



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**LA VACUNACIÓN CON LPG DE *Leishmania mexicana* MODULA LA RESPUESTA
INMUNE INDUCIENDO LA EXPRESIÓN DE PD-1 EN LINFOCITOS T CD8**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

MARÍA BERENICE MARTÍNEZ SALAZAR

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA. INGEBORG BECKER FAUSER - FACULTAD DE MEDICINA
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. CESAR GONZÁLEZ BONILLA - FACULTAD DE MEDICINA
DRA. GLADIS FRAGOSO GONZALEZ - IIB**

MÉXICO, D. F. JUNIO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**, porque aprendí de los mejores, porque me ha dejado crecer profesionalmente y porque me dejo ser parte de ella. Siempre diré con orgullo que soy Universitaria y PUMA de corazón.

A la **Facultad de Medicina y el laboratorio de Inmunoparasitología**, mi segunda casa, dónde he pasado mucho tiempo trabajando y aprendiendo más sobre la inmunología, hacer ciencia me hace feliz.

- * A la **Dra. Ingeborg Becker Fauser**, por su tutoría para mi doctorado y por todo lo aprendido durante el proceso, pero sobre todo, por su confianza, su paciencia y su humildad para confiar en mis ideas y dejarme experimentar. Su amistad y cariño son invaluable para mí.
- * A mi comité tutorial, **Dr. Cesar González Bonilla** y **Dra. Gladis Fragoso González**, por todos sus consejos y tutorías durante mi doctorado.
- * Al jurado que aceptó revisar mi tesis, **Dra. Yolanda López**, **Dr. Julio C. Carrero**, **Dra. Patricia Talamás**, **Dr. Armando Pérez**, gracias por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.
- * **Dr. César González Bonilla**, gracias por ser mi amigo, por las charlas y por enseñarme a controlar y manejar la frustración, por ser mi mentor en el área de biología molecular, estaré siempre muy agradecida por mi periodo en la UIMII en el Hospital de La Raza donde aprendí mucho y conocí muchos colegas que ahora son mis amigos, gracias siempre.
- * A la **Dra. Yolanda López Vidal** por todo su apoyo, sus palabras y sus consejos para seguir adelante.

- * **Dr. José S. Delgado Domínguez**, por su valiosa ayuda técnica y por soportar mis exigencias. Pero gracias sobre todo por tu amistad.
- * **Eva Gudiño Zayas**, por toda su ayuda administrativa durante mi doctorado, gracias por tener siempre la disposición de ayudar a los alumnos, nunca la pierdas. Gracias por tu amistad.
- * A **Evangelina Vargas**, por todo tu apoyo administrativo, por tu paciencia con las fechas y por tu amistad.
- * Al **Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**, UNAM, por el apoyo, las clases y los conocimientos adquiridos que me formaron para poder decir hoy que soy una Doctora, aprendí con los mejores.
- * A **CONACyT** por la beca otorgada durante el doctorado y por el apoyo para la realización de este trabajo a través del proyecto **No. 102155**.
- * Al proyecto **PAPIIT No. IN215212** por el apoyo otorgado.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoparasitología, de la Unidad en Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM.

DEDICADA A...

Mi madre **Rosa Margarita Salazar**, gracias por tus días de trabajo incansable, por sacarnos adelante a pesar de cualquier problema, por apoyarnos y motivarnos a estudiar, mami todo tu esfuerzo ha valido la pena, estoy orgullosa de ti,

Mis abuelas **Antonia Salazar** y **Celia Guerrero**, por ser mujeres tan fuertes, porque nos han enseñado como sacar a una familia adelante, porque me han dado los mejores consejos y los mejores abrazos. Las amo y esto es para ustedes.

Maribel Martínez Salazar, mi hermanita, por estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores, por las travesuras juntas, por los chistes y las lágrimas, por todo tu apoyo y tu cariño, por hacerme resistente y por tu trabajo y esfuerzo para apoyarme en este proceso, mil gracias.

Jorge Leyva Flores, por tu amor, las miles de risas juntos, por tu paciencia, por los momentos compartidos, por ser mi cómplice y mi amigo, por todo el apoyo que me das y las palabras de aliento tan cariñosas cuando siento que me voy a caer, por estar a mi lado y por no estarlo también, por todo lo aprendido juntos y lo que nos falta por aprender, por ser el hombre que me inspira a ser mejor cada día.

Agradecimientos Personales:

Quiero agradecer a las personas que me ayudaron y que me dieron su apoyo durante este ciclo que fue mi doctorado, todas son importantes para mí y no importa el orden de aparición.

Donaxi Bernal Pastrana, hermana te quiero mucho, sigue adelante y nunca mires hacia atrás, solo para recordar tus raíces y darte cuenta de todo lo que has logrado.

A la familia Martínez Chávez: **Moisés Martínez** (mi bb Moy), **Miguel Martínez**, **Laura Chávez**, **Dany Martínez**, **Gabo Martínez**, gracias por creer en mí, especialmente tú Tío, por los consejos de un padre y por estar con nosotros siempre.

Olivia Guerrero, conserva tu fortaleza y sigue siendo feliz, te quiero.

Yuko Nakamura, te quiero amiga, siempre te tengo presente.

Adriana Pedraza (mi Adrix) por todo tu apoyo y tu cariño infinito, es bien correspondido.

Eleonor y Rocío, mis amigas por siempre desde la infancia, las quiero.

Edgar Medina (sepu), mi hermanito **Jorge García** (mosco) y **Manty Flores**, que se han preocupado por mí y han compartido conmigo tanto, los quiero.

A mi amigo **Julián del Castillo** (el pelos) tú siempre has creído en mi.

A **Eddie G. Tafoya**, por ser amiga, mi hermana putativa y por las largas pláticas durante los experimentos, por tu paciencia y por esas ganas de aprender.

A **Alma Escalona**, por tener siempre la disposición de ayudarme en lo experimental y más aún por compartir tus conocimientos. Eres una gran persona y siempre estaré agradecida contigo, te quiero Dra.

A mis amigos del Laboratorio de Inmunoparasitología, **Jenny** (Juani), **Isabel** (chabela), **Claudia**, **Lorena**, **Dulce**, **Eva**, **Jaime** (que creíste en mis locuras y me ayudaste a llevarlas a cabo), **Arturo**, **Sokani** y **Dr. José**, por tantas comidas, risas y corajes juntos, los quiero condenadotes!!!!

A la banda de la UIMII, **Berenice A.** (mi tocaya Berepink), **Juan Carlos**, **Melisa**, **Bernardo**, **Brenda Sáquiz** (jija del maíz eres de lo mejor, excelente persona y amiga), **Andrea S.** (otra jija), **Dany**, **Julio**, **Esteban**, **Andrés**, fue un placer conocerlos y trabajar un rato juntos.

A mi querida **Zuemy** por las palabras de aliento, por hacerme sentir mejor cuando sentía que todo iba mal y por el hermoso sobrino **Kinich**.

A **Araceli Álvarez**, que me ayudo a sobrellevar los momentos más oscuros con sus excelentes consejos y teniendo siempre tiempo para escucharme con paciencia y decirme también mis errores, eso sólo lo hace una amiga.

A **Roxana Palmerin**, **Darina Roa**, por esos rocksitos juntas y sus consejos.

A TODOS USTEDES, GRACIAS...

ABREVIATURAS

TNF	Factor de necrosis tumoral
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LPG	Lipofosfoglicano
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros
mL	Mililitros
mm	milímetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de Hidrógeno
TLR	Receptor tipo Toll

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. LA LEISHMANIASIS	9
1.1.2. Clasificación de la leishmaniasis	9
1.1.3. Diagnóstico y tratamiento	12
1.2. LEISHMANIA: CICLO DE VIDA Y BIOLOGÍA	15
1.2.1. Lipofosfoglicano (LPG).....	18
1.3. RESPUESTA INMUNE CONTRA LEISHMANIA	20
1.3.1. Activación de la respuesta inmune por la picadura del mosquito vector.....	20
1.3.2. Respuesta inmune celular activada por la infección con <i>Leishmania</i>	21
1.3.3. Participación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en la leishmaniasis.....	25
CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN	28
2. JUSTIFICACIÓN	29
CAPITULO 3. HIPÓTESIS Y CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	31
3. HIPOTESIS	32
4.1. OBJETIVO GENERAL	32
4.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
CAPÍTULO 5. MATERIAL Y MÉTODOS	33
5. METODOLOGIA	34
5.1. PURIFICACIÓN DE LA LPG DE <i>L. mexicana</i>	34
5.2. INMUNIZACION DE RATONES BALB/c	35
5.2.1. Esquema de vacunación.....	35
5.2.2. Vacunación	35
5.2.3. Valoración de la eficacia de la vacuna con LPG	36
5.3. INFECCIÓN DE RATONES BALB /c CON <i>L. mexicana</i>	36
5.3.1. Preparación de los parásitos.....	36
5.3.2. Inoculación de los parásitos.....	37
5.4. PURIFICACIÓN Y CULTIVO CELULAR	37

5.4.1. Macrófagos peritoneales	37
5.4.2. Linfocitos de bazo (Esplenocitos).....	38
5.5. ESTIMULACIÓN CELULAR.....	39
5.5.1. Macrófagos peritoneales de ratones BALB/c sanos estimulados con LPG.....	39
5.5.2. Infección <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneales de ratones BALB/c sanos con promastigotes de <i>L. mexicana</i>	39
5.5.3. Estimulación con LPG de <i>L. mexicana</i> de esplenocitos de ratones vacunados o infectados	40
5.6. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	41
5.6.1. Tinción celular con anticuerpos específicos para citometría de flujo	41
5.7. PRUEBA ESTADISTICA	42
CAPITULO 6. RESULTADOS.....	43
6.1. VACUNACIÓN CON LPG DE <i>L. mexicana</i>.....	44
6.2. EFECTO DE LA LPG DE <i>L. mexicana</i> EN LA EXPRESIÓN DE PD-L1 Y PD-L2 EN MACRÓFAGOS MURINOS.....	46
6.2.1. Expresión de PD-L2 en macrófagos peritoneales estimulados <i>in vitro</i> con LPG de <i>L. mexicana</i>	46
6.2.2. Expresión de PD-L2 y PD-L1 en macrófagos peritoneales estimulados <i>in vitro</i> con LPG o infectados con promastigotes de <i>L. mexicana</i>	48
6.3. EFECTO DE LA VACUNACIÓN CON LPG DE <i>L. mexicana</i> EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ACTIVACIÓN/INHIBICIÓN EN LINFOCITOS T DE RATONES BALB/C.....	50
6.3.1. Expresión de PD-1 en linfocitos T CD4+ provenientes de bazo de ratones vacunados con LPG.....	50
6.3.2. Expresión de CD137 en linfocitos T CD4+ provenientes de bazo de ratones vacunados con LPG.....	52
6.3.3. Expresión de PD-1 en linfocitos T CD8+ provenientes de bazo de ratones vacunados con LPG.....	54
6.3.4. Expresión de CD137 en linfocitos T CD8+ provenientes de bazo de ratones vacunados con LPG.....	56
6.4. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INFECCIÓN CON <i>L. MEXICANA</i> EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ACTIVACIÓN (CD137) O INHIBICIÓN (PD-1) EN LINFOCITOS T DE BAZO DE RATONES BALB/c.....	58
6.4.1. Expresión de PD-1 en linfocitos T CD4+ provenientes de bazo de ratones infectados en la dermis de la oreja con promastigotes de <i>L. mexicana</i>	58
6.4.2. Expresión de CD137 en linfocitos T CD4+ provenientes de bazo de ratones infectados en la dermis de la oreja con promastigotes de <i>L. mexicana</i>	60
6.4.3. Expresión de PD-1 en linfocitos T CD8+ provenientes de bazo de ratones infectados en la dermis de la oreja con promastigotes de <i>L. mexicana</i>	62
6.4.4. Expresión de CD137 en linfocitos T CD8+ provenientes de bazo de ratones infectados en la dermis de la oreja con promastigotes de <i>L. mexicana</i>	64

6.5. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA VACUNACIÓN CON LPG Y DE LA INFECCIÓN POR <i>L. mexicana</i> SOBRE LA EXPRESIÓN DE PD-L2 EN MACRÓFAGOS DE BAZO DE RATONES BALB/c.....	66
6.5.1. Expresión de PD-L2 en macrófagos provenientes de bazo de ratones vacunados con 10 y 100 µg LPG de <i>L. mexicana</i>	66
6.5.2. Expresión de PD-L2 en macrófagos provenientes de bazo de ratones infectados con 10 mil o 100 mil promastigotes de <i>L. mexicana</i>	68
6.6. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA VACUNACIÓN CON LPG Y DE LA INFECCIÓN POR <i>L. mexicana</i> SOBRE LA EXPRESIÓN DE H-2 EN MACRÓFAGOS DE BAZO DE RATONES BALB/c.....	70
6.6.1. Expresión de H-2 en macrófagos provenientes de bazo de ratones vacunados con 10 y 100 µg LPG de <i>L. mexicana</i>	70
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN.....	72
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES.....	79
CAPÍTULO 9. REFERENCIAS.....	81
ANEXO I. ARTÍCULO PUBLICADO.....	93

RESUMEN

En modelos de leishmaniasis experimental murina, se reportó que una vacuna con el LPG de *L. amazonensis* induce a la progresión de la infección si es inoculado por vía intramuscular mientras que si el inóculo es por la vía intranasal puede llevar a controlar la infección. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual el mismo antígeno produce resultados contradictorios. Claramente la vía de administración es importante, pero también falta estudiar la respuesta inmune generada con distintas dosis de antígeno.

En este trabajo se realizó un análisis de la respuesta inmune en ratones vacunados por vía subcutánea con dos dosis de LPG de *L. mexicana* e infectados en la dermis de la oreja con dos concentraciones diferentes de carga parasitaria. Las moléculas de activación (CD137) y de inhibición (PD-1) en linfocitos T CD4+ y CD8+ de bazo de ratones inmunizados e infectados fueron analizadas. Asimismo la expresión de PD-L2 y PD-L1 en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c inmunizados e infectados fue analizada. Adicionalmente se realizaron experimentos de estimulación *in vitro*. Observamos que la expresión de PD-L1 no se encuentra afectada en los macrófagos estimulados con LPG o infectados con el parásito, mientras que la expresión de PD-L2 incrementa con dosis elevadas de LPG y es aún mayor cuando los macrófagos están infectados con el parásito. En los linfocitos T CD8+ observamos una disminución de la expresión de la molécula activadora CD137 y un aumento en la expresión de la molécula inhibidora PD-1, que fue proporcional al estímulo con LPG o a

la dosis de parásitos utilizados para la infección. Este efecto, aunado a la sobreexpresión de PD-L2 en macrófagos infectados, podría explicar los diferentes resultados reportados en las vacunas contra la leishmaniasis. Concluimos que estos marcadores pueden servir para definir la dosis óptima de antígenos utilizados para el desarrollo de vacunas, evitando así la inducción de moléculas inhibitorias que llevarían al fracaso de la vacunación.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La leishmaniasis

Se denomina como leishmaniasis a un conjunto de enfermedades con diferentes manifestaciones clínicas que son causadas por diferentes especies del protozoo del género *Leishmania* el cual es transmitido a través de la picadura de un mosquito hembra hematófago del género *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo (1;2). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima una prevalencia de 12 millones de casos en el mundo con una mortalidad anual de 60 mil personas y 350 millones de personas en riesgo de ser infectadas por el parásito (3). Está catalogada dentro de las enfermedades relacionadas con la pobreza y la migración y actualmente se considera endémica en 88 países, 72 de los cuáles son países en desarrollo (4). La mortalidad anual ocasionada por la leishmaniasis la coloca como la segunda enfermedad parasitaria con mayor mortalidad después de la malaria. La pobreza aumenta el riesgo de consecuencias adversas ya que las personas no tienen dinero para acceder al sistema de salud que generalmente se localiza en zonas alejadas a los centros de salud, así como tampoco pueden pagar los medicamentos para el tratamiento (5).

1.1.2. Clasificación de la leishmaniasis

Las leishmaniasis se clasifican en leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral, lo que depende tanto de la especie de *Leishmania* infectante como de la respuesta inmune del paciente (1;6-8).

Aunque no se conoce el número exacto de personas infectadas en México porque esta enfermedad no es de notificación oficial para la Secretaría de Salud, existen reportes de 811 casos de leishmaniasis cutánea en el periodo comprendido del año 2004 al 2008, sin embargo, al no ser de notificación oficial, se estima que el número real de casos podría oscilar de los 2300 a los 3700 casos anuales (4).

La leishmaniasis cutánea se divide a su vez en localizada (LCL) y en difusa (LCD). En México ambas formas clínicas son producidas por *Leishmania mexicana*. La leishmaniasis cutánea localizada es la forma menos severa de la enfermedad y se caracteriza por una úlcera en el sitio de la picadura del mosquito, es indolora y de borde indurado que generalmente se presenta en zonas del cuerpo expuestas como las manos, los brazos y la cara (Figura 1) (1;7;8).



Figura 1) Lesión papulonodular en el dorso de la mano de un paciente con LCL. Imagen tomada de (8).

La leishmaniasis cutánea difusa (LCD) causa lesiones desfigurantes caracterizada por nódulos que se diseminan por toda la piel exceptuando palmas de las manos y plantas de los pies (Figura 2) (1;7). En México predominan los casos de LCL mientras que pacientes con LCD son muy escasos.

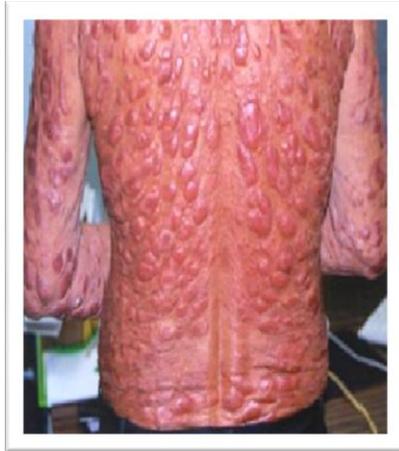


Figura 2) Paciente con LCD.
Laboratorio de
Inmunoparasitología de la Fac. de
Medicina de la UNAM.

La leishmaniasis mucocutánea (LMC) ocurre cuando el parásito hace metástasis desde la lesión local hasta el tejido mucocutáneo invadiendo también el tracto nasofaríngeo ocasionando la inflamación del mismo (Figura 3). Si el paciente no es diagnosticado y recibe tratamiento oportunamente fallece por inanición ya que el parásito destruye todo el tracto nasofaríngeo y parte de la boca impidiendo la correcta respiración y deglución de los alimentos (1;6;7).

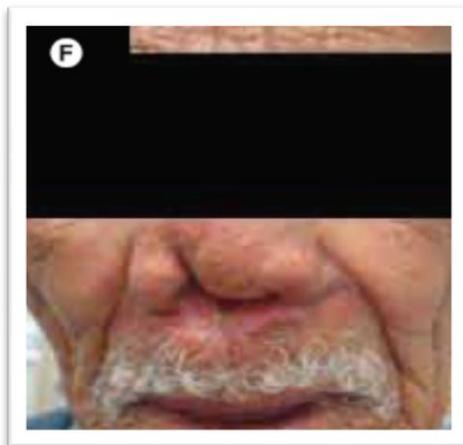


Figura 3) Lesión destructiva en la nariz
consecuencia de la LMC.

La leishmaniasis visceral se manifiesta por una inflamación en el abdomen como consecuencia de la migración del parásito hacia el bazo o el hígado (Figura 4), donde prolifera y causa esplenomegalia y hepatomegalia.

En algunos casos puede invadir ambos órganos simultáneamente causando hepatoesplenomegalia y si el paciente no recibe tratamiento oportuno podría llegar a morir por estallamiento de vísceras (1;7).

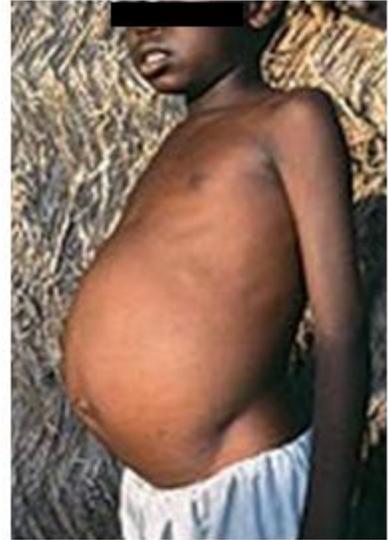


Figura 4) Leishmaniasis Visceral. Fuente: WHO/TDR/Crump

1.1.3. Diagnóstico y tratamiento.

Usualmente el diagnóstico es confirmado por la presencia del parásito en biopsias obtenidas de las lesiones del paciente teñidas con GIEMSA. La observación microscópica directa es confirmatoria de la enfermedad, sin embargo se requiere de personal entrenado ya que con frecuencia ocurren resultados falsos negativos cuando escasos parásitos están presentes. Una prueba para evaluar la exposición al parásito es la reacción intradérmica de Montenegro que consiste en una inyección intradérmica con una mezcla de antígenos del promastigote y se considera positiva cuando se observa una induración de 5 mm en la piel después de 48 horas en el sitio de la inyección. Existen otras técnicas diagnósticas de mayor sensibilidad como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la prueba serológica ELISA, para determinar la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* (1;9;10).

El tratamiento depende de las características clínicas de la enfermedad, de la especie de *Leishmania* responsable de la enfermedad está asociada a la región geográfica donde habita el paciente y consiste principalmente en la administración de antimoniales pentavalentes como el estibogluconato sódico (Pentosam) o el antimoniato de meglumina (Glucantime) para las formas cutáneas. Estos fármacos son químicamente similares y actúan multifactorialmente en procesos moleculares afectando el metabolismo del parásito. En los últimos años se ha reportado resistencia a éstos lo que da como resultado la ausencia de respuesta al tratamiento o la recaída de los pacientes una vez terminado el tratamiento (11-13). Para evitar la resistencia o la recaída de los pacientes se han utilizado tratamientos alternativos que tienen algún efecto sobre el parásito, aunque éstos mostraron efectos secundarios tóxicos graves, además de que el costo no los hace accesibles a la mayoría de los pacientes. A continuación se describen los fármacos más usados contra la leishmaniasis (7;10;14;14-16).

