:10.1007/s004300100076>
70. Mazumder, S., Ravindran, R., Banerjee, A., & Ali, N. (2007). Non-coding pDNA bearing immunostimulatory sequences co-entrapped with leishmanial antigens in cationic liposomes elicits almost complete protection against experimental visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Vaccine*, 25(52), 8771–8781. <https://doi:10.1016/j.vaccine.2007.10.028>
71. McBride, J. A., & Striker, R. (2017). Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? *PLoS Pathogens*, 13(11), e1006624. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006624>
72. Moafi, M., Rezvan, H., Sherkat, R., & Taleban, R. (2019). *Leishmania* Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. *International Journal of Preventive Medicine*, 10, 95. [https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM\\_116\\_18](https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_116_18)
73. Modabber, F., (2000). First generation leishmaniasis vaccines in clinical development: moving, but what next. *Current Opinion in Anti-infective. Investigational Drugs* 2, 35–39.
74. Mohebali, M., Nadim, A., & Khamesipour, A. (2019). An overview of leishmanization experience: A successful control measure and a tool to evaluate candidate vaccines. *Acta Tropica*, 105173. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105173>
75. Müller, I., Kropf, P., Etges, R. J., & Louis, J. A. (1993). Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. *Infection and Immunity*, 61(9), 3730–3738. <https://doi.org/10.1128/iai.61.9.3730-3738.1993>

76. Müller, I., Kropf, P., Louis, J. A., & Milon, G. (1994). Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, 62(6), 2575–2581.
77. Neefjes, J., Jongstra, M. L. M., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 11(12), 823–836. <https://doi:10.1038/nri3084>
78. 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. (2008). First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine*, 26(52), 6759–6767. <https://doi:10.1016/j.vaccine.2008.09.085>
79. Noble, A., & Kemeny, D. M. (1995). Interleukin-4 enhances interferon-gamma synthesis but inhibits development of interferon-gamma-producing cells. *Immunology*, 85(3), 357–363.
80. Novais, F. O., Carvalho, L. P., Graff, J. W., Beiting, D. P., Ruthel, G., Roos, D. S., Betts, M. R., Goldschmidt, M. H., Wilson, M. E., de Oliveira, C. I., & Scott, P. (2013). Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathogens*, 9(7), e1003504. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003504>
81. 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>
82. Okazaki, S., Iwasaki, T., Yuba, E., & Watarai, S. (2018). Evaluation of pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes co-loaded with antigen and  $\alpha$ -galactosylceramide as an anti-tumor vaccine. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 80(2), 197–204. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0491>
83. Organización Panamericana de la Salud (OPS). (10 de septiembre de 2021). *Leishmaniasis*. <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis>
84. Oussoren, C., & Storm, G. (2001). Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(1-2), 143–156. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00154-5](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00154-5)

85. Palatnik-de-Sousa, C.B., (2008). Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, 26(14), 1709–1724. <https://doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.023>
86. Platzer, C., Richter, G., Uberla, K., Müller, W., Blöcker, H., Diamantstein, T., & Blankenstein, T. (1992). Analysis of cytokine mRNA levels in interleukin-4-transgenic mice by quantitative polymerase chain reaction. *European Journal of Immunology*, 22(5), 1179–1184. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220511>
87. Ravindran, R., Maji, M., & Ali, N. (2012). Vaccination with liposomal leishmanial antigens adjuvanted with monophosphoryl lipid-trehalose dicorynomycolate (MPL-TDM) confers long-term protection against visceral leishmaniasis through a human administrable route. *Molecular Pharmaceutics*, 9(1), 59–70. <https://doi.org/10.1021/mp2002494>
88. Rhee, E. G., Mendez, S., Shah, J. A., Wu, C. Y., Kirman, J. R., Turon, T. N., Davey, D. F., Davis, H., Klinman, D. M., Coler, R. N., Sacks, D. L., & Seder, R. A. (2002). Vaccination with heat-killed leishmania antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against *Leishmania major* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(12), 1565–1573. <https://doi.org/10.1084/jem.20020147>
89. Ridge, J., Di Rosa, F., & Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and T-killer. *Cell Nature*, 393, 474-478.
90. Ruiz, J., & Becker, I. (2007). CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 29(12):671-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00991>
91. Salaiza-Suazo, N., Volkow, P., Tamayo, R., Moll, H., Gillitzer, R., Pérez-Torres, A., Pérez-Montfort, R., Domínguez, J. D., Velasco-Castrejón, O., Crippa, M., & Becker, I. (1999). Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Tropical Medicine &*