- **Anfotericina B.** Este medicamento fue primero usado como anti fúngico pero se observó que en los pacientes con leishmaniasis mejoraba las lesiones por lo que empezó a usarse contra esta parasitosis. Causa inestabilidad en la membrana del parásito al unirse al ergosterol. La forma de administración es de 2.5 a 5 mg/Kg por vía intravenosa durante 20 días. Sus efectos secundarios incluyen insuficiencia renal, alteraciones en los electrolitos y ocasionalmente miocarditis. Es un medicamento costoso y requiere hospitalizar al paciente para monitorear los efectos secundarios.

- **Paramomicina.** Es un antibiótico aminoglucósido que bloquea la síntesis de proteínas uniéndose a la sub-unidad 16S del RNA ribosomal. Se administra tópicamente o sistémicamente por vía intramuscular (15 mg/Kg) para los casos de leishmaniasis cutánea. Entre los efectos secundarios se observó ototoxicidad reversible, la nefrotoxicidad es menos común así como la hepatotoxicidad aunque existen reportes de ambas.
- **Pentamidina.** El nombre comercial es “Pentam”, este medicamento interfiere con la biosíntesis de macromoléculas como proteínas y fosfolípidos así como del DNA y RNA. Los principales efectos secundarios son hipoglucemia grave, diabetes mellitus, miocarditis y toxicidad renal por lo que su uso es muy limitado y debe valorarse el costo-beneficio en el paciente.
- **Miltefosine.** Es un alquil-fosfolípido conocido comercialmente como “Impavido” o “Miltex” y es usado principalmente como un medicamento anti-neoplásico. Se administran de forma oral 2.5 mg/Kg durante 28 días y en ocasiones se combina con paramomicina. Es efectivo en los casos de LCL y LCD causados por *L. mexicana*. Es un medicamento teratogénico por lo que no debe ser usado durante el embarazo. Los efectos secundarios más comunes son malestares gastrointestinales (náuseas, diarreas y vómitos), puede ocasionar insuficiencia renal y hepática.
- **Imiquimod.** Su nombre comercial es “Aldara” o “Zyclara” y se trata de una imidazol quinolona que induce activación de los macrófagos, producción de TNF, IL-2 e IFN- γ . Es de aplicación tópica.

- **Azoles.** Inhiben la síntesis de ergosteroles. Se incluyen en este grupo el Ketokonazol y el Fluconazol. Administrados por vía oral tienen efecto sobre infecciones provocadas por *L. mexicana* y *L. major*. Entre los efectos secundarios se han reportado anormalidades en las enzimas hepáticas.

1.2. *Leishmania*: ciclo de vida y biología.

El parásito presenta un ciclo de vida dimórfico en el que se incluye un vector y un hospedero definitivo que generalmente es un mamífero. Dentro del mosquito vector el parásito se encuentra en la forma de promastigote procíclico. En este estadio el parásito presenta una forma oval alargada y posee un flagelo que le confiere movilidad dentro del tracto gastrointestinal del mosquito. Al pasar al intestino y debido al cambio del pH, el parásito sufre un proceso de transformación conocida como metaciclogénesis durante la cual expresa moléculas membranales como el lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína de 63 kilo Daltones (gp63 kDa), que le permiten sobrevivir en el microambiente y que adicionalmente funcionan como factores de virulencia en el hospedero definitivo. El promastigote metacíclico migra hasta llegar a las glándulas salivales donde estará inerte hasta la siguiente ocasión en que el mosquito pique a un mamífero y sea regurgitado junto con proteínas y proteofosfoglicanos presentes en la saliva del vector (Figura 5) (2;17-23) .

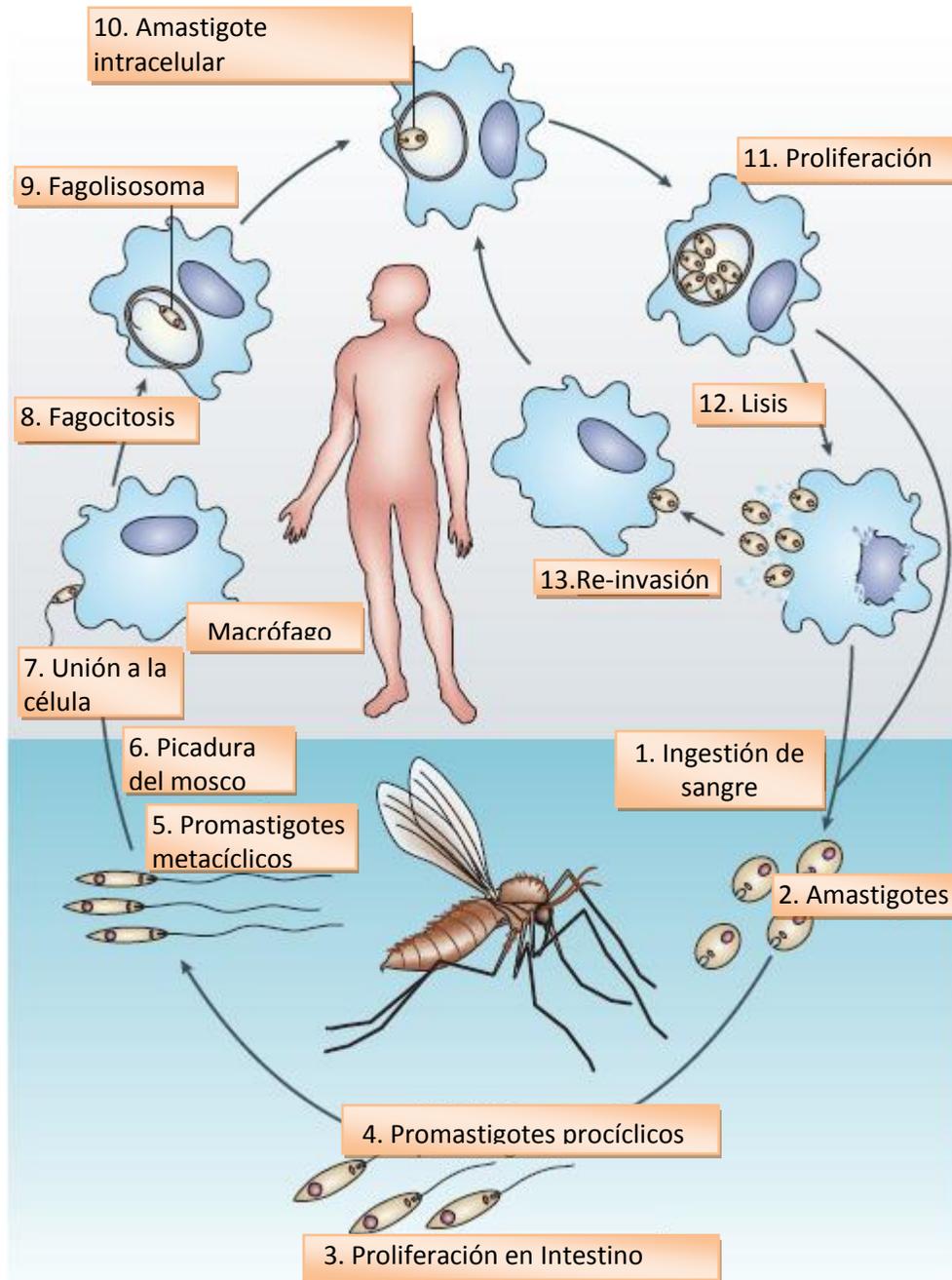


Figura 5) Ciclo de vida de *Leishmania*. El mosquito vector ingiere sangre (1) infectada con amastigotes (2). Éstos van a migrar de la probóscide al intestino medio y ahí van a proliferar (3). Los parásitos adquieren el flagelo y se transforman en promastigotes procíclicos (4). En el intestino desarrollan factores de virulencia en un proceso llamado metaciclologénesis y migran a la probóscide como promastigotes metacíclicos (5) para ser regurgitados junto con componentes salivales cuando el mosquito pique al hospedero vertebrado (6). El parásito se va a unir a las células fagocíticas como el macrófago (7). Estas células fagocitan al parásito (8) y lo incorporan al fagolisosoma (9). Por el cambio de pH los promastigotes pierden el flagelo y algunos factores de virulencia transformándose en amastigotes (10), los cuáles proliferan (11) hasta lisis a la célula (12). Los amastigotes liberados infectan nuevas células (13) cerrándose así el ciclo de vida. Modificado de Ref. 22

El parásito entra al mamífero hospedero en la forma de promastigote metacíclico cubierto en su totalidad por una capa gruesa de LPG que le ayudará a evadir la respuesta inmune del hospedero, especialmente la respuesta mediada por la cascada del complemento ya que el LPG evita la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) al impedir la inserción de C5 y los siguientes componentes (2;16;18). El promastigote es fagocitado por el macrófago residente en piel aunque también se ha descrito que es fagocitado por neutrófilos y células dendríticas (24-26). A consecuencia del cambio de pH dentro del fagolisosoma de la célula el parásito se transforma a amastigote, perdiendo su flagelo y cambiando su forma de alargado a redondo y más pequeño. Inicia su proliferación por división binaria hasta desestabilizar la membrana celular y romperla para salir a infectar células vecinas y continuar con el transcurso de la enfermedad. Es en este proceso donde el parásito es ingerido por una *Lutzomyia* mientras pica para alimentarse, cerrándose así el ciclo de vida (Figura 5) (17;20;21).



Fig. 6) Perro con Leishmaniasis.

Los hospederos definitivos del parásito son diversos mamíferos, siendo el humano un hospedero accidental. Además de mamíferos silvestres, el perro es uno de los principales hospederos domésticos. En los últimos años se documentó el aumento en el registro de perros infectados por el parásito. Las manifestaciones clínicas en los perros incluyen lesiones en la piel y una caquexia generalizada hasta causar la muerte del animal (Figura 6). En lugares donde se han detectado perros infectados también se ha notado un aumento en el número de humanos infectados posiblemente por la estrecha convivencia que existe entre ambos (1;5;6).

1.2.1. Lipofosfoglicano (LPG)

El LPG es el principal glicoconjugado superficial del promastigote formando un denso glicocáliz. Consiste de un polímero de unidades repetidas de Gal β 1,4Man-PO₄ adjuntas a un centro glicano que esta insertado dentro de la membrana del parásito por medio de un ancla de 1-*O*-alquil-2-liso-fosfatidil(mio)inositol y un casquete de azucares compuesto por manosa y fucosa (Figura 7) (27;28). Este disacárido fosfato Gal β 1,4Man-PO₄ no es encontrado en mamíferos. Se expresa diferencialmente entre promastigotes y amastigotes, ya que en los primeros se encuentran 15 copias en su fase procíclica y 30 copias por parásito en la fase metacíclica mientras que en los amastigotes es regulado negativamente por al menos 3 órdenes de magnitud (29;30). Esta molécula se encuentra presente en todas las especies de *Leishmania* pero muestra diferencias estructurales entre especies (31). Las variaciones principales se encuentran en los oligosacáridos y su capacidad inmuno-estimuladora depende de la especie de la cual fue purificado (Figura 7) (29;31;32).

En especies como *L. major* se considera un factor de virulencia ya que aumenta la fagocitosis del parásito por células inmunes (33;34), mientras que en *L. mexicana* no se observó el mismo efecto sobre la fagocitosis pero si se ha observado que es capaz de modular la respuesta inmune (34;35). Se ha reportado que puede inducir la producción de NO, modificar el estallido oxidativo en los macrófagos murinos desde la proteína cinasa alfa (PKC- α) y estimula la producción de citocinas proinflamatorias en monocitos humanos a partir de la señalización de TLR2 y TLR4 (34;36-39). En células NK, el LPG induce la producción de IFN- γ a través del receptor TLR2 (40).

El LPG fue utilizado como candidato para desarrollar vacunas contra *L. amazonensis* con resultados contradictorios: cuando es inoculado en ratones BALB/c por vía subcutánea, potencia la producción de TGF- β e IL-10, facilitando la progresión de la enfermedad. En cambio, cuando la inmunización se realiza por vía intranasal se observa una disminución del tamaño de la lesión y de la carga parasitaria (41;42). Por estas respuestas contradictorias, hasta ahora el LPG de *L. mexicana* no ha sido utilizado como candidato para vacunas.

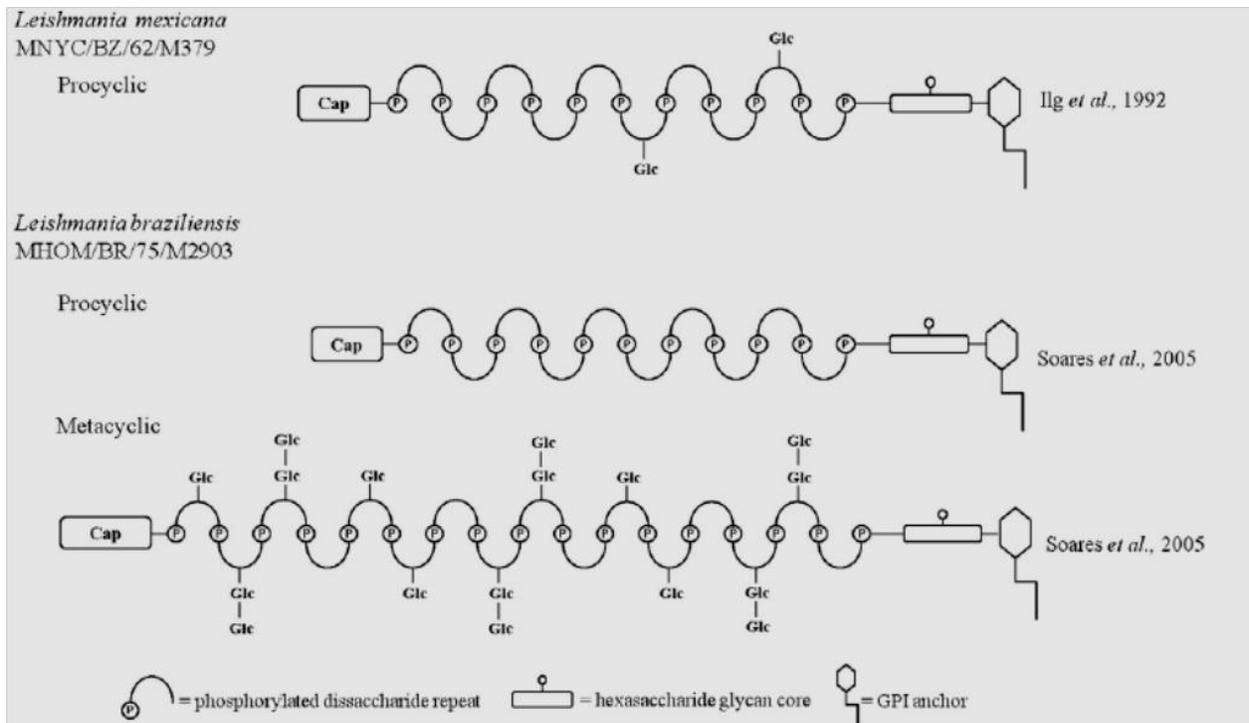


Fig. 7) Estructura del LPG en *L. mexicana* y *L. braziliensis*. Se muestran las diferencias estructurales entre el LPG de *L. mexicana* en promastigotes procíclicos (a) y *L. braziliensis* tanto en la forma procíclica como metacíclica. Se puede observar que en el LPG de parásitos metacíclicos los carbohidratos están enriquecidos. 29

1.3. Respuesta Inmune contra *Leishmania*.

1.3.1. Activación de la respuesta inmune por la picadura del mosquito vector.

La picadura del mosquito inocular al parásito junto con proteínas salivales que generan condiciones que favorecen la infección (43;44). Infecciones de ratones con *L. major* en conjunto con componentes de las glándulas salivales mostraron que se generan lesiones de mayor tamaño que las observadas en ratones que solo fueron infectados con el parásito (43). La infección natural comienza con la picadura del mosquito cuya saliva contiene proteínas que poseen propiedades inmunomoduladoras, como el maxadilán, un péptido de 61 aminoácidos con potente actividad vasodilatadora, que también es capaz de dirigir la respuesta inmune celular hacia el tipo Th2 (T helper 2). Esta respuesta favorece la progresión de la infección y la supervivencia del parásito. Otro de los componentes del vector que exacerba la infección es el proteofosfoglicano filamentososo (fPPG), que es regurgitado por el mosquito al momento de la picadura. Diversos trabajos demostraron que los extractos de glándulas salivales (EGS) de diferentes especies de *Lutzomyia* o *Phlebotomus* exacerban y mantienen la infección cuando son inoculados junto con el parásito en diferentes cepas de ratones como C3H, CBA, BALB/c y C57BL/6 (43-50). La inmunomodulación ejercida por proteínas de los EGS es determinante en establecer una infección y supervivencia del parásito. El efecto proinflamatorio y la modulación hacia una respuesta tipo Th2 posiblemente sean los mecanismos facilitadores de la infección: la inflamación garantiza la rápida afluencia de células que fagocitan al parásito y de esta manera se protege contra la acción lítica de

complemento, y la respuesta Th2 inhibe los mecanismos leishmanicidas de las células fagocíticas como es la producción de óxido nítrico y el estallido oxidativo.

1.3.2. Respuesta inmune celular activada por la infección con *Leishmania*.

Los modelos murinos han sido ampliamente usados para comprender los mecanismos de la respuesta inmune involucrados en el control de la infección, así como las proteínas y procesos involucrados en la patogénesis de la enfermedad. Las cepas murinas más utilizadas son C57Bl/6 y BALB/c (Figura 8) (51). Los ratones de la cepa C57Bl/6 infectados con *L. major* son capaces de controlar la infección a través de la activación del macrófago así como de la producción de citocinas tipo Th1. En estos ratones la infección se caracteriza por la formación de una pequeña úlcera en el sitio de inoculación de los parásitos la cual paulatinamente desaparece en un lapso de 8 a 12 semanas. En esta cepa de ratón los macrófagos activados fagocitan al parásito y son capaces de eliminarlo a través de los mecanismos microbicidas como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de óxido nítrico (NO) (26;36;52-54), ambas moléculas son tóxicas y dañan al parásito. Adicionalmente, las citocinas predominantemente producidas durante la infección son del tipo Th1, principalmente IFN- γ , IL-2 e IL-12, para la activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ (17;51;52;55-57). La cepa C57Bl/6 es asociada con la leishmaniasis cutánea localizada en el humano ya que la activación de las células y la carga parasitaria en las células infectadas se asemeja mucho a lo reportado en los pacientes con este cuadro clínico.

Los ratones de la cepa BALB/c por el contrario, no logran controlar la infección por *Leishmania*. Estos ratones generan grandes lesiones en el sitio de infección y llegan a presentar múltiples lesiones adicionales. Los macrófagos de estos ratones generalmente producen IL-10 y cursan con alta carga parasitaria intracelular ya que los mecanismos microbicidas se encuentran disminuidos (36). Las citocinas predominantes en respuesta a la infección son del tipo Th2 con la producción de IL-4 y TGF- β . Por todo esto, las infecciones en ratones BALB/c fueron comparadas con la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) en los humanos (51;55). Basado en resultados obtenidos a través de los modelos murinos de leishmaniasis, se asocia la curación y el control de la infección con un perfil de citocinas tipo Th1 mientras que la susceptibilidad y progresión de la infección por *Leishmania* se asoció con el perfil tipo Th2 (Figura 8) (51;55).

En los humanos esta reportado que las primeras células que entran en contacto con el parásito son las células de la piel como los queratinocitos, que son capaces de detectar el daño ocasionado en el tejido y van a liberar citocinas y quimiocinas que atraen a otras células hacia el sitio del daño para empezar con la reparación tisular. Existen reportes de que estas células pueden dar inicio a la polarización hacia Th1 o Th2, según el patrón de citocinas que producen (58). Junto con los neutrófilos, son responsables de la formación de las úlceras mediante la sobre expresión de moléculas relacionadas con la apoptosis como FasL y TRAIL. En modelos murinos se encontró que el bloqueo de estas moléculas en los neutrófilos y queratinocitos evita la generación de las úlceras en el sitio de infección, aunque los parásitos persisten (58-61).

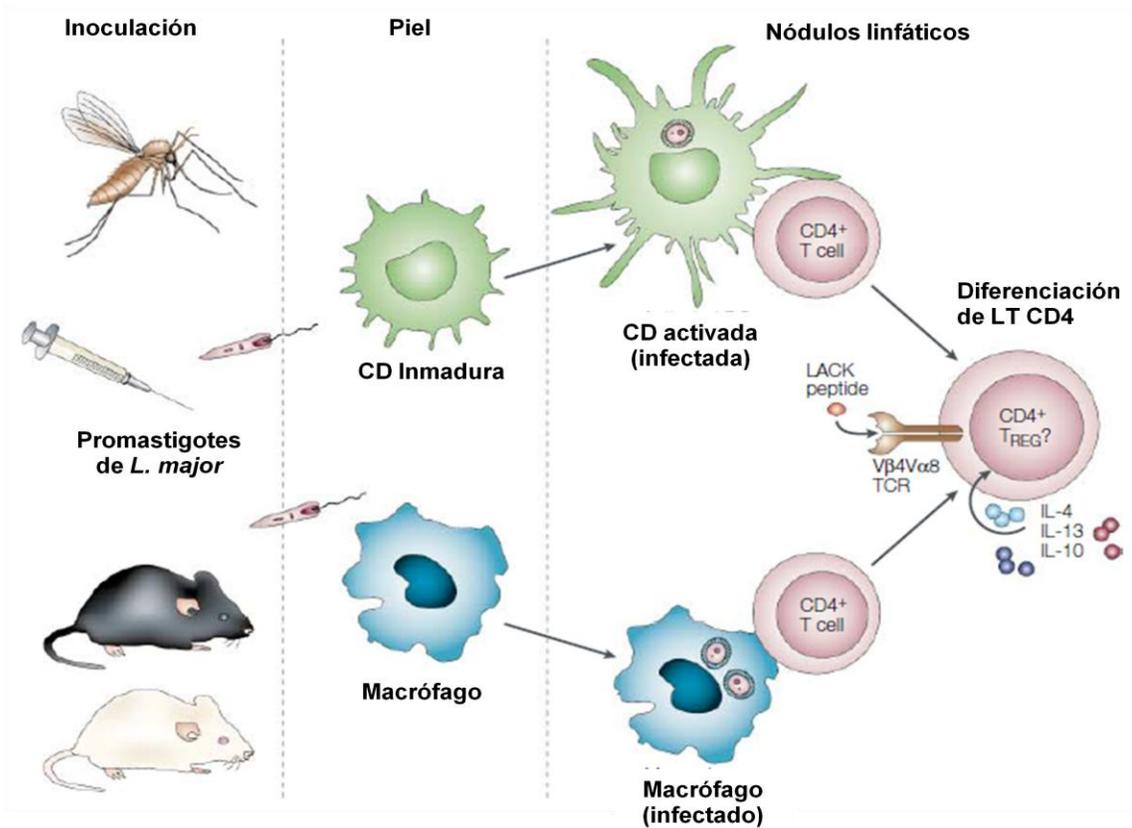


Figura 8) Modelos murinos en la respuesta inmune contra *L. major*. Los mecanismos de la respuesta inmune que se desarrolla en respuesta a la infección por *Leishmania* se usaron las cepas murinas C57Bl/6 (negro) y BALB/c (blanco), el primero es resistente mientras que BALB/c es susceptible. 49

Una vez que el parásito ha pasado la barrera de la piel entra en contacto con el sistema de complemento que causa la muerte de *Leishmania* a través de la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) formador de poros en la membrana del parásito ocasionando su muerte por choque osmótico (18;62-64). Sin embargo, el parásito posee moléculas inhibitoras de la lisis por complemento, por ejemplo, la gp63 que es la glicoproteína más abundante en su superficie es capaz de romper la molécula C3 a su forma inactiva C3bi, lo que ocasiona la opsonización del parásito y le permite

ser fagocitado para sobrevivir en el interior de la célula fagocítica (22;65-67). Otra molécula que le ayuda a lograr escapar de complemento es el lipofosfoglicano (LPG) que lo cubre hasta el flagelo. El LPG impide que se forme el MAC al ser una densa capa en la que no se inserta C5 ni las moléculas subsecuentes (17;19;29).

Los neutrófilos, las células dendríticas y los macrófagos son las principales células que fagocitan al parásito. Los neutrófilos además atrapan y lisan al parásito con las redes extracelulares de cromatina y proteínas granulares (NET's) que son liberadas cuando entran en contacto con el parásito y tienen una relación directa con la carga parasitaria. En ratones carentes de neutrófilos se encontró que los parásitos sobreviven e infectan a más células y con mayor cantidad de parásitos en comparación con los ratones silvestres (68;69).

Los macrófagos tienen un papel fundamental en la respuesta inmune contra *Leishmania* ya que al ser las células hospederas deben también eliminar al parásito para el control de la infección. Estas células fagocitan al parásito mediante diferentes receptores como los de complemento CR1 y CR3, receptores para anticuerpos como FcγRI y FcγRII y el receptor de manosa-fucosa (18;26;70). La activación a través de estos receptores desencadena la producción de ROS y NO así como de algunas citocinas como TNF-α e IL-12 entre otras (18;26;52;53;70).

La célula dendrítica también eliminan a los parásitos fagocitados a través de los mecanismos de la NADPH oxidasa y de la producción de NO además de la producción de IL-12 (24;71).

Entre los receptores de la respuesta inmune innata que reconocen a *Leishmania* están los receptores tipo Toll (TLR) que son capaces de reconocer moléculas del parásito y producir citocinas proinflamatorias (72;73). Uno de los TLRs que reconocen a *Leishmania* es TLR2, cuyo ligando es LPG. Esta interacción se describió en células NK humanas que mostraron activación y producción de IFN- γ (40). Otro de los TLRs que se activan con el parásito es TLR9. En macrófagos y células dendríticas murinas se encontró que el estímulo con DNA de *L. mexicana* y *L. major*, respectivamente, incrementa la expresión de RNA mensajero (mRNA) de TLR9, llevando a la producción de TNF- α e IL-12 (74;75).

1.3.3. Participación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en la leishmaniasis.

Los linfocitos T son activados por las células presentadoras de antígenos que expresan antígenos anclados a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II. Los microorganismos fagocitados se presentan por MHC-II y son reconocidos por receptores (TCR) de los linfocitos T CD4+. Por otro lado, los antígenos que ingresan al citosol de la célula como virus y algunas bacterias (*Listeria*) son presentados por MHC-I y activan a los linfocitos T CD8+ (76). *Leishmania* es procesada en el fagosoma por lo que sus antígenos son presentados principalmente por MHC-II con activación de linfocitos T CD4+. Estos linfocitos fueron los primeros en asociarse al progreso o cura de la infección por su capacidad de polarizar la respuesta hacia un tipo Th1 o Th2, también fueron considerados como el

blanco de activación de diversas vacunas y tratamientos contra la leishmaniasis (51;55;56).

En la leishmaniasis también se describió la activación de linfocitos T CD8+ específicos. En los últimos años se observó que su participación es fundamental para la resolución de la infección a través de sus funciones citotóxicas (77-81). En pacientes con LCD estos linfocitos se encuentran en una menor proporción y su activación se encuentra disminuida. Algunos estudios mostraron que la sobre-expresión de PD-1 en linfocitos CD8+ y su unión a sus ligandos PD-L1 ó PD-L2 lleva a la célula a un estado de agotamiento (82-85) favoreciendo la progresión de la infección. Sin embargo, el estímulo de TLR2 con LPG de *L. mexicana* rescató a éstos linfocitos, activándolos nuevamente (83;85;86). En enfermedades virales como hepatitis y VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) se observó que la expresión de PD-1 es dependiente de la carga viral. El bloqueo de PD-1 o de sus ligandos mediante anticuerpos, lleva a una disminución de la carga viral y las células recuperan sus funciones efectoras tanto de producción de citocinas como las de citotoxicidad (87-92). Esta regulación de los linfocitos T CD8+ a través de PD-1 ha hecho de este receptor un blanco farmacéutico para ciertos tipos de cáncer donde se observó que el bloqueo de este receptor o de sus ligandos provoca una activación de estos linfocitos lo que conlleva a la eliminación de células malignas con mejoría del paciente. Aunque el éxito es variable, dependiendo del tipo de cáncer y del tiempo de evolución del paciente, en la mayoría de los casos los resultados son favorables (87;88;93-96).

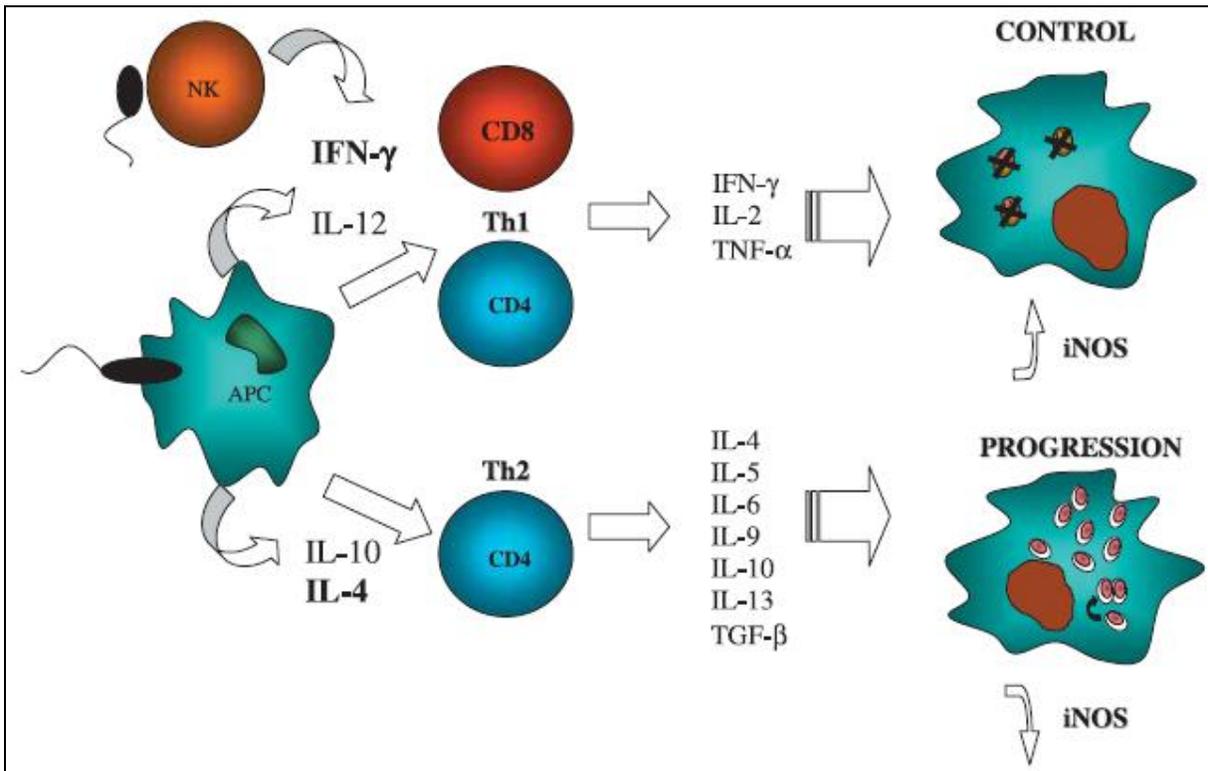


Figura 9) Respuesta Inmune contra Leishmania. La activación de los linfocitos T CD4 y CD8+ es importante para evitar el progreso de la infección. El perfil de citocinas Th1 o Th2 van a dirigir la respuesta inmune para activar o inhibir a otras células efectoras. El IFN- γ es una citocina requerida para la resolución de la infección y es producida mayoritariamente por células NK, linfocitos CD4 y CD8+. La citotoxicidad de los CD8+ ejercida sobre las células infectadas con el parásito es determinante para evitar el progreso de la infección. (80)

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Existen múltiples reportes sobre estudios e intentos en generar una vacuna contra la leishmaniasis humana. Se han utilizado parásitos muertos por calor o lisados, diferentes antígenos de *Leishmania* como la gp63, LACK, cPb, LPG, entre otros, ya sea purificados directamente del parásito o como proteínas recombinantes. Para analizar la efectividad de las vacunas se utilizan modelos murinos ya que se cuenta con modelos naturalmente resistentes a la mayoría de las cepas de *Leishmania* como lo son los ratones de la cepa C57/Bl6 y se cuenta con cepas muy susceptibles a la infección por *Leishmania*, como son los ratones de la cepa BALB/c. Por esta razón la mayoría de las vacunas contra *Leishmania* son evaluadas inicialmente en los ratones BALB/c. A la fecha no se reporta una vacuna exitosa tanto en la prevención de la infección como en el control de la misma, ya que la mayoría de los enfoques van dirigidos a la activación de linfocitos CD4+.

En nuestro laboratorio analizamos la inmunomodulación que ejerce el LPG sobre diferentes tipos celulares como las células NK, los macrófagos, las células dendríticas, los linfocitos T y los mastocitos, tanto en células humanas como murinas. Dada la potente capacidad inmunomoduladora que tiene el LPG de *L. mexicana*, esta molécula podría ser un buen candidato para la elaboración de una vacuna contra la leishmaniasis.

Estudios previos con el LPG de *L. amazonensis* muestran su capacidad de inducir exacerbación de la leishmaniasis cuando es inoculada en los ratones por vía intradérmica, mientras que tiene un efecto protector cuando es inoculada por vía

intranasal. En estos estudios no fueron estudiados los mecanismos responsables de esta respuesta aparentemente contradictoria.

En el presente trabajo se busca analizar si el LPG de *L. mexicana* es capaz de funcionar como antígeno vacunal cuando es inoculado por vía subcutánea en ratones BALB/c. Para evaluar el éxito de la vacuna analizaremos la respuesta inmune a través de la expresión de moléculas de activación como CD137 o inhibición como PD-1 en linfocitos T provenientes de bazo, así como de sus ligandos PD-L1 y PD-L2 en los macrófagos.

CAPÍTULO 3
HIPOTESIS
Y
CAPÍTULO 4
OBJETIVOS

3. HIPOTESIS

El LPG de *Leishmania mexicana* modula la respuesta inmune a través de la inducción de moléculas de activación/supresión en linfocitos T y sus ligandos en los macrófagos de ratones BALB/c inmunizados con LPG o infectados con el parásito.

4.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel inmunomodulador del LPG de *L. mexicana* a través de la regulación de la expresión de moléculas de activación o supresión de linfocitos T y macrófagos de ratones vacunados con LPG o infectados con *L. mexicana*.

4.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES

4.1.1.1. Analizar el efecto protector de la inmunización con LPG de *L. mexicana* en ratones BALB/c.

4.1.1.2. Analizar si la inmunización con LPG de *L. mexicana* induce la expresión de moléculas de activación/inhibición en linfocitos T CD4+ y CD8+ de bazo de ratones BALB/c.

4.1.1.3. Analizar si la infección de ratones BALB/c con *L. mexicana* induce la expresión de moléculas de activación/inhibición en linfocitos T CD4+ y CD8+ de bazo.

4.1.1.4. Analizar *in vitro* si el LPG de *L. mexicana* puede modular la expresión de PD-L2 en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c sanos.

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5. METODOLOGIA

5.1. PURIFICACIÓN DE LA LPG DE *L. mexicana*

Los parásitos de *Leishmania mexicana* fueron cultivados en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino descomplementado (GIBCO). Los promastigotes metacíclicos fueron cosechados en la fase estacionaria del cultivo. Se centrifugaron los parásitos durante 10 minutos a 3,200 x g y 4°C, después se contaron y se ajustaron a 1×10^9 parásitos para la purificación de LPG. Se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 frio. El paquete celular fue deslipidado con 80 ml de cloroformo-metanol-agua (4:8:3 v/v) por 30 min; el material insoluble se resuspendió en agua saturada con 1-butanol y posteriormente fue liofilizado (2 x 50 ml). El LPG se purificó por HPLC en una columna de octil-Sepharose (Pharmacia) mediante un gradiente lineal del 5 al 70 % de 1-propanol y acetato de amonio 0.1 M. Las fracciones que fueron desprendidas por el gradiente (fracción 15-30) se colectaron y liofilizaron, posteriormente se resuspendieron en 20 ml de acetato de amonio y se pasaron por una segunda columna de octil-Sepharose bajo las mismas condiciones. Nuevamente se colectaron las fracciones desprendidas por el gradiente (fracción 15 a 30), se concentraron a 3 ml y se dializaron 4 veces contra 5 litros de PBS pH 7.4. La pureza del LPG fue analizada en un gel SDS al 10 % con tinción de plata para carbohidratos. Por último, se determinó la concentración de carbohidratos en el LPG purificado por el método de Antrona. Como control de calidad se analizó la presencia de lipopolisacárido (LPS) mediante la prueba de aglutinación de amebocitos de *Limulus* y para descartar la presencia de proteínas contaminantes se analizó el LPG en un gel SDS-PAGE al 10 % con tinción de plata.

5.2. INMUNIZACIÓN DE RATONES BALB/c

Para todos los experimentos se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c, de 6 a 8 semanas de edad, las cuales fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Fisiología Celular y del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los ratones fueron mantenidos en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Los estudios con ratones fueron realizados con estricto apego a la NOM-062-ZOO-1999 ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO, evitando cualquier forma de sufrimiento.

5.2.1 ESQUEMA DE VACUNACIÓN

Los ratones fueron vacunados en tres ocasiones, al día 0, 15 y 30 (quincenalmente) con una dosis de 10 µg de LPG en 20 µL con PBS por inyección subcutánea. Otro grupo fue inmunizado con 100 µg de LPG utilizando la misma vía y los mismos tiempos. Para las inmunizaciones se utilizaron jeringas de insulina de 0.5 mL (BD Ultra-Fine) con una aguja de 31G x 8 mm.

5.2.2. VACUNACIÓN

Antes de cada inmunización, el dorso del ratón fue limpiado con una torunda de algodón con alcohol, después el ratón fue inmovilizado manualmente y se procedía a inyectar el dorso del ratón a la altura del cuello sin traspasar la capa de piel formando una burbuja en el sitio de inyección.

5.2.3 VALORACION DE LA EFICACIA DE LA VACUNA CON LPG

Para valorar la eficacia de la vacuna con 10 µg de LPG, un grupo de ratones fueron vacunados siguiendo el esquema de vacunación y después infectados tres semanas después de la última vacuna con 1×10^5 parásitos de *L. mexicana* en la dermis de la oreja derecha como ya se ha descrito. Una semana después se empezó a medir el grosor de la oreja en el sitio de infección con un vernier. Los resultados se fueron registrando semanalmente hasta la octava semana.

5.3. INFECCIÓN DE RATONES BALB/c CON *L. mexicana*

5.3.1. PREPARACIÓN DE LOS PARÁSITOS

Los parásitos de *L. mexicana* fueron mantenidos en cultivo, una vez que llegaron a la fase logarítmica de crecimiento fueron utilizados. Se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 minutos a 3,200 x g, el paquete celular fue resuspendido en PBS a temperatura ambiente para lavarlos, se centrifugaron nuevamente durante 10 minutos a 3,200 x g, este paso se repitió en dos ocasiones más. Durante el último lavado se contaron los parásitos y se ajustaron a una concentración de 1×10^5 ó 1×10^4 en 10 µl de PBS.

5.3.2. INOCULACIÓN DE LOS PARÁSITOS

Para la inoculación de los parásitos, los ratones fueron colocados en un vaporizador para ser anestesiados mediante inhalación con Sevoflurano (Abbott). Una vez inmóviles se limpió la oreja derecha con alcohol y se inyectaron en la dermis de la oreja, evitando vasos sanguíneos, con 1×10^4 ó 1×10^5 parásitos suspendidos en 10 μ l de PBS. Para este procedimiento se utilizaron jeringas de insulina pediátrica (BD) de 0.3 ml.

5.4. PURIFICACIÓN Y CULTIVO CELULAR

5.4.1. MACRÓFAGOS PERITONEALES

Los ratones fueron eutanizados mediante cámara de gas o dislocación cervical, se limpiaron con alcohol, se inmovilizaron con pinzas y se inyectaron 10 ml de PBS pH 7.4 frío en la cavidad peritoneal. Se aplicó un masaje y se recolectó nuevamente el PBS de la cavidad peritoneal con la jeringa. Las células obtenidas fueron colectadas en un tubo de 50 ml y centrifugadas durante 10 min a $800 \times g$ y 4 °C. El paquete celular fue contado y resuspendido en RPMI 1640 complementado con 10 % de SFB (GIBCO) y colocado en una placa de cultivo celular de 6 pozos (FALCON). Las células se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO₂.

5.4.2. LINFOCITOS DE BAZO (ESPLENOCITOS)

Los ratones fueron eutanizados mediante cámara de gas. Se limpiaron con alcohol y se inmovilizaron con pinzas. Se realizó una incisión en el costado derecho y se disecó el bazo, se colocó en una caja Petri de 10 mm estéril con RPMI 1640 frío y se mantuvo en hielo. Se maceró en una malla de 100 μm y las células obtenidas fueron centrifugadas a 4 °C durante 10 min a 2000 x g. El paquete celular obtenido fue resuspendido en 7 ml de PBS pH 7.4 frío y se pasó lentamente a un tubo de 15 ml que contenía 4 ml de Hystopaque® para hacer un gradiente de densidad celular. Se centrifugaron a 800 x g durante 20 minutos a 25 °C. Las células mononucleares que se encontraban en la interfase fueron aspiradas con una pipeta y colocadas en un tubo nuevo de 15 ml con 10 ml de PBS para lavarlas. Se centrifugaron a 800 x g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante fue desechado y el paquete celular fue resuspendido en 10 ml de PBS pH 7.4 y centrifugado a 800 x g durante 10 min a 4 °C. Este proceso se repitió una vez más. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer, y se colocaron 4 millones de células en medio RPMI 1640 con 10 % de SFB en una placa de 6 pozos a una concentración de $2 \times 10^6/\text{ml}$. El cultivo fue mantenido en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO_2 .

5.5 ESTIMULACIÓN CELULAR

5.5.1. MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATONES BALB/c SANOS ESTIMULADOS CON LPG

Los macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c sanos se ajustaron a 1×10^6 en 1 ml y fueron estimulados con 1, 5 ó 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPG. El estímulo se mantuvo con las células en cultivo en placas de 24 ó 6 pozos a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 horas. Después las células fueron cosechadas y centrifugadas a 4 °C durante 10 min a 805 x g y el paquete celular fue resuspendido en 1 ml de PBS y centrifugado nuevamente. El sobrenadante fue desechado y las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 15 minutos, después se lavaron con PBS y se resuspendieron en 50 μl de PBS frío y se procedió a marcarlas con los anticuerpos específicos para el análisis por citometría de flujo. En macrófagos peritoneales se analizó F4/80 para determinar pureza celular y PD-L2 para ver si su expresión se correlacionaba con la dosis de LPG utilizado para la estimulación.

5.5.2. INFECCIÓN *In vitro* DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATONES BALB/c SANOS CON PROMASTIGOTES DE *L. mexicana*

Para la infección *in vitro* de las células, los promastigotes de *L. mexicana* fueron cosechados en su fase estacionaria de crecimiento, se lavaron dos veces con PBS y se contaron. Se pusieron en co-cultivo en razón de 1:10 (células: parásitos) durante 18 horas con los macrófagos peritoneales provenientes de ratones sanos y se mantuvieron

a 26 °C durante dos horas y posteriormente se pasaron a 37 °C durante 16 horas adicionales. A una condición además se le agregaron 5µl de LPG y como control negativo se utilizaron células sin estímulo. Después las células fueron cosechadas y lavadas con PBS centrifugando durante 10 min a 4 °C y 805 x g. Las células fueron fijadas durante 15 minutos con 200 µl de paraformaldehído al 2 %, después se lavaron con PBS y se centrifugaron a 805 x g durante 10 min a 4 °C. El paquete celular fue resuspendido en 50 µl de PBS y marcado con los anticuerpos específicos para citometría de flujo. En estas células se analizó PD-L1 y PD-L2 así como F4/80 para determinar la pureza celular.