*International Health: TM & IH*, 4(12), 801–811. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00491.x>

92. Sánchez-García, L., Berzunza-Cruz, M., Becker-Fausser, I., & Rebollar-Téllez, E. A. (2010). Sand flies naturally infected by *Leishmania* (L.) *mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, México. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(6), 406–411. <https://doi:10.1016/j.trstmh.2010.01.010>
93. Schneiders, F. L., Scheper R. J., von Blomberg, B. M., Woltman, A. M., Janssen, H. L., van den Eertwegh, A. J., Verheul, H. M., de Gruijl, T. D., & van der Vliet, H. J. (2011). Clinical experience with  $\alpha$ -galactosylceramide (KRN7000) in patients with advanced cancer and chronic hepatitis B/C infection. *Clinical Immunology*, 140(2), 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.11.010>
94. Shargh, V. H., Jaafari, M. R., Khamesipour, A., Jalali, S. A., Firouzmand, H., Abbasi, A., & Badiie, A. (2012). Cationic liposomes containing soluble *Leishmania* antigens (SLA) plus CpG ODNs induce protection against murine model of leishmaniasis. *Parasitology Research*, 111(1), 105–114. <https://doi:10.1007/s00436-011-2806-5>
95. Sharma, A. (1997). Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154(2), 123–140. [https://doi:10.1016/s0378-5173\(97\)00135-x](https://doi:10.1016/s0378-5173(97)00135-x)
96. Shen, L., & Rock, K. L. (2006). Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Current Opinion in Immunology*, 18(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.003>
97. Shimizu, K., Kurosawa, Y., Taniguchi, M., Steinman, R. M., & Fujii, S. (2007). Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with  $\alpha$ -galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell mediated immunity via dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(11), 2641–2653. <https://doi.org/10.1084/jem.20070458>

98. Silva-Almeida, M., Pereira, B. A., Ribeiro-Guimarães, M. L., & Alves, C. R. (2012). Proteinases as virulence factors in *Leishmania spp.* infection in mammals. *Parasites & Vectors*, 5, 160. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-160>
99. Sim, B.-C., Aftahi, N., Reilly, C., Bogen, B., Schwartz, R. H., Gascoigne, N. R. J., & Lo, D. (1998). Thymic skewing of the CD4/CD8 ratio maps with the T-cell receptor  $\alpha$ -chain locus. *Current Biology*, 8(12), 701–S3. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70276-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70276-3)
100. Singh, M., Chakrapani, A., & O'Hagan, D. (2007). Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems. *Expert Review of Vaccines*, 6(5), 797–808. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.5.797>
101. Skeiky, Y.A.W., Coler, R.N., Brannon, M., Stromberg, E., Greeson, K., Thomas Crane, R., Campos-Neto, A., & Reed, S.G. (2002). Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPLS adjuvant. *Vaccine*, 20(27-28), 3292–3303. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00302-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00302-x)
102. Smith, C. M., Wilson, N. S., Waithman, J., Villadangos, J. A., Carbone, F. R., Heath, W. R., & Belz, G. T. (2004). Cognate CD4+ T cell licensing of dendritic cells in CD8+ T cell immunity. *Nature Immunology*, 5(11), 1143–1148. <https://doi.org/10.1038/ni1129>
103. Sohrabi, Y., Jaafari M. R., Mohammadi, A., Eskandari S. E., Khamesipour, A. (2005). Evaluation of immune response against leishmaniasis in resistance C57 BL/6 mice immunized with liposomes containing autoclaved *Leishmania major* with BCG. *Cell Molecular Biology*.10S 98.
104. Stanley, A. C., Zhou, Y., Amante, F. H., Randall, L. M., Haque, A., Pellicci, D. G., Hill, G. R., Smyth, M. J., Godfrey, D. I., & Engwerda, C. R. (2008). Activation of invariant NKT cells exacerbates experimental visceral leishmaniasis. *PLoS Pathogens*, 4(2), e1000028. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000028>