5.5.3. ESTIMULACIÓN DE ESPLENOCITOS DE RATONES VACUNADOS O INFECTADOS CON LPG DE *L. mexicana*

Se obtuvieron esplenocitos provenientes de ratones vacunados con diferente dosis de LPG (10 ó 100 µg) o infectados con diferente número de parásitos (1×10^4 ó 1×10^5). Se colocaron en placas de cultivo celular de 6 pozos en condición de 4×10^6 por pozo (2×10^6 /ml) y se estimularon de la siguiente manera: una condición sin estimular y a las otras se les agregó 1, 5 ó 10 µg de LPG de *L. mexicana* por ml de medio RPMI 1640. El estímulo se mantuvo durante 24 horas con las células en cultivo a 37 °C y 5 % de CO₂. Después las células fueron cosechadas y lavadas con PBS centrifugando a 805 x g durante 10 min y 4 °C. El paquete celular se resuspendió en 200 µl de PBS frío y se dividieron en 4 tubos con 50 µl cada uno. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % y después marcadas con los anticuerpos para analizar la expresión de CD137, PD-1, PD-L2, F4/80, CD3, CD4+ y CD8+ .

5.6. CITOMETRIA DE FLUJO

5.6.1. TINCIÓN CELULAR CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA CITOMETRIA DE FLUJO

Las células estimuladas fueron fijadas con paraformaldehído al 2 % durante 15 minutos, después se lavaron con PBS y se colocaron en tubos de 1.5 ml en condición de 1×10^6 en 50 μ l. Se adicionó 1 μ g de cada anticuerpo como se describe a continuación:

ANTICUERPO	MACROFAGOS	ESPLENOCITOS	COLOR
F4/80	✓	✓	PE
PD-L1	✓	-	FITC
PD-L2	✓	✓	PE
H-2	-	✓	PE
PD-1	-	✓	PE
CD137	-	✓	PE
CD3	-	✓	APC
CD4+	-	✓	PE/Cy7
CD8+	-	✓	PerCP/Cy5.5

Una vez adicionados los anticuerpos las células fueron incubadas a 4 °C en obscuridad durante 30 minutos. Después se les agregaron 900 μ l de PBS y se centrifugaron durante 10 minutos a 805 x g a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 300 μ l de PBS y se pasaron a tubos para citometría de flujo. Como controles de fluorescencia se utilizaron los isotipos para cada anticuerpo o células sin marcar.

Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo FACS FLOW CANTO II.

5.7. PRUEBA ESTADISTICA

Los resultados fueron graficados con base en el promedio y la desviación estándar. Para determinar si las diferencias eran significativas se aplicó la prueba U de Mann-Whitney y el valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Vacunación con LPG de *L. mexicana*

Para analizar si el LPG de *L. mexicana* protege a los ratones ante una infección por *Leishmania*, se vacunaron 6 ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad, por vía subcutánea con 10 µg de LPG de *L. mexicana*. Se aplicaron 3 dosis con intervalos quincenales. Como control un grupo de ratones se inoculó en la oreja derecha con 10 µL de PBS. Tres semanas después de la última vacuna, ambos grupos de ratones fueron infectados en el pabellón auricular con 100 mil promastigotes de *L. mexicana*. La infección se monitoreó durante 8 semanas, antes de que la oreja se ulcerara. Se midió el grosor de la oreja en el sitio de infección con un Vernier. Los milímetros (mm) de la oreja fueron registrados y se graficaron los promedios de los grupos.

Los ratones del grupo control fueron los primeros en presentar signos de inflamación en el sitio de la infección y mostraron el cuadro clásico de la enfermedad. Observamos el desarrollo de la infección en el sitio de inoculación de los parásitos encontrando un aumento progresivo de la lesión durante el transcurso de las semanas. Por el contrario, los ratones vacunados mostraron al inicio lesiones similares al control, sin embargo, después de la quinta semana de infección notamos que el grosor de la dermis de la oreja fue menor al observado en el grupo control (PBS) (Figura 10). Sin embargo, los ratones vacunados empezaron a mostrar lesiones periféricas en tejidos distantes, como en la oreja izquierda (que no fue inoculada), en las patas y en la nariz, simulando una forma más agresiva de la infección, tal como ocurre en pacientes con leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Estas lesiones fueron aumentando de tamaño con

el transcurso del tiempo y hasta la eutanización del ratón (datos no mostrados). Esto demuestra que la LPG no fue capaz de proteger contra la infección por *L. mexicana*, al contrario favorece la progresión y diseminación de la enfermedad.

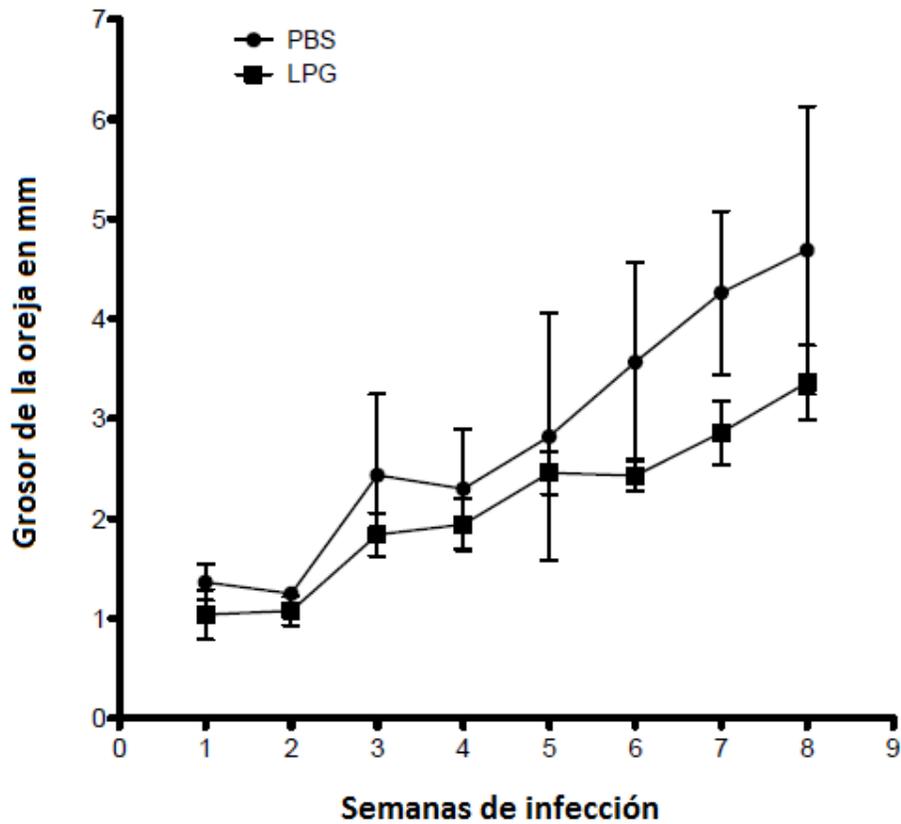


Figura 10) La vacunación con LPG de *L. mexicana* no fue capaz de proteger contra la leishmaniasis. Grosor en mm de la dermis de la oreja de los ratones vacunados con LPG (■) y del grupo control inoculado con PBS (●); ambos fueron infectados con 1×10^5 promastigotes de *L. mexicana* en la dermis de la oreja y la inflamación se midió durante 8 semanas. Promedio y desviación estándar, n=4.

6.2. Efecto de la LPG de *L. mexicana* sobre la expresión de PD-L1 y PD-L2 en macrófagos murinos.

6.2.1. Expresión de PD-L2 en macrófagos peritoneales estimulados *in vitro* con LPG de *L. mexicana*

En macrófagos peritoneales analizamos la expresión de PD-L1 y PD-L2, que son ligandos de PD-1, dado que los macrófagos son las principales células hospederas del parásito además de presentadoras de antígenos y activadoras de linfocitos T. Se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratones hembras BALB/c sanas de 8 semanas de edad, se estimularon *in vitro* con diferentes concentraciones de LPG, 1, 5 ó 10 µg/mL, y una condición se mantuvo sin estimular como control (NS). Se dejaron durante 24 horas en cultivo con el estímulo y después se analizó la expresión de PD-L2 por citometría de flujo. Observamos que la expresión de PD-L2 en macrófagos peritoneales murinos es dosis-dependiente (Figura 11), sin embargo, aunque en todas las condiciones la expresión de PD-L2 tiende a aumentar cuando las células son estimuladas con LPG, sólo el estímulo con 5 µg mostró ser estadísticamente significativo con un aumento de dos veces con respecto a las células sin estímulo. Estos datos demuestran que el LPG de *L. mexicana* es capaz de modular positivamente la expresión de PD-L2 en macrófagos murinos.

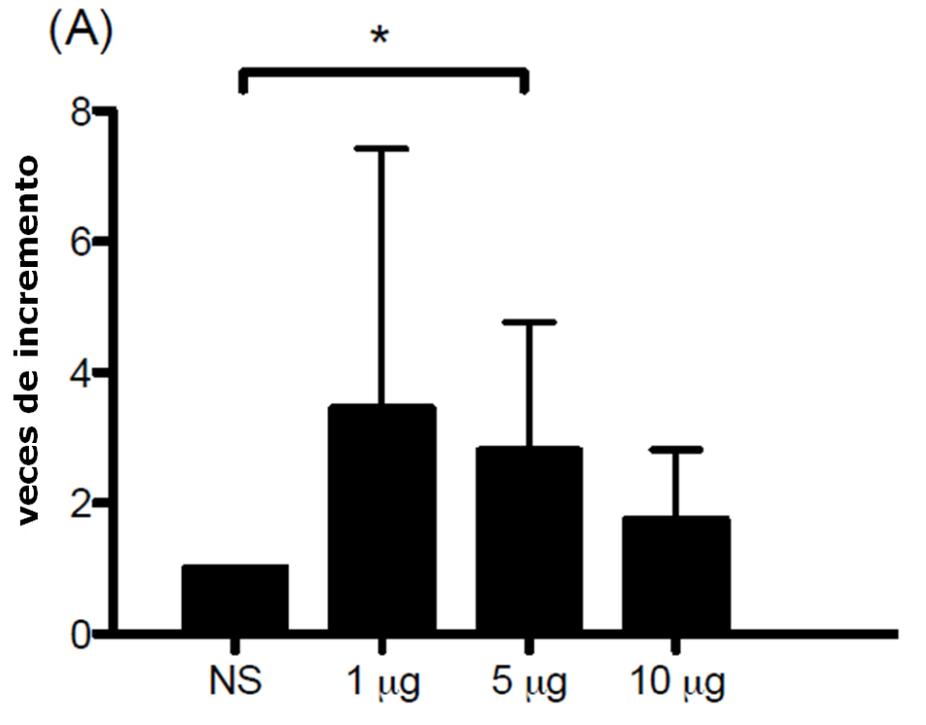


Figura 11) Expresión de PD-L2 en macrófagos murinos peritoneales incubados con LPG de *L. mexicana*. Los datos fueron normalizados utilizando como referencia las células sin estímulo. Se muestra el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. NS= non stimulated (no estimulados).

*p < 0.05

6.2.2. Expresión de PD-L2 y PD-L1 en macrófagos peritoneales infectados con promastigotes de *L. mexicana* con y sin estímulos *in vitro* con LPG .

Analizamos si la infección de macrófagos murinos con el parásito en presencia o ausencia de estímulos con LPG tiene un efecto sobre la expresión de PD-L1 y PD-L2. Se infectaron las células con promastigotes de *L. mexicana* en razón de 1:10 (células:parásitos) y se analizó la expresión de PD-L1 y PD-L2 por citometría. Observamos que la infección con el parásito en presencia del estímulo con LPG no modifica la expresión de PD-L1 (Figura 12). Sin embargo, la infección con el parásito en ausencia del estímulo con LPG regula negativamente la expresión de PD-L1, generando una disminución significativa de 8% en comparación con células sin estímulo y sin infección (Figura 12).

En contraste, cuando las células fueron infectadas con *L. mexicana* y estimuladas con LPG mostraron una sobre-expresión de PD-L2, incrementando 1.5 veces su expresión con respecto a las células sin infección y sin estímulo. Las células que sólo fueron infectadas con el parásito mostraron un incremento en la expresión de PD-L2 por 0.17 veces, lo cual indica que el LPG de *L. mexicana* es la molécula responsable de la sobre-expresión de PD-L2.

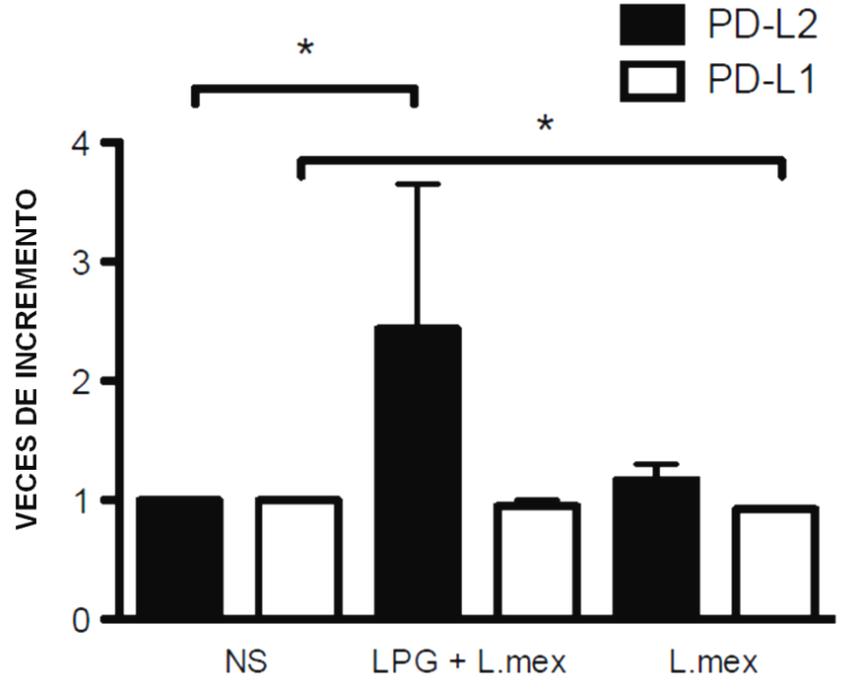


Figura 12) Expresión de PD-L2 y PD-L1 en macrófagos peritoneales infectados con promastigotes de *L. mexicana* con y sin estímulos *in vitro* con LPG. Los datos fueron normalizados tomando como referencia las células no estimuladas (NS), promedio y \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$

6.3. Efecto de la vacunación con LPG de *L. mexicana* en la expresión de moléculas de activación/inhibición en linfocitos T de ratones BALB/c.

6.3.1. Expresión de PD-1 en linfocitos T CD4+ provenientes de bazo de ratones vacunados con LPG.

Una vez que observamos que la vacunación con LPG inducía la progresión de la leishmaniasis a formas más graves, decidimos analizar el efecto de la vacuna sobre moléculas de activación (CD137) e inhibición (PD-1) en linfocitos T. Se analizó la expresión de los receptores PD-1 y CD137 en linfocitos T CD4+ provenientes del bazo de ratones vacunados con 10 ó 100 µg de LPG y se comparó con linfocitos T CD4+ de ratones sanos. Los linfocitos T CD4+ de los ratones vacunados con 10 µg de LPG y re-estimulados con 5 y 10 µg de LPG disminuyeron la expresión de PD-1 por 0.58 y 0.44 veces, respectivamente, en comparación con sus similares sanos, siendo estos datos estadísticamente significativos. Únicamente el estímulo con 1 µg incrementó la expresión de PD-1 por 0.09 veces (Figura 13).

Los linfocitos T CD4+ de ratones vacunados con 100 µg y re-estimulados con 1 y 5 µg de LPG tienden a aumentar la expresión de PD-1 en 0.17 y 0.14 veces respectivamente, mientras que en los re-estimulados con 10 µg redujo 0.1 veces la expresión de PD-1 (Figura 13).

En ambos casos, la expresión de PD-1 depende de la concentración de LPG utilizada para la vacunación y la re-estimulación de las células: la vacunación con 100 μg es la que indujo una mayor expresión de PD-1.

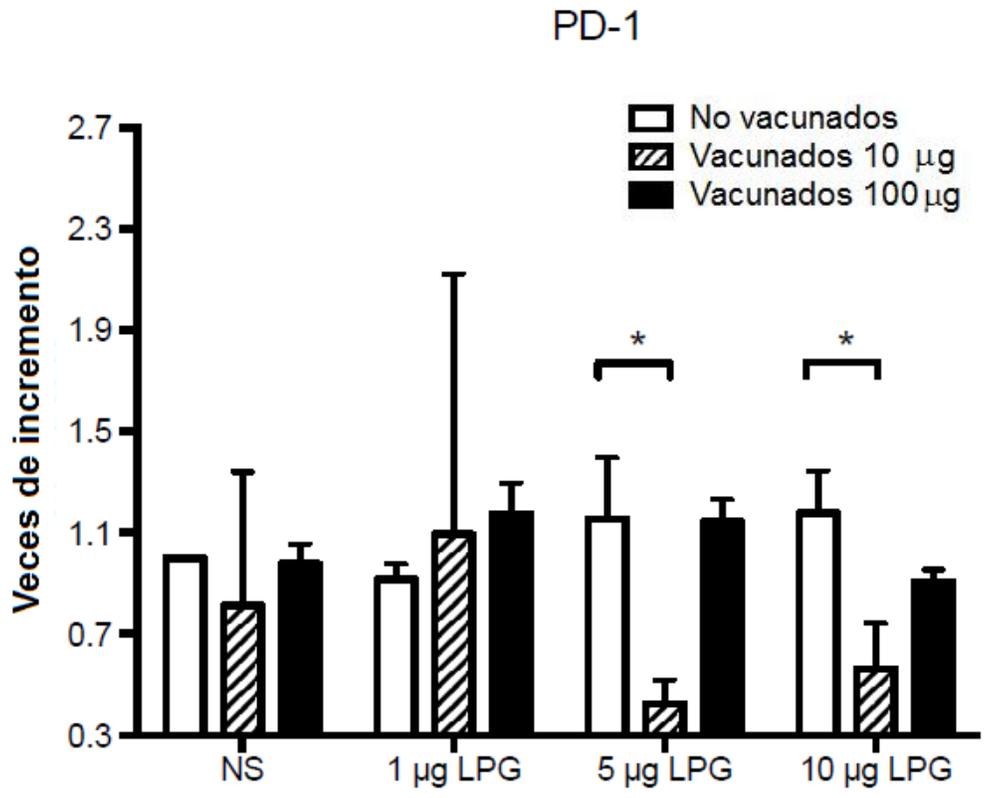


Figura 13) Expresión del receptor de inhibición PD-1 en linfocitos T CD4+ de ratones BALB/c vacunados con 10 ó 100 μg de LPG. Las células fueron re-estimuladas con 1, 5 ó 10 μg de LPG. Datos normalizados tomando como referencia los valores de los ratones sanos. NS= no estimulados. Promedio y \pm desviación estándar de n=3. *p < 0.05

6.3.2. Expresión de CD137 en linfocitos T CD4+ provenientes de bazo de ratones vacunados con LPG.

Analizamos la activación de los linfocitos T CD4+ a través de la expresión de CD137 en ratones vacunados con LPG de *L. mexicana*. La incubación *in vitro* con LPG redujo la expresión de CD137 en los linfocitos T CD4+ de los ratones sanos no vacunados: al estimular los linfocitos con 1, 5 y 10 µg, observamos que disminuyó la expresión de CD137 por 0.09, 0.15 y 0.05 veces, respectivamente, al compararla con las células sin estimular.

Encontramos también que la expresión de CD137 disminuyó en las células de ratones vacunados con 10 µg y re-estimuladas con LPG. Las células re-estimuladas con 5 µg mostraron una disminución de 0.31 veces. Sin embargo, los datos más significativos fueron encontrados en los grupos de células sin estimular que mostraron disminución de aproximadamente 0.36 veces y en las células re-estimuladas con 10 µg de LPG que redujeron la expresión de CD137 por 0.53 veces, comparados con sus controles sanos (Figura 14). El único grupo donde aumentó la expresión de CD137 fue el re-estimulado con 1 µg de LPG ya que incrementó su expresión 0.28 veces (Figura 14).

En los ratones vacunados con 100 µg de LPG, la expresión de CD137 tiende a disminuir en todas las condiciones entre 0.10 y 0.20 veces, sin embargo, ningún dato resultó ser estadísticamente significativo al compararlo con su control sano.

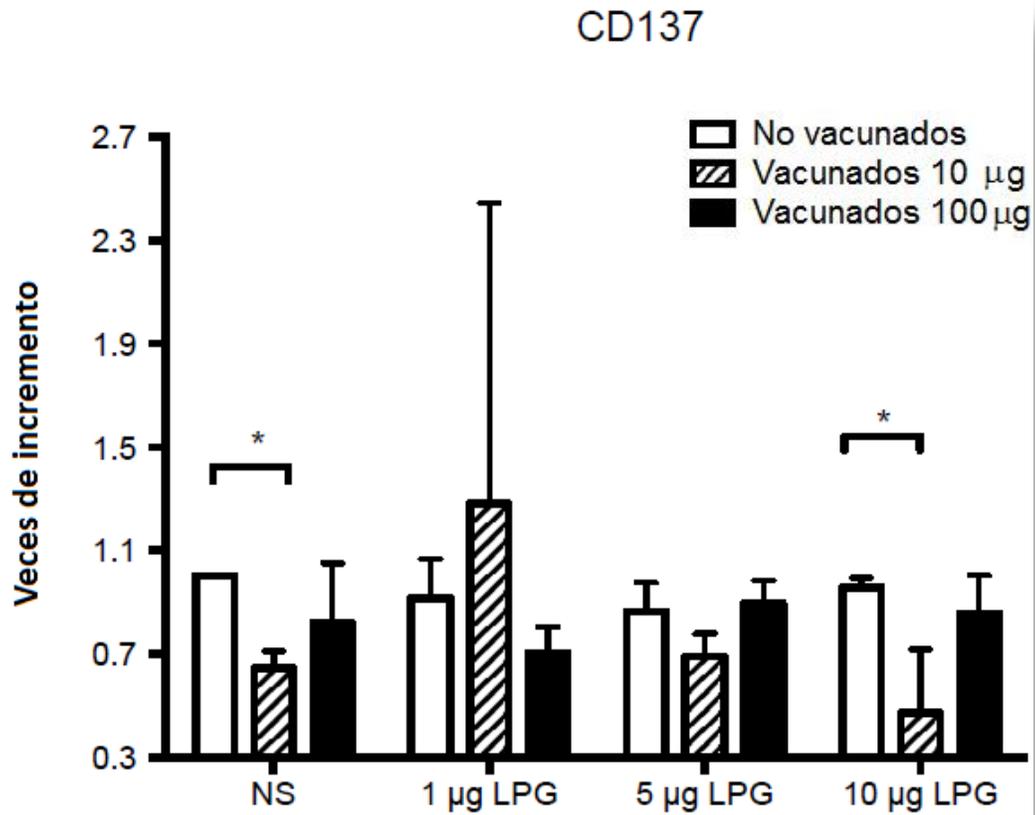


Figura. 14) Expresión del receptor de activación CD137 en linfocitos T CD4+ de ratones vacunados con 10 ó 100 µg de LPG de *L. mexicana*. Los linfocitos fueron re estimulados con 1, 5 ó 10 µg de LPG. Datos normalizados tomando como referencia las células sin estímulo de los ratones sanos. NS= no estimuladas. Promedio y \pm desviación estándar de n=3. *p<0.05

6.3.3. Expresión de PD-1 en linfocitos T CD8+ provenientes de bazo de ratones vacunados con LPG.

Una vez que observamos la modulación que ejerce la vacuna de LPG de *L. mexicana* sobre los linfocitos T CD4+, decidimos analizar su efecto sobre los linfocitos T CD8+. En los linfocitos T CD8+ de los ratones no vacunados observamos que el estímulo con 1µg incrementa la expresión de PD-1 por 0.04 veces, mientras que los re-estímulos con 5 y 10 µg de LPG *in vitro* aumenta la expresión de PD-1 por 0.13 veces (Figura 15). En los ratones vacunados con 10 µg de LPG, el incremento en la expresión de PD-1 fue mayor, ya que las células sin estimular aumentaron la expresión de PD-1 por 1.2 veces, comparado con el control sano. Las células re-estimuladas con 1 ó 10 µg de LPG incrementaron 1.07 veces, y cuando fueron re-estimuladas con 5 µg incrementaron 1.26 veces, comparados con sus controles sanos estimulados. Todos los datos resultaron estadísticamente significativos (Figura 15).

Los ratones vacunados con 100 µg de LPG también mostraron un aumento en la expresión de PD-1 que fue ligeramente mayor al encontrado en los ratones sanos y similares a los vacunados con 10 µg. Los linfocitos sin estimular incrementaron la expresión de PD-1 en 1.19 veces mientras que los re-estimulados con 1µg de LPG aumentaron la expresión en 1.7 veces. Los re-estímulos con 5 µg y 10 µg incrementaron la expresión de PD-1 por 1.52 y 1.33 veces, respectivamente, comparados con sus controles sanos. Todos los datos fueron estadísticamente significativos (Figura 15).

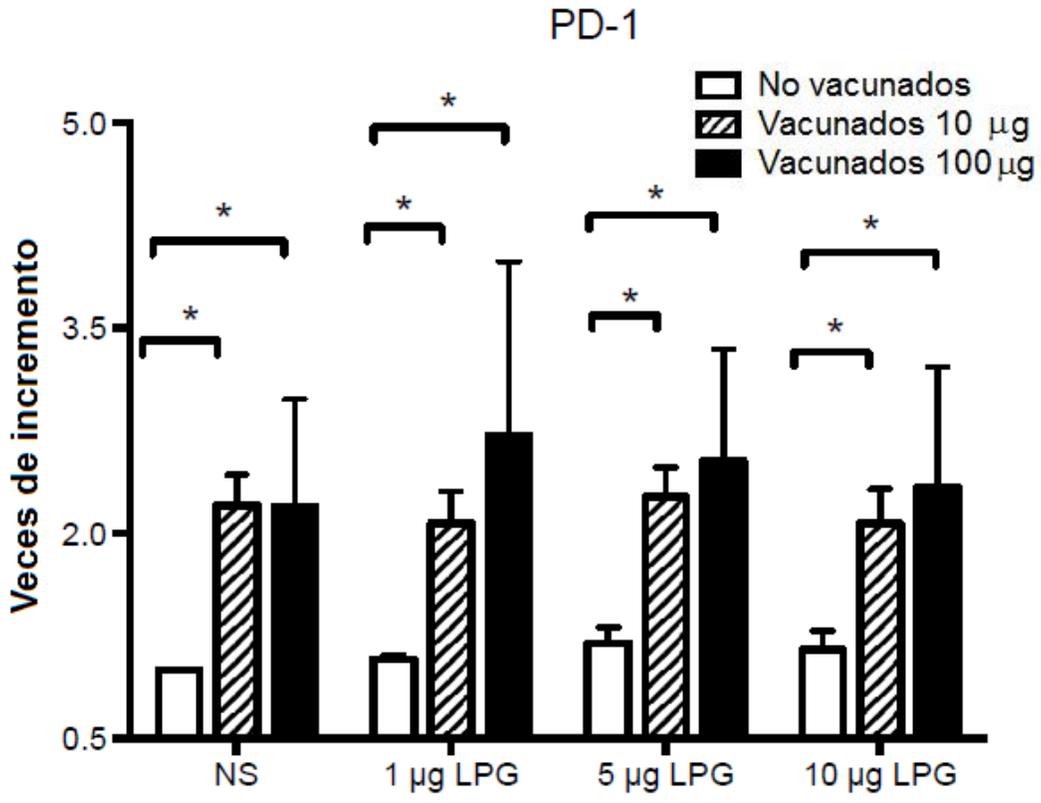


Figura 15) Expresión del receptor de inhibición PD-1 en linfocitos T CD8+ de ratones BALB/c vacunados con 10 ó 100 µg de LPG. Las células fueron reestimuladas con 1, 5 ó 10 µg de LPG. Datos normalizados tomando como referencia los valores de los ratones sanos. NS= no estimulados. n=3, *p <0.05

6.3.4. Expresión de CD137 en linfocitos T CD8+ provenientes de bazo de ratones vacunados con LPG.

Al encontrar que PD-1 estaba sobre-expresado en los linfocitos T CD8+ de los ratones vacunados, decidimos analizar la expresión de CD137 en estas células para observar si la activación en éstas también se modificaba con la vacuna. Encontramos que en los linfocitos T CD8+ de los ratones sanos disminuyó la expresión de CD137 en 0.22, 0.04 y 0.02 veces en las células estimuladas *in vitro* con 1, 5 ó 10 μg de LPG, respectivamente (Figura 16).

En los ratones vacunados con 10 μg de LPG se observó la disminución de CD137 en los linfocitos T CD8+ no re estimulados, de 0.15 veces, comparados con los controles sanos. Cuando las células fueron re-estimuladas con 1 μg encontramos una disminución de 0.14 veces y con 5 y 10 μg de LPG observamos una disminución significativa de 0.2 veces, al compararlos con los sanos (Figura 16). El análisis de los ratones vacunados con 100 μg reveló una disminución más notable en la expresión de CD137 ya que para las células sin estimular, la disminución fue de 0.25 veces, mientras que para las células re-estimuladas con 1, 5 ó 10 μg de LPG, fue de 0.25, 0.27 y 0.32 veces, respectivamente (Figura 16).

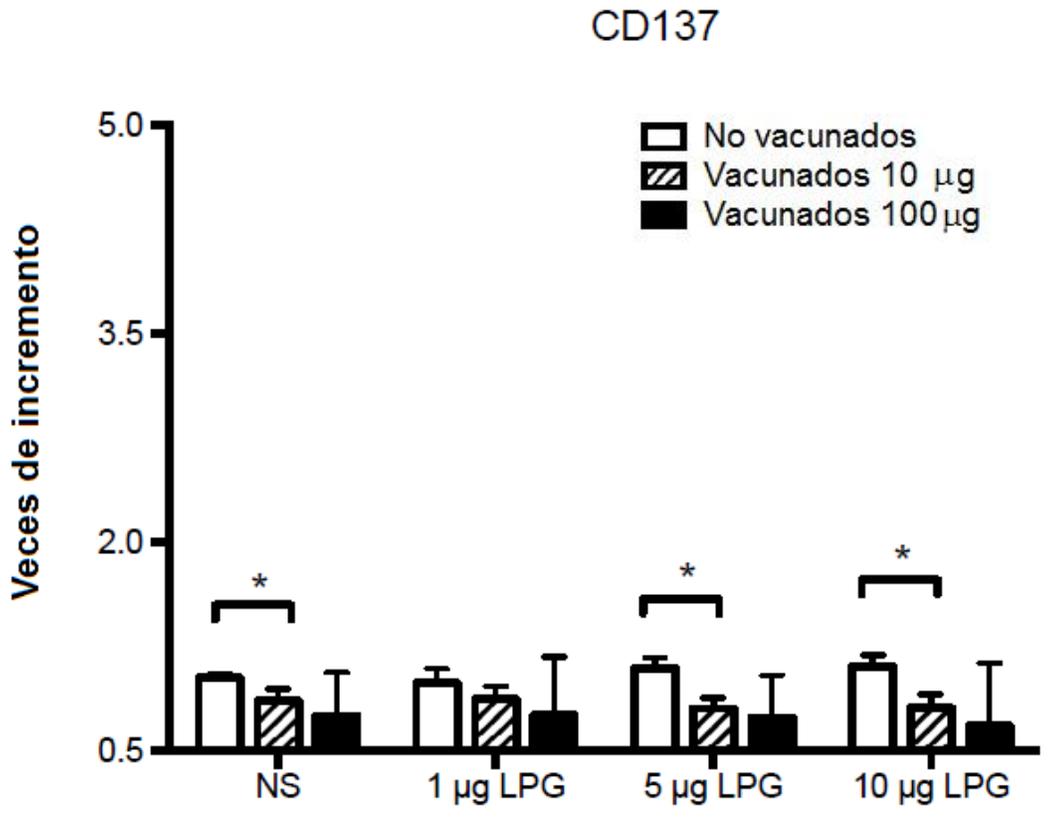


Figura 16) Expresión del receptor de activación CD137 en linfocitos T CD8+ de ratones vacunados con 10 ó 100 µg de LPG de *L. mexicana*. Los linfocitos fueron re estimulados con 1, 5 ó 10 µg de LPG. Datos normalizados tomando como referencia las células no estimuladas de los ratones sanos. NS= no estimulados. n=3 *p<0.05

6.4. Análisis del efecto de la infección con *L. mexicana* en la expresión de moléculas de activación (CD137) o inhibición (PD-1) en linfocitos T de bazo de ratones BALB/c.

6.4.1. Expresión de PD-1 en linfocitos T CD4+ provenientes de bazo de ratones infectados en la dermis de la oreja con promastigotes de *L. mexicana*.

Una vez que descubrimos la modulación que ejerce la vacuna con LPG sobre la activación e inhibición de los linfocitos T, buscamos analizar si la infección con el parásito podría tener algún efecto en la expresión de PD-1. Hasta ahora no se conoce si la infección con *L. mexicana* tiene algún efecto en la inhibición o activación de los linfocitos T. Para ello infectamos ratones con 1×10^4 ó 1×10^5 promastigotes de *L. mexicana* en la dermis de la oreja y analizamos la expresión de CD137 y PD-1 en linfocitos T CD4+ y CD8+ purificados del bazo.

Encontramos que la expresión de PD-1 en los linfocitos T CD4+ de los ratones infectados con 1×10^4 parásitos aumentó 0.12 veces en células sin estímulo al compararlas con controles sanos. En las células re-estimuladas con 1, 5 y 10 μg de LPG, disminuyó la expresión en 0.09, 0.05 y 0.06 veces, respectivamente, al compararlos con los controles sanos (Figura 17). En los ratones infectados con 1×10^5 parásitos se observó una sobre sobre-expresión de PD-1 en comparación con células de ratones sanos. Esta sobre-expresión fue de 0.14 veces en células sin estímulo, mientras que el re-estimulo indujo un incremento de 0.31, 0.43 y 0.42 veces cuando fueron re-estimuladas con 1, 5 y 10 μg de LPG, respectivamente (Figura 17).

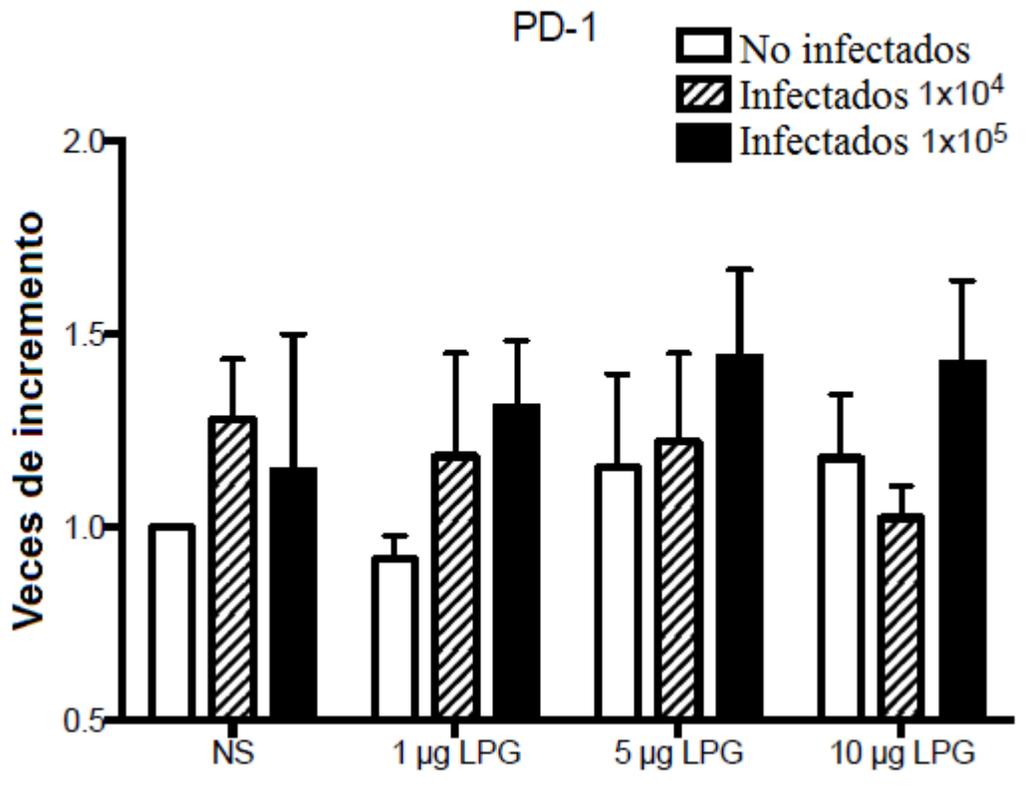


Figura 17) Expresión del receptor de inhibición PD-1 en linfocitos T CD4+ de ratones BALB/c infectados en la dermis de la oreja con 1×10^4 ó 1×10^5 promastigotes de *L. mexicana*. Las células fueron re estimuladas con 1, 5 ó 10 µg de LPG. Datos normalizados tomando como referencia los valores de los ratones sanos. NS= no estimulados. n=3, *p <0.05

6.4.2. Expresión de CD137 en linfocitos T CD4+ provenientes de bazo de ratones infectados en la dermis de la oreja con promastigotes de *L. mexicana*.

Analizamos si la infección con *L. mexicana* tenía también un efecto en la activación de los linfocitos T. Se obtuvieron los linfocitos del bazo de los ratones infectados con 1×10^4 ó 1×10^5 promastigotes y analizamos la expresión de CD137.

Linfocitos de los ratones infectados con 1×10^4 parásitos mostraron una disminución de CD137 por 0.20 veces en las células sin re-estímulo, mientras que el re-estímulo con $1 \mu\text{g}$ incrementó la expresión por 0.17 veces y las re-estimuladas con $10 \mu\text{g}$ incrementó la expresión 0.05 veces. En contraste, las células estimuladas con $5 \mu\text{g}$ de LPG incrementaron la expresión de CD137 por 0.04 veces. Ninguno de los datos anteriores resultaron estadísticamente significativos al compararlos con los controles (Figura 18).

En los ratones infectados con 1×10^5 parásitos, las células sin re-estimulación y las re-estimuladas con $1 \mu\text{g}$ de LPG mostraron una disminución de la expresión de CD137 por 0.03 y 0.20 veces, respectivamente. Para las células re-estimuladas con 5 y $10 \mu\text{g}$ de LPG observamos el efecto contrario: CD137 aumentó 0.51 y 0.14 veces, respectivamente (Figura 18).

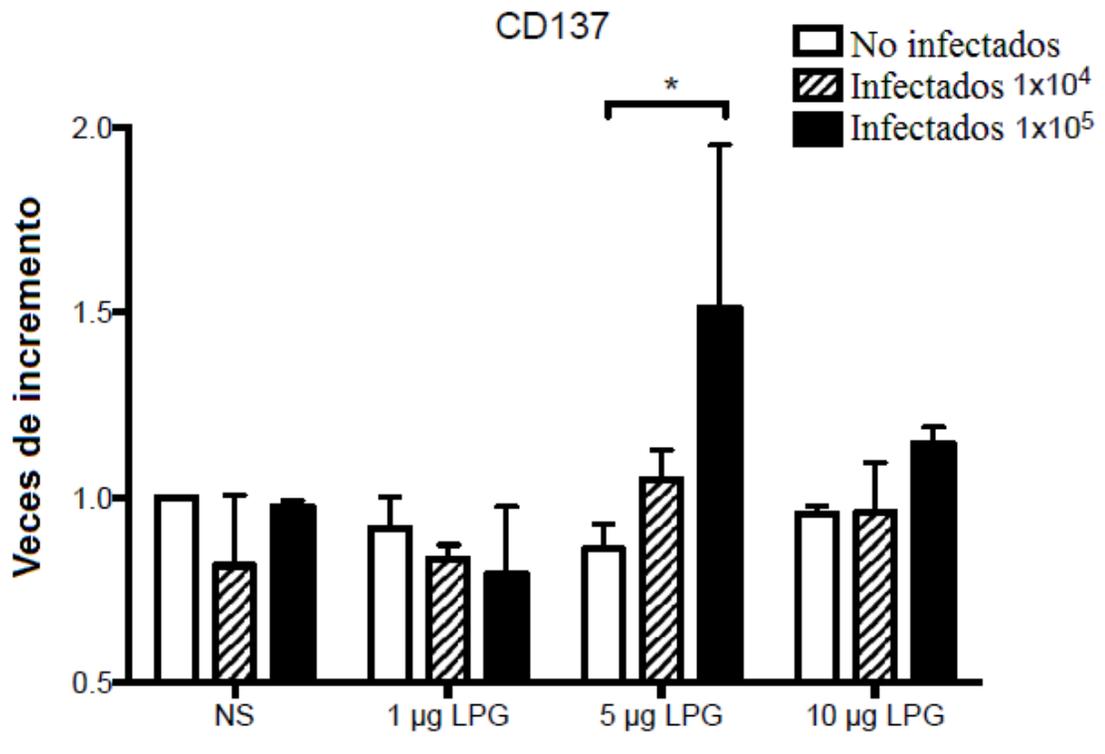


Figura 18) Expresión del receptor de activación CD137 en linfocitos T CD4+ de ratones BALB/c infectados en la dermis de la oreja con 1×10^4 ó 1×10^5 promastigotes de *L. mexicana*. Las células fueron re estimuladas con 1, 5 ó 10 µg de LPG. Datos normalizados tomando como referencia los valores de los ratones sanos. NS= no estimulados. n=3, *p <0.05

6.4.3. Expresión de PD-1 en linfocitos T CD8+ provenientes de bazo de ratones infectados en la dermis de la oreja con promastigotes de *L. mexicana*.

Con los resultados obtenidos sobre el efecto de la infección en la expresión de moléculas de inhibición y activación en los linfocitos T CD4+, decidimos investigar si este efecto era extrapolable a los linfocitos T CD8+. En los ratones infectados con 1×10^4 promastigotes descubrimos que PD-1 estaba sobre-expresado en los linfocitos T CD8+ en todas las condiciones, desde las células sin estimular donde el aumento fue de 0.56 veces, y en las estimuladas con 1, 5 ó 10 μg de LPG, donde el aumento fue 0.56, 0.53 y 0.46 veces, respectivamente (Figura 19).

Los linfocitos T CD8+ de los ratones infectados con 1×10^5 promastigotes mostraron una sobre-expresión de PD-1 mayor que los infectados con 1×10^4 parásitos. En las células sin re-estimulación, el aumento fue de 2.6 veces, mientras que en las re-estimuladas con 1, 5 ó 10 μg de LPG, el aumento fue de 3.5, 3.2 y 3.8 veces, respectivamente, comparados con células de controles sanos (Figura 19).