105. Stober, D., Jomantaite, I., Schirmbeck, R., & Reimann, J. (2003). NKT Cells Provide Help for Dendritic Cell-Dependent Priming of MHC Class I-Restricted CD8+ T Cells In Vivo. *The Journal of Immunology*, 170(5), 2540–2548. <https://doi:10.4049/jimmunol.170.5.2540>
106. Sun, W., Tian, B. X., Wang, S. H., Liu, P. J., & Wang, Y. C. (2020). The function of SEC22B and its role in human diseases. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 77(8), 303–312. <https://doi.org/10.1002/cm.21628>
107. Sundar, S. (2015). Visceral leishmaniasis. *Tropical Parasitology*, 5(2), 83–85. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.162487>
108. Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, 7(9), 170165. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
109. Taniguchi, M., & Nakayama, T. (2000). Recognition and function of V $\alpha$ 14 NKT cells. *Seminars in Immunology*, 12(6), 543–550. <https://doi:10.1006/smim.2000.0270>
110. Taniuch, I. (2018). CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 579-601 <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053411>
111. Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000 Research*, 6, 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
112. 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>
113. Wallis, R. S., Broder, M., Wong, J., Lee, A., & Hoq, L. (2005). Reactivation of Latent Granulomatous Infections by Infliximab. *Clinical Infectious Diseases*, 41(Supplement\_3), S194–S198. <https://doi:10.1086/429996>



114. Watson, D. S., Endsley, A. N., & Huang, L. (2012). Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine*, 30(13), 2256–2272. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.070>
115. WHO. Leishmaniasis. [Internet] 2019 [Citado 1 de mayo 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
116. Wilkins-Rodríguez, A. A., Escalona-Montaña, A. R., Aguirre-García, M., Becker, I., & Gutiérrez-Kobeh, L. (2010). Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Experimental Parasitology*, 126(3), 426–434. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.07.014>
117. Woods, N., Niwasabutra, K., Igoli, J., Altwaijry, N. A., Tusiimire, J., Gray, A. I., Watson, D. G., & Ferro V. A. (2017). Natural Vaccine Adjuvants and Immunopotentiators Derived from Plants, Fungi, Marine Organisms, and Insects. *Immunopotentiators in Modern Vaccines*, 211–229. <https://doi:10.1016/b978-0-12-804019-5.00011-6>
118. Zamora-Chimal, J., Hernández-Ruiz, J., & Becker, I. (2017). NKT cells in leishmaniasis. *Immunobiology*, 222(4), 641–646. <https://doi:10.1016/j.imbio.2016.11.014>
119. Zamora-Chimal, J., Fernández-Figueroa, E. A., Ruiz-Remigio, A., Wilkins-Rodríguez, A. A., Delgado-Domínguez, J., Salaiza-Suazo, N., Gutiérrez-Kobeh, L., & Becker, I. (2017). NKT cell activation by *Leishmania mexicana* LPG: Description of a novel pathway. *Immunobiology*, 222(2), 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.08.003>
120. Zehner, M., Marschall, A. L., Bos, E., Schloetel, J. G., Kreer, C., Fehrenschild, D., Limmer, A., Ossendorp, F., Lang, T., Koster, A. J., Dübel, S., & Burgdorf, S. (2015). The translocon protein Sec61 mediates antigen transport from endosomes in the cytosol for cross-presentation to CD8(+) T

cells. *Immunity*, 42(5),

850–863.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.008>

121. Zhou F. (2009). Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *International Reviews of Immunology*, 28(3-4), 239–260. <https://doi.org/10.1080/08830180902978120>