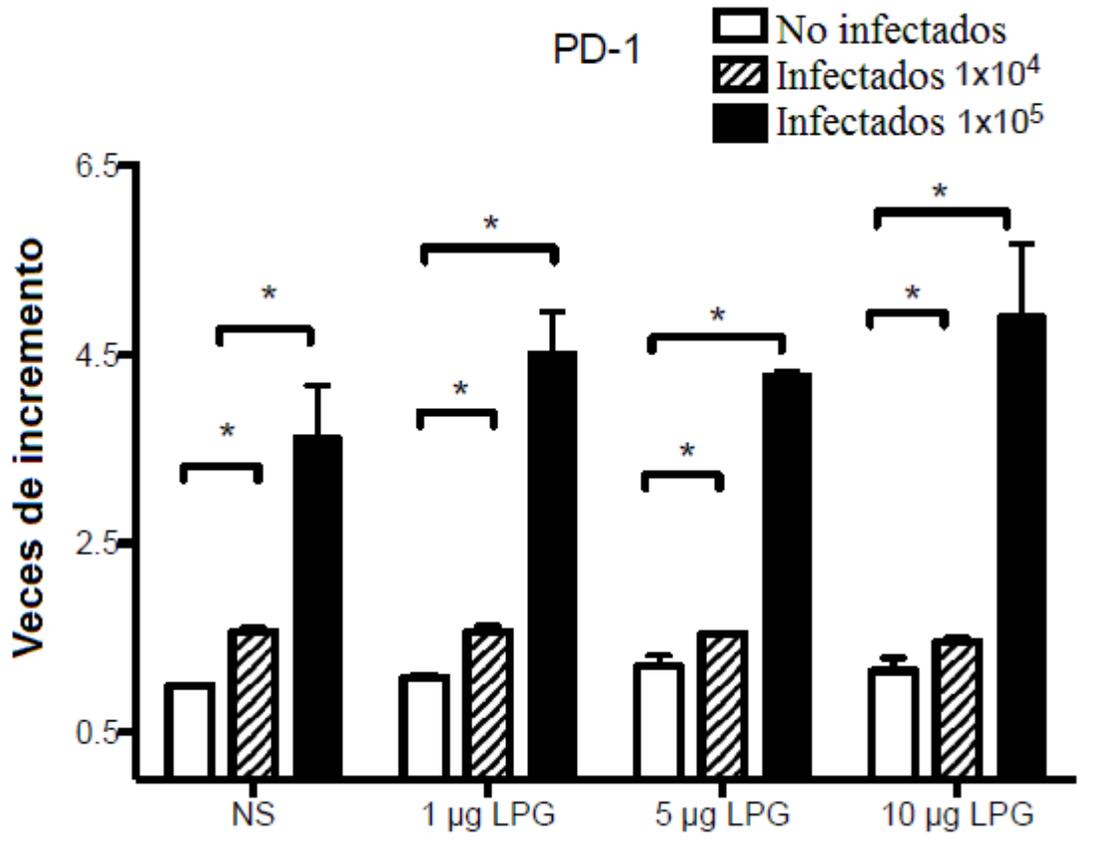


Figura 19) Expresión del receptor de inhibición PD-1 en linfocitos T CD8+ de ratones BALB/c infectados en la dermis de la oreja con 1×10^4 ó 1×10^5 promastigotes de *L. mexicana*. Las células fueron re estimuladas con 1, 5 ó 10 µg de LPG. Datos normalizados tomando como referencia los valores de los ratones sanos. NS= no estimulados. n=3, *p <0.05

6.4.4. Expresión de CD137 en linfocitos T CD8+ provenientes de bazo de ratones infectados en la dermis de la oreja con promastigotes de *L. mexicana*.

Al observar que la infección con el parásito induce la expresión de PD-1 de manera dosis-dependiente, analizamos si infección también modifica la expresión de moléculas de activación (CD137) como consecuencia de la infección y/o por la sobre-expresión de PD-1.

Encontramos que los linfocitos T CD8+ de los ratones infectados con 1×10^4 parásitos disminuyen la expresión de CD137 en todos los casos: las células sin re-estimulación disminuyen la expresión 0.56 veces, mientras que las células re-estimuladas con 1, 5 ó 10 μg de LPG, disminuyeron la expresión de CD137 por 0.53, 0.62 y 0.58 veces, respectivamente (Figura 20). Todos los resultados fueron estadísticamente significativos.

Los resultados de los linfocitos T CD8+ de los ratones infectados con 1×10^5 parásitos fueron distintos, ya que las células no estimuladas disminuyeron la expresión de CD137 por 0.10 veces, mientras que las células estimuladas con 1 μg de LPG disminuyeron la expresión 0.22 veces. En contraste, los linfocitos estimulados con 5 y 10 μg LPG aumentaron la expresión de CD137 por 0.48 y 0.44 veces, respectivamente (Figura 20).

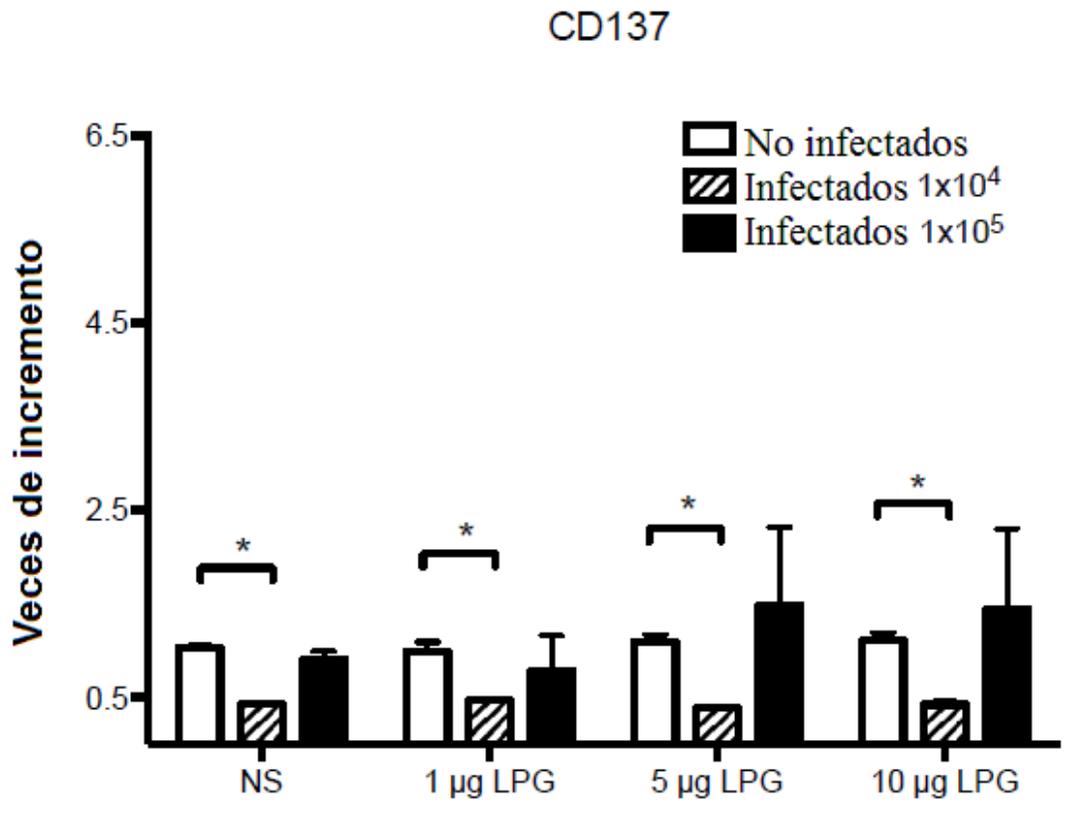


Figura 20) Expresión del receptor de activación CD137 en linfocitos T CD8+ de ratones BALB/c infectados en la dermis de la oreja con 1×10^4 ó 1×10^5 promastigotes de *L. mexicana*. Las células fueron re estimuladas con 1, 5 ó 10 µg de LPG. Datos normalizados tomando como referencia los valores de los ratones sanos. NS= no estimulados. n=3, *p < 0.05

6.5. Análisis del efecto de la vacunación con LPG y de la infección por *L. mexicana* sobre la expresión de PD-L2 en macrófagos de bazo de ratones BALB/c.

6.5.1. Expresión de PD-L2 en macrófagos provenientes de bazo de ratones vacunados con 10 y 100 µg LPG de *L. mexicana*.

Una vez que encontramos que la vacunación con LPG y la infección con *Leishmania* modulaba la expresión del receptor de inhibición PD-1, quisimos investigar si la vacunación y la infección también tenían un efecto sobre la expresión de PD-L2, un ligando de PD-1. Estudiamos PD-L2 ya que anteriormente encontramos que LPG inducía su sobre-expresión en macrófagos peritoneales estimulados *in vitro* mientras que no tenía efecto sobre PD-L1. Para lograr este objetivo, se obtuvieron células de bazos de los ratones vacunados con LPG que se coincubaron con 1, 5 ó 10 µg de LPG o sin estímulo. Como control se utilizaron células de ratones sanos de la misma cepa, edad y género. Los macrófagos de los ratones sanos que después fueron estimulados con LPG mostraron que el estímulo ejerció un efecto negativo sobre la expresión de PD-L2. Las células incubadas con 1 µg de LPG disminuyeron la expresión de PD-L2 en 0.01 veces, mientras que la estimulación con 5 y 10 µg redujo la expresión 0.09 y 0.12 veces, respectivamente (Figura 21).

Los macrófagos de los ratones vacunados con 10 µg de LPG mostraron que la expresión de PD-L2 aumento 0.23 veces en células que no fueron re-estimuladas. Sin embargo, las células re-estimuladas con 1, 5 ó 10 µg de LPG disminuyeron la expresión de PD-L2 por 0.42, 0.13 y 0.40 veces, respectivamente, comparados con el control

sano (Figura 21). La expresión de PD-L2 en los macrófagos de los ratones vacunados con 100 μg de LPG disminuyó 0.10 veces. Cuando fueron re-estimulados con 1 μg LPG se redujo la expresión 0.29 veces, sin embargo, la re-estimulación con 5 y 10 μg LPG aumentó la expresión de PD-L2 por 1.02 y 4.67 veces, respectivamente (Figura 21).

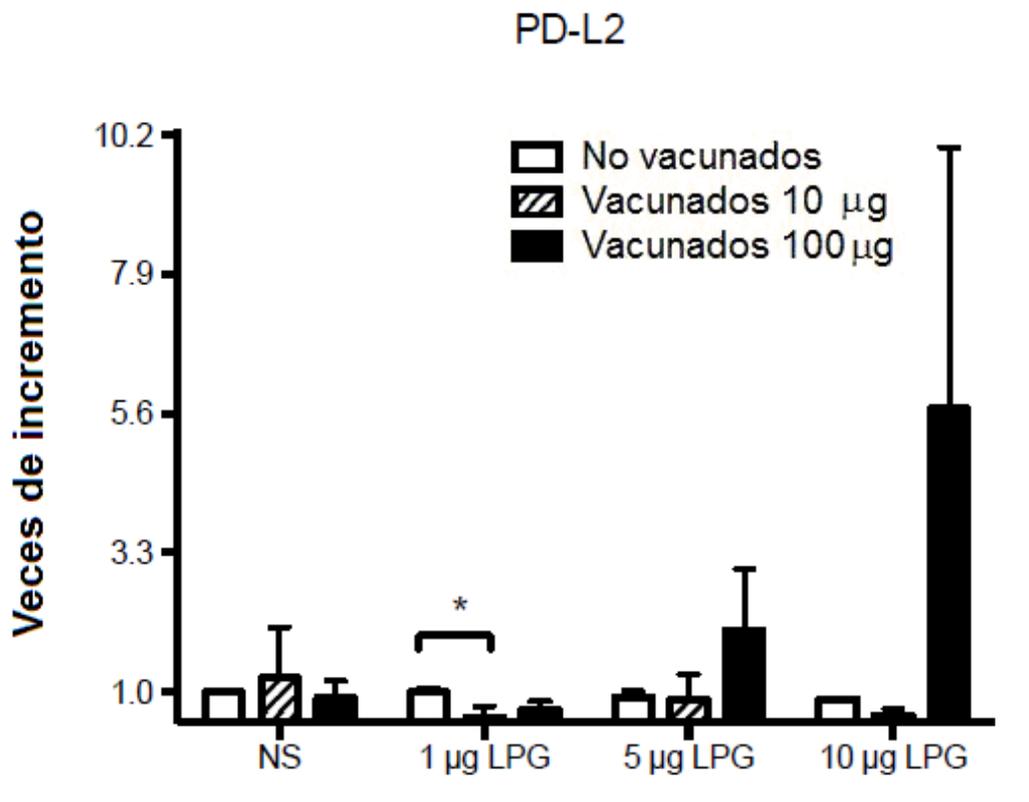


Figura 21) Expresión de PD-L2 en macrófagos de bazo de ratones BALB/c sanos o vacunados con 10 ó 100 μg de LPG de *L. mexicana*. Se obtuvieron esplenocitos totales y se incubaron con 1, 5 ó 10 μg de LPG durante 24 hrs; se marcaron con F4/80 y PD-L2 y se analizaron por citometría de flujo. Para los ratones vacunados con 10 μg , n=3, para los vacunados con 100 μg , n=2. Promedio y \pm desviación estándar. *p<0.05

6.5.2. Expresión de PD-L2 en macrófagos provenientes de bazo de ratones infectados con 1×10^4 o 1×10^5 promastigotes de *L. mexicana*.

Dado que la infección de macrófagos peritoneales *in vitro* con *Leishmania* modificó la expresión de PD-L2, nos interesó analizar si la infección *in vivo* tenía algún efecto en la expresión de este ligando.

Macrófagos peritoneales obtenidos de ratones infectados con 1×10^4 parásitos disminuyeron la expresión de PD-L2 en 0.31 veces. Cuando estas células fueron re-estimuladas con 1 μ g de LPG, redujeron la expresión de PD-L2 en 0.33 veces. Cuando fueron re-estimulados con 5 y 10 μ g de LPG redujeron significativamente la expresión de PD-L2 en 0.28 veces (Figura 22).

Los macrófagos de los ratones infectados con 1×10^5 parásitos también disminuyeron la expresión de PD-L2 por 0.26 veces, lo cual fue estadísticamente significativo en comparación con células de ratones sanos (Figura 23). Cuando los macrófagos de ratones infectados fueron re-estimulados con 1, 5 y 10 μ g de LPG, la reducción en la expresión de PD-L2 fue de 0.25, 0.10 y 0.14 veces, respectivamente, con respecto a los macrófagos obtenidos de controles sanos y estimulados en las mismas condiciones (Figura 22).

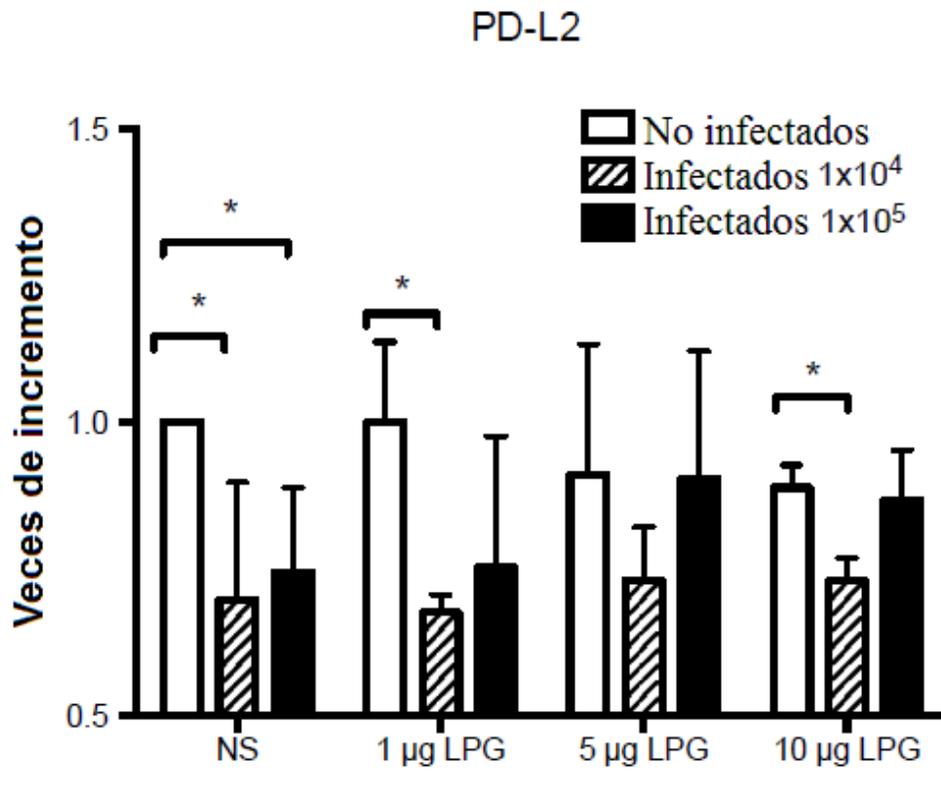


Figura 22) Expresión de PD-L2 en macrófagos de bazo de ratones BALB/c sanos o infectados en la dermis de la oreja con 1×10^4 ó 1×10^5 promastigotes de *L. mexicana*. Se obtuvieron esplenocitos totales y se incubaron con 1, 5 ó 10 µg de LPG durante 24 hrs; después se marcaron con F4/80 y PD-L2 y se analizaron por citometría de flujo. n=3. Promedio y \pm desviación estándar. *p<0.05

6.6. Análisis del efecto de la vacunación con LPG y de la infección por *L. mexicana* sobre la expresión de H-2 en macrófagos de bazo de ratones BALB/c.

6.6.1. Expresión de H-2 en macrófagos provenientes de bazo de ratones vacunados con 10 y 100 µg LPG de *L. mexicana*.

Para analizar si la vacunación con LPG también modulaba la expresión de moléculas MHC-I en macrófagos de ratones BALB/c, cuantificamos la expresión de la molécula H-2 en los macrófagos provenientes del bazo de ratones vacunados con LPG o infectados con *Leishmania* por citometría de flujo. Macrófagos esplénicos marcados con F4/80 y anti-H-2 de ratones vacunados con 10 µg LPG disminuyeron significativamente la expresión de H-2 (0.25 veces). En ratones vacunados con 100 µg de LPG, la disminución fue de 0.08 veces (Figura 23-A).

Los macrófagos de los ratones que fueron infectados también disminuyeron la expresión de H-2. En ratones infectados con 1×10^4 parásitos, la expresión disminuyó 0.11 veces, mientras que en los infectados con 1×10^5 parásitos disminuyó 0.20 veces, lo cual fue estadísticamente significativo (Figura 23-B).

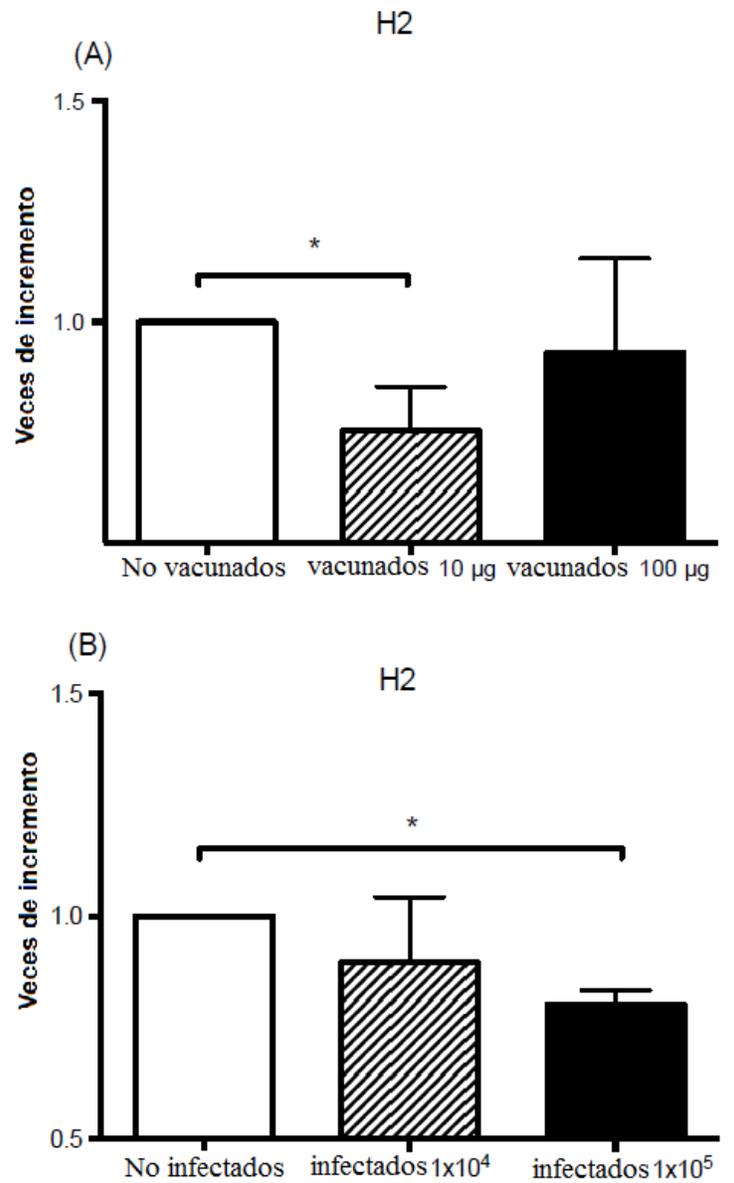


Figura 23) Expresión de H2 en macrófagos de bazo de ratones BALB/c vacunados con LPG o infectados en la dermis de la oreja con 1×10^4 ó 1×10^5 promastigotes de *L. mexicana*. Se obtuvieron esplenocitos totales provenientes de ratones vacunados con LPG (A) o infectados con *L. mexicana* (B), se marcaron con F4/80 y H-2 y se analizaron por citometría de flujo. n=3. Promedio y \pm desviación estándar. *p<0.05

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

La leishmaniasis es considerada por la OMS como una de las enfermedades olvidadas de los últimos años. Esta relacionada con la pobreza y la migración, dificultando el diagnóstico y el acceso a los servicios de salud (5;97). La investigación de la respuesta inmune contra *Leishmania* y los factores de virulencia que presenta, permite diseñar vacunas contra la leishmaniasis aunque hasta el momento sin éxito. Los modelos murinos son de gran importancia en el estudio de la leishmaniasis. Ratones de la cepa C57Bl/6 resuelven la infección por *Leishmania* y esta resistencia se correlaciona con la respuesta inmune celular tipo Th1 con predominio de linfocitos T CD4+ productores de citocinas proinflamatorias. En contraste, los ratones de la cepa BALB/c son incapaces de controlar la infección, la cual es progresiva y el perfil de citocinas es del tipo Th2, con predominio de IL-4 (56;98).

Una molécula utilizada para el diseño de vacunas en leishmaniasis es el LPG, la molécula más abundante en la superficie del parásito. Los resultados obtenidos han sido contradictorios, ya que la inmunización con LPG de *L. amazonensis* por vía intramuscular llevó a la progresión de la enfermedad debido a la producción de TGF- β y, en cambio, la inmunización por la vía intranasal generó una disminución en la carga parasitaria (41;42). La causa de estos resultados contradictorios queda por explorarse. Hasta la fecha, las vacunas contra *Leishmania* se enfocan principalmente en estudiar su efecto sobre el perfil de citocinas generados por linfocitos CD4+ (Th1/Th2), sin tomar en cuenta la dosis del antígeno, la cantidad de parásitos utilizados para el reto, así como el tejido utilizado en el modelo de infección (43;77;80;99-101).

En el presente estudio se analizó la eficacia de la inmunización por vía subcutánea con distintas dosis de LPG de *L. mexicana* así como su efecto sobre la inducción de moléculas activadoras o inhibitorias de linfocitos CD4+, CD8+ y macrófagos. Se encontró que en lugar de protección, la inmunización con LPG induce la progresión de la infección, con desarrollo de lesiones en tejidos distantes como en patas, nariz o la cola. Para entender la causa de esta progresión, aunado a que las características clínicas de los ratones inmunizados con LPG fueron muy similares a las observadas en pacientes con LCD, se analizaron las características de los linfocitos T y de macrófagos generados durante la inmunización con LPG así como con la infección por *L. mexicana*. La expresión de la expresión de PD-1 y CD137 se analizó en los linfocitos T CD4+ y CD8+, así como PD-L2 y PD-L1, ligandos para PD-1, en los macrófagos. El interés en estudiar PD-1, que es una molécula inductora de supresión y agotamiento celular, y CD137, que es una molécula que se expresa principalmente en linfocitos T activados induciendo su proliferación y activación, permitiría explorar la participación de los linfocitos en la progresión inducida por la inmunización con LPG (93;102). Por otro lado, el análisis de PD-L2 y PD-L1 en macrófagos arrojaría nueva luz sobre el papel de éstas células en el desenlace de la inmunización con LPG.

Los macrófagos juegan un papel central en la leishmaniasis ya que son las principales células hospedadoras de *Leishmania* que fagocitan y presentan antígenos del parásito a los linfocitos T CD4+ a través de moléculas MHC-II. Adicionalmente son las principales células efectoras para eliminar el parásito a través de mecanismos microbicidas como la generación de ROS y NO. La co-estimulación es importante para que se lleve a cabo la presentación de antígenos y activación de los linfocitos T. Entre

las moléculas co-estimuladoras que participan están CD80, CD86 y CD40. El parásito puede modular la expresión de estas moléculas co-estimuladoras así como las moléculas MHC-I y MHC-II (103;104), limitando las funciones del macrófago. Una de las moléculas del parásito que ha sido demostrada que puede regular las funciones efectoras del macrófago es el LPG de *L. mexicana*, que induce la producción de IL-10, inhibe la producción de IL-12, el estallido oxidativo y la apoptosis de la célula infectada (30;33;36;105;106). Sin embargo, se desconoce si LPG también tiene capacidad de modular otros ligandos en la superficie del macrófago, que cuando se unen a su receptor, provocan un estado de agotamiento. Entre ellos se encuentran PD-L1 y PD-L2 que se unen al receptor PD-1 en la superficie de los linfocitos T (84;107;108).

En este trabajo se encontró que el LPG también tiene la capacidad de modular la expresión de PD-L2 en macrófagos de ratones BALB/c. Interesantemente, esta modulación genera resultados distintos entre macrófagos peritoneales y macrófagos esplénicos. Mientras que en macrófagos peritoneales de ratones sanos, LPG induce la sobre-expresión de PD-L2 de manera dosis dependiente, en los macrófagos de bazo ejerce un efecto supresor, disminuyendo su expresión. Estas diferencias en la expresión de PD-L2 posiblemente se deben a que la mayoría de los macrófagos esplénicos expresan predominantemente PD-L1 y aún bajo el estímulo de lipopolisacárido (LPS), no incrementan su expresión de PD-L2 de manera significativa (109). Nuestros resultados coinciden con lo reportado para el LPS en que la expresión de PD-L2 en macrófagos esplénicos no es inducible por LPG del parásito. Llama la atención que este fenómeno de sobre-expresión de PD-L2 generado con la inmunización con LPG, no fue observado con la infección de macrófagos peritoneales

por *L. mexicana*. La sobre-expresión de PD-L2, sumado a la degradación del MHC-II reportada en células infectadas (103), arroja nueva luz sobre la posible causa de la progresión de la enfermedad posterior a la inmunización con LPG, ya que la sobre-expresión de PD-L2 en macrófagos puede llevar al agotamiento de linfocitos T por la unión PD-1:PD-L2, que facilita la progresión de la infección.

La activación de los linfocitos T CD4+ ha sido el blanco de la mayoría de las vacunas contra la leishmaniasis que intentan dirigir la respuesta inmune celular hacia el tipo CD4+ Th1 con producción de citocinas proinflamatorias como IFN- γ e IL-2 (100;101). Sin embargo, la participación de los linfocitos T CD8+ , que son requeridos para la protección contra la infección por *Leishmania*, ha sido poco estudiada en modelos de vacunas (77-81;99;100;110). Una de las dificultades en diseñar vacunas activadoras de linfocitos CD8+ es el agotamiento celular observado en estas células después de estimulaciones antigénicas crónicas. El agotamiento de los linfocitos T CD8+ con sobre-expresión de PD-1 y disminución de la molécula de activación CD137 ha sido reportado en diferentes enfermedades y se ha asociado a la disminución de las funciones efectoras de la célula (82;91;102;111;112). En leishmaniasis, también se han reportado alteraciones en el número y en la función de linfocitos T CD8+, sin embargo no se habían estudiado los mecanismos responsables de esta inmunomodulación. En los pacientes con LCD se había reportado que los linfocitos T CD8+ se encuentran disminuidos en número y en mecanismos efectores comparados con las células de los pacientes con LCL (85). En esos pacientes con LCD, que cursan con infecciones crónicas por *Leishmania mexicana*, se habían reportado los primeros indicios de una sobre-expresión de PD-1 en los linfocitos T CD8+, que pudiera ser la causa de la

inhibición de sus mecanismos efectoros. Estos linfocitos CD8+ pudieron ser rescatados de su agotamiento a través de la estimulación con LPG que redujo su expresión de PD-1 (81;86), probablemente a través del reconocimiento por TLR2, que se encuentra constitutivamente expresado en linfocitos T de memoria actuando como una molécula co-estimuladora (113).

En el presente trabajo se encontró que la inmunización con distintas dosis con LPG, así como la infección con distinto número de parásitos de *Leishmania*, modula de manera diferencial la expresión de moléculas de la activación (CD137) y la inhibición (PD-1) de los linfocitos TCD8+, CD4+ así como PD-L2 en macrófagos, cuyo efecto tiene un impacto en la eficacia de las vacunas.

Interesantemente, la modulación generada durante la vacunación con LPG fue principalmente sobre linfocitos CD8+ consistiendo en la reducción de CD137 y el aumento en PD-1, ambos de los cuales predisponen al agotamiento celular, donde el grado de la modulación fue dosis dependiente. El fenómeno también se observó durante la infección con 1×10^4 parásitos. Sin embargo, un dato llamativo fue que la infección con 1×10^5 parásitos aumentó la expresión de CD137 en los linfocitos T CD8+. Este aumento en teoría debería de llevar a la activación de linfocitos CD8+ durante la infección por *L. mexicana*. Sin embargo, esto no ocurre y la falta de activación de los linfocitos CD8+ posiblemente se deba al incremento concomitante de la expresión de PD-1. Con estos datos se podría sugerir que la infección por *L. mexicana* inhibe la función de los linfocitos T CD8+ principalmente debido al incremento en la expresión de PD-1, el cual es dosis dependiente, ya que aumenta con la carga parasitaria. Existen reportes que indican que la estimulación a través de CD137 es

capaz de rescatar a estos linfocitos del estado de agotamiento (114-118). Sin embargo, esto no siempre ocurre y posiblemente dependa de la magnitud en la expresión de PD-1 ya que cuando la expresión de PD-1 es alta, el estímulo activador de CD137 parece ser insuficiente para activar a las células (119). Aunado a esto, se ha observado que la co-estimulación únicamente puede rescatar del agotamiento a los linfocitos T CD4+ y no a los CD8+, lo que hace suponer que estos últimos son más sensibles a la unión PD-1:PD-L (112). Probablemente este también sea el fenómeno observado en nuestro modelo de vacunación con LPG, donde el PD-1 incrementó entre 2 a 4 veces de manera dosis dependiente únicamente en linfocitos T CD8+. En contraste, en linfocitos T CD4+ el incremento en PD-1 fue menor, lo cual posiblemente indica que estas células no se encuentran en el mismo grado de inhibición que los linfocitos T CD8+. A pesar de esto, la respuesta de las células T CD4+ no fue suficiente para llevar a la curación o control de la infección. Esto posiblemente se deba a que los linfocitos T CD4+ necesitan de la presencia y activación de los linfocitos T CD8+ para producir IFN- γ (79).

Los resultados del presente trabajo enriquecen y complementan la literatura sobre la modulación de linfocitos CD8+ durante vacunación con LPG, ya que en estudios de vacunación con LPG de *L. amazonensis* que llevaron a la progresión de la infección (41;42), el fenómeno se atribuyó a la apoptosis de linfocitos CD8+ inducida por antígenos totales de *L. amazonensis*. Por otro lado, Joshi *et al.* demostraron que el bloqueo de PD-L1 permitió la sobrevivencia de los linfocitos T CD8+ en un modelo de leishmaniasis visceral inducido por *L. donovani* con altas cargas parasitarias (20×10^6 parásitos), aunque este bloqueo no restauró las funciones efectoras de los linfocitos T CD8+, tanto citotóxicas como de producción de IFN- γ (41;42;83).

En el presente trabajo se reporta por primera vez que la inmunización con LPG de *L. mexicana* a altas concentraciones, así como la infección por *L. mexicana* con diferente carga parasitaria induce la expresión de PD-1 de manera dosis dependiente principalmente para los linfocitos T CD8+, lo que disminuye sus capacidades efectoras y tiene como consecuencia el progreso de la infección. Con estos datos se propone que en el diseño de nuevas vacunas contra la leishmaniasis se incluyan nuevas estrategias que comprendan el bloqueo de las moléculas de inhibición y permitan la inducción y estimulación de moléculas co-estimuladoras activadoras en linfocitos CD8+. Ambos fenómenos serán necesarios para una posible vacuna preventiva y/o terapéutica que reprogramme a los linfocitos T CD8+ del estado de agotamiento y activarlos para controlar la parasitosis causada por *Leishmania*.

Estos resultados abren una nueva perspectiva para el desarrollo de vacunas diseñadas para la activación de linfocitos CD8+, ya que se demuestra la importancia de pre-evaluar la dosis de antígeno para evitar inducir moléculas inhibitorias como PD-1 en linfocitos CD8+. Adicionalmente, para valorar la efectividad de la vacuna, es crucial tomar en cuenta la cantidad de parásitos utilizados para el reto de la infección así como el sitio de inmunización.

Este trabajo también reveló una novedosa estrategia del parásito para evadir la respuesta inmune, suprimiendo la respuesta de los linfocitos T CD8+ a través del incremento en la expresión de PD-1, así como de PD-L2 en los macrófagos que son las principales células hospedadoras del parásito y presentadoras de antígenos a los linfocitos T para su activación.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra la regulación diferencial que ejercen distintas dosis de vacunación con LPG e infección con *L. mexicana* sobre la respuesta inmune de ratones BALB/c.

Se concluye que el LPG inhibe a los linfocitos T CD8+ mediante la sobreexpresión de la molécula inhibidora PD-1 en conjunto con la disminución en la expresión de la molécula activadora CD137, que es dosis dependiente.

Este estudio también demostró que aunado a los linfocitos CD8+ también los macrófagos peritoneales sufren regulación en la expresión de PD-L2. La combinación de ambos fenómenos se refleja en la exacerbación de la infección que se observó en los ratones inmunizados e infectados con dosis altas de LPG.

Aunado a la inmunización con dosis altas de LPG, también la infección por *L. mexicana* inhibe a los linfocitos T CD8+ de manera dosis dependiente, mediante el incremento en la expresión de PD-1. La inhibición observada sobre linfocitos CD8+ fue significativamente mayor que lo observado en los linfocitos CD4+.

Finalmente este trabajo permitió demostrar novedosos mecanismos de evasión de *Leishmania* sobre linfocitos CD8+, induciendo el agotamiento en una de las células inmunes con capacidad de controlar la progresión de la enfermedad.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS

9. REFERENCIAS

- (1) Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999 October 2;354(9185):1191-9.
- (2) Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 2007 August;37(10):1097-106.
- (3) WHO. LEISHMANIASIS. WHO 2014; Available from: URL: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/index.html
- (4) Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012;7(5):e35671.
- (5) Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006 December; 22(12):552-7.
- (6) Roberts LJ, Handman E, Foote SJ. Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *BMJ* 2000 September 30; 321(7264):801-4.
- (7) McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM* 2014 January; 107(1):7-14.
- (8) Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol* 2010 October; 35(7):699-705.
- (9) Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Salaiza SN, Perez-Montfort R, Becker I. PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Res* 2009 February; 104(3):691-9.
- (10) Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010 April; 8(4):419-33.

- (11) Ashutosh, Sundar S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol* 2007 February; 56(Pt 2):143-53.
- (12) Papadopoulou B, Kundig C, Singh A, Ouellette M. Drug resistance in *Leishmania*: similarities and differences to other organisms. *Drug Resist Updat* 1998; 1(4):266-78.
- (13) Singh N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res* 2006 March;123(3):411-22.
- (14) WHO Technical Report Series 949. 2010 Mar 26.
- (15) Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Nicholls RS, Padilla J, Engel J et al. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clin Infect Dis* 2001 October 1;33(7):E57-E61.
- (16) Vannier-Santos MA, Urbina JA, Martiny A, Neves A, de SW. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. *J Eukaryot Microbiol* 1995 July;42(4):337-46.
- (17) Handman E. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol* 1999;44:1-39.
- (18) Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *leishmania*. *Exp Mol Pathol* 2002 April;72(2):132-41.
- (19) Vannier-Santos MA, Martiny A, de SW. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des* 2002;8(4):297-318.
- (20) Sacks DL, da Silva RP. The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. *J Immunol* 1987 November 1;139(9):3099-106.

- (21) da SR, Sacks DL. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun* 1987 November;55(11):2802-6.
- (22) Russell DG, Wright SD. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. *J Exp Med* 1988 July 1;168(1):279-92.
- (23) Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007 November;5(11):873-82.
- (24) Wilkins-Rodriguez AA, Escalona-Montano AR, guirre-Garcia M, Becker I, Gutierrez-Kobeh L. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Exp Parasitol* 2010 November;126(3):426-34.
- (25) Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 2008 August 15;321(5891):970-4.
- (26) Basu MK, Ray M. Macrophage and *Leishmania*: an unacceptable coexistence. *Crit Rev Microbiol* 2005;31(3):145-54.
- (27) Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ et al. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 January 4;97(1):406-11.
- (28) Moody SF, Handman E, McConville MJ, Bacic A. The structure of *Leishmania* major amastigote lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 1993 September 5;268(25):18457-66.

- (29) Guha-Niyogi A, Sullivan DR, Turco SJ. Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology* 2001 April;11(4):45R-59R.
- (30) Lodge R, Descoteaux A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol* 2005 March;114(3):256-65.
- (31) de Assis RR, Ibraim IC, Nogueira PM, Soares RP, Turco SJ. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochim Biophys Acta* 2012 September;1820(9):1354-65.
- (32) Ilg T, Etges R, Overath P, McConville MJ, Thomas-Oates J, Thomas J et al. Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 1992 April 5;267(10):6834-40.
- (33) Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 August 5;100(16):9536-41.
- (34) Turco SJ, Spath GF, Beverley SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol* 2001 May;17(5):223-6.
- (35) Ilg T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *EMBO J* 2000 May 2;19(9):1953-62.
- (36) Delgado-Dominguez J, Gonzalez-Aguilar H, Guirre-Garcia M, Gutierrez-Kobeh L, Berzunza-Cruz M, Ruiz-Remigio A et al. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasite Immunol* 2010 June;32(6):440-9.

- (37) Rojas-Bernabe A, Garcia-Hernandez O, Maldonado-Bernal C, egado-Dominguez J, Ortega E, Gutierrez-Kobeh L et al. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. *Parasitology* 2014 February 5;1-13.
- (38) Kavooosi G, Ardestani SK, Kariminia A, Tavakoli Z. Production of nitric oxide by murine macrophages induced by lipophosphoglycan of *Leishmania major*. *Korean J Parasitol* 2006 March;44(1):35-41.
- (39) Descoteaux A, Turco SJ. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect* 2002 July;4(9):975-81.
- (40) Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003 August 31;130(2):65-74.
- (41) Pinheiro RO, Pinto EF, de Matos Guedes HL, Filho OA, de Mattos KA, Saraiva EM et al. Protection against cutaneous leishmaniasis by intranasal vaccination with lipophosphoglycan. *Vaccine* 2007 March 30;25(14):2716-22.
- (42) Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JR, Guedes HL, Fentanes RF, Rossi-Bergmann B. TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes Infect* 2005 October;7(13):1317-23.
- (43) Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 1998 November 16;188(10):1941-53.

- (44) Zer R, Yaroslavski I, Rosen L, Warburg A. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int J Parasitol* 2001 June;31(8):810-4.
- (45) Castro-Sousa F, Paranhos-Silva M, Sherlock I, Paixao MS, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WL. Dissociation between vasodilation and *Leishmania* infection-enhancing effects of sand fly saliva and maxadilan. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001 October;96(7):997-9.
- (46) Lima HC, Titus RG. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun* 1996 December;64(12):5442-5.
- (47) Mbow ML, Bleyenbergh JA, Hall LR, Titus RG. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 1998 November 15;161(10):5571-7.
- (48) Menezes MJ, Costa DJ, Clarencio J, Miranda JC, Barral A, Barral-Netto M et al. Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. *BMC Immunol* 2008;9:12.
- (49) Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J Exp Med* 1991 January 1;173(1):49-54.
- (50) Theodos CM, Ribeiro JM, Titus RG. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect Immun* 1991 May;59(5):1592-8.
- (51) Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002 November;2(11):845-58.

- (52) Brandonisio O, Panaro MA, Sisto M, Acquafredda A, Fumarola L, Leogrande D. Interactions between *Leishmania* parasites and host cells. *Parassitologia* 2000 December;42(3-4):183-90.
- (53) Brandonisio O, Panaro MA, Sisto M, Acquafredda A, Fumarola L, Leogrande D et al. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. *Parassitologia* 2001 December;43 Suppl 1:1-6.
- (54) Burchmore RJ, Barrett MP. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol* 2001 October;31(12):1311-20.
- (55) Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 2004 June;119(6):238-58.
- (56) Campos-Neto A. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? *Braz J Med Biol Res* 2005 July;38(7):979-84.
- (57) Foote SJ, Handman E. Genetics of murine leishmaniasis. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2005 November;4(3):270-6.
- (58) Ehrchen JM, Roebrock K, Foell D, Nippe N, von SE, Weiss JM et al. Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog* 2010 April;6(4):e1000871.
- (59) Tasew G, Nylen S, Lieke T, Lemu B, Meless H, Ruffin N et al. Systemic FasL and TRAIL neutralisation reduce leishmaniasis induced skin ulceration. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(10):e844.
- (60) de Souza Carmo EV, Katz S, Barbieri CL. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *PLoS One* 2010;5(11):e13815.

- (61) Eidsmo L, Fluor C, Rethi B, Eriksson YS, Ruffin N, De MA et al. FasL and TRAIL induce epidermal apoptosis and skin ulceration upon exposure to *Leishmania major*. *Am J Pathol* 2007 January;170(1):227-39.
- (62) Mosser DM, Edelson PJ. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J Immunol* 1984 March;132(3):1501-5.
- (63) Mosser DM, Burke SK, Coutavas EE, Wedgwood JF, Edelson PJ. *Leishmania* species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *Exp Parasitol* 1986 December;62(3):394-404.
- (64) Laurenti MD, Orn A, Sinhorini IL, Corbett CE. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. *Braz J Med Biol Res* 2004 March;37(3):427-34.
- (65) Russell DG. The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Eur J Biochem* 1987 April 1;164(1):213-21.
- (66) Russell DG, Wilhelm H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophage. *J Immunol* 1986 April 1;136(7):2613-20.
- (67) Frommel TO, Button LL, Fujikura Y, McMaster WR. The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1990 January 1;38(1):25-32.
- (68) Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol* 2009 December 15;183(12):8088-98.

- (69) Chen L, Zhang ZH, Watanabe T, Yamashita T, Kobayakawa T, Kaneko A et al. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol Int* 2005 June;54(2):109-18.
- (70) Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol* 2002;28(3):187-248.
- (71) Brandonisio O, Spinelli R, Pepe M. Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes Infect* 2004 December;6(15):1402-9.
- (72) Singh RK, Srivastava A, Singh N. Toll-like receptor signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis. *Microbiol Res* 2012 September 6;167(8):445-51.
- (73) Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, Almusawi T, Duarte MI, Amato N, V. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun* 2008 March;76(3):866-72.
- (74) Martinez-Salazar B, Berzunza-Cruz M, Becker I. [*Leishmania mexicana* DNA activates murine macrophages and increases their TLR9 expression]. *Gac Med Mex* 2008 March;144(2):99-104.
- (75) bou Fakher FH, Rachinel N, Klimczak M, Louis J, Doyen N. TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. *J Immunol* 2009 February 1;182(3):1386-96.
- (76) van der Merwe PA, Dushek O. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat Rev Immunol* 2011 January;11(1):47-55.
- (77) Belkaid Y, von SE, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S et al. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 2002 April 15;168(8):3992-4000.

- (78) Basu R, Bhaumik S, Haldar AK, Naskar K, De T, Dana SK et al. Hybrid cell vaccination resolves *Leishmania donovani* infection by eliciting a strong CD8+ cytotoxic T-lymphocyte response with concomitant suppression of interleukin-10 (IL-10) but not IL-4 or IL-13. *Infect Immun* 2007 December;75(12):5956-66.
- (79) Herath S, Kropf P, Muller I. Cross-talk between CD8+ (+) and CD4+(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8+ (+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4+(+) T cells. *Parasite Immunol* 2003 November;25(11-12):559-67.
- (80) Uzonna JE, Joyce KL, Scott P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med* 2004 June 7;199(11):1559-66.
- (81) Hernandez-Ruiz J, Becker I. [CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis]. *Salud Publica Mex* 2006 September;48(5):430-9.
- (82) Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000 October 2;192(7):1027-34.
- (83) Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, Stager S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8+ (+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog* 2009 May;5(5):e1000431.
- (84) Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001 March;2(3):261-8.
- (85) Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, Moll H, Gillitzer R, Perez-Torres A et al. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by

Leishmania mexicana modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Int Health* 1999 December;4(12):801-11.

- (86) Hernandez-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y et al. CD8+ cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(11):e871.
- (87) Kulpa DA, Lawani M, Cooper A, Peretz Y, Ahlers J, Sekaly RP. PD-1 coinhibitory signals: the link between pathogenesis and protection. *Semin Immunol* 2013 October 31;25(3):219-27.
- (88) Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, Taube JM, Westra WH, Akpeng B et al. Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2013 March 15;73(6):1733-41.
- (89) Shin H, Wherry EJ. CD8+ T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol* 2007 August;19(4):408-15.
- (90) Tsushima F, Yao S, Shin T, Flies A, Flies S, Xu H et al. Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy. *Blood* 2007 July 1;110(1):180-5.
- (91) Blattman JN, Wherry EJ, Ha SJ, van der Most RG, Ahmed R. Impact of epitope escape on PD-1 expression and CD8+ T-cell exhaustion during chronic infection. *J Virol* 2009 May;83(9):4386-94.
- (92) Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, Weiss T, Froh M, Blank C et al. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol* 2006 October;45(4):520-8.

- (93) Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 2007 July;19(7):813-24.
- (94) Terawaki S, Tanaka Y, Nagakura T, Hayashi T, Shibayama S, Muroi K et al. Specific and high-affinity binding of tetramerized PD-L1 extracellular domain to PD-1-expressing cells: possible application to enhance T cell function. *Int Immunol* 2007 July;19(7):881-90.
- (95) Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012 April;24(2):207-12.
- (96) Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG, Wollner I, Taube JM, Anders RA et al. Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res* 2013 January 15;19(2):462-8.
- (97) WHO. LEISHMANIASIS. WHO 2014;Available from: URL: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/index.html
- (98) Boom WH, Liebster L, Abbas AK, Titus RG. Patterns of cytokine secretion in murine leishmaniasis: correlation with disease progression or resolution. *Infect Immun* 1990 December;58(12):3863-70.
- (99) Rhee EG, Mendez S, Shah JA, Wu CY, Kirman JR, Turon TN et al. 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. *J Exp Med* 2002 June 17;195(12):1565-73.
- (100) Scott P, Artis D, Uzonna J, Zaph C. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunol Rev* 2004 October;201:318-38.

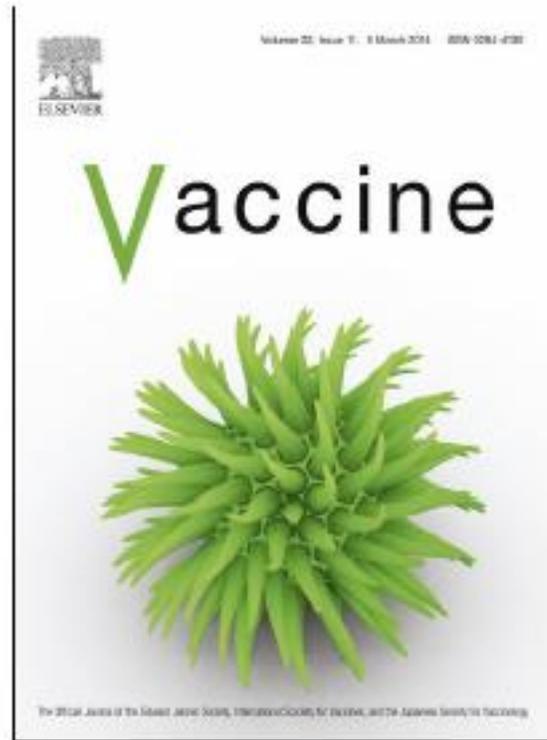
- (101) Kedzierski L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J Glob Infect Dis* 2010 May;2(2):177-85.
- (102) Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007 July;27(1):111-22.
- (103) De Souza LS, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci* 1995 October;108 (Pt 10):3219-31.
- (104) Antoine JC, Lang T, Prina E, Courret N, Hellio R. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. *J Cell Sci* 1999 August;112 (Pt 15):2559-70.
- (105) Piedrafita D, Proudfoot L, Nikolaev AV, Xu D, Sands W, Feng GJ et al. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans. *Eur J Immunol* 1999 January;29(1):235-44.
- (106) Villasenor-Cardoso MI, Salaiza N, Delgado J, Gutierrez-Kobeh L, Perez-Torres A, Becker I. Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host. *Parasite Immunol* 2008 August;30(8):425-34.
- (107) Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol* 2007 June;19(3):309-14.
- (108) Theodos CM, Povinelli L, Molina R, Sherry B, Titus RG. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. *Infect Immun* 1991 August;59(8):2839-42.

- (109) Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, Okazaki T, Freeman GJ, Minato N et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett* 2002 October 21;84(1):57-62.
- (110) Mendez S, Tabbara K, Belkaid Y, Bertholet S, Verthelyi D, Klinman D et al. Coinjection with CpG-containing immunostimulatory oligodeoxynucleotides reduces the pathogenicity of a live vaccine against cutaneous Leishmaniasis but maintains its potency and durability. *Infect Immun* 2003 September;71(9):5121-9.
- (111) Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999 December;5(12):1365-9.
- (112) Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4+(+) and CD8+ (+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 2002 March;32(3):634-43.
- (113) Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 March 2;101(9):3029-34.
- (114) Shao Z, Schwarz H. CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. *J Leukoc Biol* 2011 January;89(1):21-9.
- (115) Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 2005;23:23-68.
- (116) Wolfl M, Kuball J, Eyrich M, Schlegel PG, Greenberg PD. Use of CD137 to study the full repertoire of CD8+ T cells without the need to know epitope specificities. *Cytometry A* 2008 November;73(11):1043-9.

- (117) Habib-Agahi M, Phan TT, Searle PF. Co-stimulation with 4-1BB ligand allows extended T-cell proliferation, synergizes with CD8+ 0/CD8+ 6 and can reactivate anergic T cells. *Int Immunol* 2007 December;19(12):1383-94.
- (118) Robertson SJ, Messer RJ, Carmody AB, Mittler RS, Burlak C, Hasenkrug KJ. CD137 costimulation of CD8+ T cells confers resistance to suppression by virus-induced regulatory T cells. *J Immunol* 2008 April 15;180(8):5267-74.
- (119) Robertson SJ, Messer RJ, Carmody AB, Mittler RS, Burlak C, Hasenkrug KJ. CD137 costimulation of CD8+ T cells confers resistance to suppression by virus-induced regulatory T cells. *J Immunol* 2008 April 15;180(8):5267-74.

ANEXO I
ARTÍCULO
PUBLICADO

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

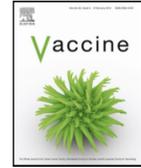


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Vaccination with *Leishmania mexicana* LPG induces PD-1 in CD8⁺ and PD-L2 in macrophages thereby suppressing the immune response: A model to assess vaccine efficacy[☆]



M.B. Martínez Salazar^a, J. Delgado Domínguez^a, J. Silva Estrada^a, C. González Bonilla^b, I. Becker^{a,*}

^a Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Colonia Doctores, 06726, Mexico D.F., Mexico

^b Laboratorios de Vigilancia e Investigación Epidemiológica, Coordinación de Vigilancia Epidemiológica, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 June 2013
Received in revised form
20 December 2013
Accepted 10 January 2014
Available online 23 January 2014

Keywords:

CD8 T cells
PD-1 expression
Leishmania mexicana LPG
PD-L2 expression

ABSTRACT

Leishmania lipophosphoglycan (LPG) is a molecule that has been used as a vaccine candidate, with contradictory results. Since unsuccessful protection could be related to suppressed T cell responses, we analyzed the expression of inhibitory receptor PD-1 in CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes and its ligand PD-L2 in macrophages of BALB/c mice immunized with various doses of *Leishmania mexicana* LPG and re-stimulated *in vitro* with different concentrations of LPG. Vaccination with LPG enhanced the expression of PD-1 in CD8⁺ cells. Activation molecules CD137 were reduced in CD8⁺ cells from vaccinated mice. *In vitro* re-stimulation enhanced PD-L2 expression in macrophages of healthy mice in a dose-dependent fashion. The expression of PD-1, PD-L2 and CD137 is modulated according to the amount of LPG used during immunization and *in vitro* re-stimulation. We analyzed the expression of these molecules in mice infected with 1×10^4 or 1×10^5 *L. mexicana* promastigotes and re-stimulated *in vitro* with LPG. Infection with 1×10^5 parasites increased the PD-1 expression in CD8⁺ and diminished PD-L2 in macrophages. When these CD8⁺ cells were re-stimulated *in vitro* with LPG, simulating a second exposure to parasite antigens, PD-1 expression increased significantly more, in a dose dependent fashion. We conclude that CD8⁺ T lymphocytes and macrophages express inhibition molecules according to the concentrations of *Leishmania* LPG and to the parasite load. Vaccination with increased amounts of LPG or infections with higher parasite numbers induces enhanced expression of PD-1 and functional inactivation of CD8⁺ cells, which can have critical consequences in leishmaniasis, since these cells are crucial for disease control. These results call for pre-vaccination evaluations of potential immunogens, specifically where CD8 cells are required, since inhibiting molecules can be induced after certain thresholds of antigen concentrations. We propose that the analysis of PD-1 and PD-L2 are useful tools to monitor the optimal dose for vaccination candidates.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmania lipophosphoglycan (LPG), one of the principal molecules of the parasite, modulates the immune response. LPG is a ligand for TLR2 in NK cells regulating their IFN- γ and TNF- α production [1]. In mast cells and macrophages LPG modulates

TLR2 and protein kinase- α (PKC- α), respectively [2,3]. CD4⁺ lymphocytes define *Leishmania* infections, where a Th-1 aids parasite control and Th-2 response favors disease progression in mouse models [4]. A major role in the defense against *Leishmania* is played by CD8⁺ cells, both by IFN- γ production and cytotoxicity [5–7]. Activation of CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes is regulated by PD-1, an inhibition receptor whose two ligands are PD-L1 (B7-H1) and PD-L2 (B7-DC) [8,9]. The recognition of PD-1 by either ligand leads to a functional exhaustion of CD8⁺ lymphocytes, characterized by reduced proliferation, the absence of cytokine production and a failure to exert cytotoxicity [10,11]. Yet some evidence also suggests that these molecules modulate CD8⁺ cells during *Leishmania mexicana* infections. A reduction of CD8⁺ lymphocytes has been observed in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL),

[☆] This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56232674; fax: +52 55 57610249.
E-mail address: becker@unam.mx (I. Becker).

infected with *L. mexicana*. These cells showed enhanced expression of PD-1 and were hampered in their effectors mechanisms, being non-responsive in their cytokine production and showing limited cytotoxicity, when confronted with autologous *Leishmania*-infected macrophages [12,13]. In a model of experimental chronic visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*, CD8⁺ cells were found to show phenotypic markers of functional exhaustion [14]. PD-L2 is a ligand for PD-1 displayed on dendritic cells and macrophages, both of which are host cells for *Leishmania* [9]. For protection against *Leishmania* infections, a fine-tuned regulation leading to CD8⁺ cell activation is crucial, which includes the induction of co-stimulatory signals and activation molecules such as CD137, favoring cell survival, and the inhibition of PD-1 to avoid cellular anergy.

LPG has been widely used as a vaccine candidate against leishmaniasis, with contradicting results. Thus, subcutaneous immunization with LPG has failed to protect BALB/c mice against *Leishmania amazonensis* infections, exacerbating the disease by enhanced TGF- β and IL-10 production [15]. The administration of anti-LPG antibodies or the intranasal administration of LPG was shown to revert this effect [16].

One of the main pitfalls during vaccination schemes that end unsuccessfully is the use of given antigen concentrations, without previous analysis as to whether this immunogen induces inhibitory or activation molecules. Furthermore, the diverse protection models vary widely in parasite numbers used during the infection challenge, which also accounts for possible contradicting results. To gain insight into the unpredictable outcomes of the different LPG vaccination models, we analyzed if different *L. mexicana* LPG concentrations showed diverse modulation of the inhibitory PD-1 molecule expression in T lymphocytes and PD-L2 expression in macrophages. Additionally we analyzed the influence of the parasite load on the expression of these molecules.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male BALB/c mice aged to 6–8 weeks were bred and housed at the animal facilities of the Departamento de Medicina Experimental of the Medical Faculty, UNAM, following the National Ethical Guidelines for Animal Health NOM-062-ZOO-1999 and the guidelines recommended for animal care by the Ethical Committee of the Medical School of the UNAM.

2.2. *Leishmania mexicana* culture

L. mexicana parasites were grown in RPMI-1640 medium (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, USA), supplemented with 10% heat-inactivated FBS at 28 °C. Metacyclic promastigotes were harvested at late log phase (5 day culture).

2.3. Lipophosphoglycan purification

Lipophosphoglycan was purified from *L. mexicana* as previously described [1].

2.4. Vaccination and infection

For vaccination assays, LPG was suspended in sterile PBS at a final concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Mice received three subcutaneous injections (insulin syringe, needle 31 G BD) in the dorsum containing 10 or 100 μg of LPG or 100 μL PBS as control, at a 15 day interval. The protection assay was carried out 20 days after the last vaccination. Mice were infected subcutaneously (insulin syringe, needle

31 G BD) with 1×10^5 *L. mexicana* promastigotes in the ear dermis. The lesion was measured weekly with a Vernier. For infection analysis, non-vaccinated mice were infected with 1×10^4 or 1×10^5 promastigotes and sacrificed prior to ulceration of the lesions.

2.5. Peritoneal cells

Mice were sacrificed by cervical dislocation. The peritoneal cavity was infused with 10 mL of cold sterile PBS pH 7.4 and lightly massaged. The peritoneal fluid was collected and centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4 °C. The cells were cultured 2 h in RPMI 1640 (supplemented with 100 U/mL penicillin and 100 IU/mL streptomycin) containing 10% (v/v) heat-inactivated FBS (RPMI-FBS) at 37 °C with 5% CO₂. Macrophages ($1 \times 10^6/\text{mL}$) were maintained in 24-well cell culture plates (Corning). Different LPG concentrations (1, 5 or 10 μg) were added, and a negative control contained only culture medium. After 24 h the cells were harvested and analyzed by flow cytometry.

2.6. Splenocyte purification

The spleen was aseptically removed and placed in a Petri dish containing cold PBS. The tissue was disrupted in a 100 μm nylon cell strainer (BD Falcon) and the isolated cells were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4 °C. Cells were separated by Ficoll-Hypaque gradient (Sigma) and mononuclear cells were washed twice with PBS and placed in 6-well plates (Corning) at 5×10^6 cells per well and stimulated with 1, 5 or 10 μg *L. mexicana* LPG during 24 h.

2.7. Flow cytometry

The extracellular expression of PD-1, CD137, PD-L2 and PD-L1 was analyzed in stimulated or non-stimulated peritoneal macrophages and mononuclear cells (1×10^6 cells/mL) were suspended in 100 μL FACS buffer (BD Biosciences cat. 342003) containing CD16/32 antibodies for 10 min on ice. After washing, cells were stained in 50 μL FACS buffer containing fluorochrome-labeled antibodies specific for CD3e (BD Pharmingen cat. 553066), CD8a (BD Pharmingen, cat. 551162), CD4 (BD Pharmingen, cat. 552775), CD137 (BD Pharmingen cat. 558976), F4/80 (Biolegend, cat. 122615), PD-1 (Biolegend, cat. 135205), PD-L1 (Biolegend, cat. 124311), PD-L2 (Biolegend, cat. 107205) or appropriate isotype controls, for 20 min on ice. Cells were then washed twice, fixed in 2% paraformaldehyde and analyzed using a FACSCanto II flow cytometer equipped with DIVA software (BD Biosciences, USA).

2.8. Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SD (standard deviation of the mean). Comparisons between experimental groups were performed using Mann-Whitney *U*-test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant, using Prism 5 for Mac OS X[®]. Three or more independent experiments were analyzed for three mice per group.

3. Results

3.1. Vaccination with LPG induces exacerbation and progression of *L. mexicana* infection

Our group previously demonstrated that LPG exerts an immunomodulatory effect on different cells of the immune response [1–3]. We were therefore interested in analyzing whether this molecule could confer protection against *L. mexicana* infections. BALB/c mice were vaccinated with 10 μg *L. mexicana* LPG.

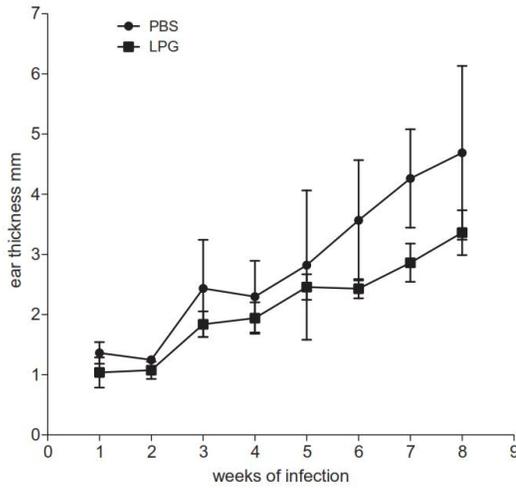


Fig. 1. LPG vaccination does not protect mice from *L. mexicana* infection. Male BALB/c were vaccinated at day 0, 15 and 30 with 10 μ g LPG (■) or inoculated with PBS (●) and challenged in ear dermis at day 50 with 1×10^5 *L. mexicana* promastigotes. The infection was followed for 8 weeks and ear lesion was measured weekly. ($n=4$).

Twenty days after the third immunization, mice were challenged in ear dermis with 1×10^5 *L. mexicana* promastigotes and the infection was followed throughout 8 weeks. Once the inflammation was detectable, the lesion was measured weekly with a Vernier. Control mice were injected with 10 μ L PBS. The ear dermal lesions appeared first in non-vaccinated mice around the third week. Lesions of mice vaccinated with LPG appeared around the fourth week. Throughout the course of the infections, both groups of mice showed similar inflammatory lesions (Fig. 1). After 6 weeks, only the vaccinated mice began to show dissemination of the parasite, forming nodules in the contralateral earlobe, paws and nose, simulating diffuse cutaneous leishmaniasis found in humans (data not shown). Once the disease disseminated in vaccinated mice, the inflammatory lesions in their earlobes tended to evolve slower after 6–7 weeks of infection, as compared to non-vaccinated mice (Fig. 1). It remains to be analyzed whether dissemination increases overall *Leishmania* numbers that possibly induce inhibitory molecules on inflammatory cells, thereby diminishing the inflammation yet not the disease progression. These data show that vaccination with LPG induces a more rapid dissemination of the parasites.

3.2. Macrophages infected *in vitro* with *L. mexicana* and stimulated with LPG over-express PD-L2 but show no changes in PD-L1 expression

We studied the modulation exerted by *in vitro* stimulation of macrophages from healthy mice with LPG (1, 5 or 10 μ g) and analyzed the ligands of regulatory molecules of T cells in macrophages. Stimulation with 1 μ g LPG led to an increased PD-L2 expression, yet when the challenge was augmented to 5 μ g, the PD-L2 expression significantly increased (3-fold) whereas stimulation with 10 μ g only slightly enhanced the expression (2-fold), which was not different from non-stimulated controls (Fig. 2A). These results suggest that LPG is capable of regulating the interaction between T lymphocytes and macrophages by inducing PD-L2 in a dose-dependent fashion.

Furthermore we analyzed whether *in vitro* infection of macrophages could regulate the expression of these inhibitory

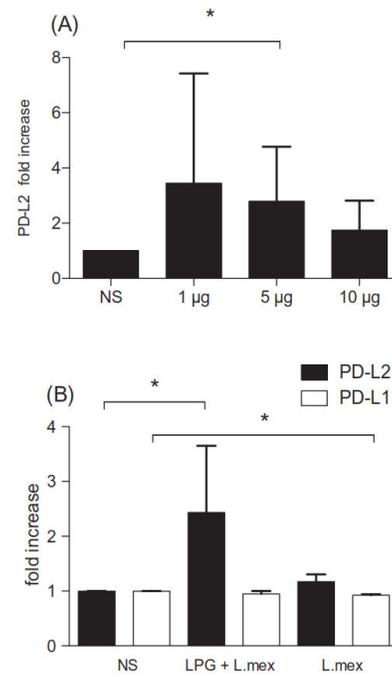


Fig. 2. LPG modulates the PD-L2 expression in peritoneal macrophages from healthy BALB/c. (A) Macrophages from peritoneal cavity were isolated and stimulated *in vitro* with different concentrations of LPG (1, 5 or 10 μ g) during 24 h and stained with anti-PD-L2 mAb ($n=3$). (B) Peritoneal macrophages were isolated and infected *in vitro* with *Leishmania mexicana* promastigotes at a 1:10 ratio (cells:parasites) or with parasites combined with 5 μ g LPG. The expression of PD-L1 (white bars) and PD-L2 (black bars) was analyzed by flow cytometry. The bars represent normalized data of three separate experiments. Mean \pm SD is shown. * $p \leq 0.05$ was considered significant.

molecules. Peritoneal macrophages were infected with *L. mexicana* promastigotes in a ratio 1:10 (cells:parasites). In one group, *Leishmania* promastigotes combined with 5 μ g LPG were used to infect macrophages. The cells were stained with antibodies against F4/80, PD-L1 and PD-L2. PD-L1 expression decreased slightly in macrophages infected with *Leishmania* promastigotes (Fig. 2B). In contrast, PD-L2 was up-regulated (2.4-fold) in macrophages infected with *Leishmania* combined with LPG, as compared to non-infected cells (Fig. 2B). In conclusion, LPG stimulation seems to have a more potent effect to induce PD-L2 in peritoneal macrophages, as compared to the infection with *L. mexicana* alone.

3.3. *L. mexicana* LPG induces PD-1 expression in CD8+ T cells of vaccinated mice

After finding that LPG exacerbated disease progression and modulated the PD-L2 expression in macrophages, we were interested in analyzing the effect exerted by LPG on spleen CD8+ and CD4+ T lymphocytes of mice immunized with two different doses of LPG. Vaccination with 10 or 100 μ g LPG increased PD-1 expression in CD8+ T cells. Re-stimulation of these cells *in vitro* with 1, 5 or 10 μ g LPG maintained their elevated expression of PD-1 (Fig. 3A).

LPG had an opposite effect on CD137 expression in CD8+ T cells. Mice vaccinated with 10 μ g down-regulated their CD 137 expression by 20%, whereas vaccination with 100 μ g decreased CD137 expression by 25% (Fig. 3B). Re-stimulation with 5 or 10 μ g LPG

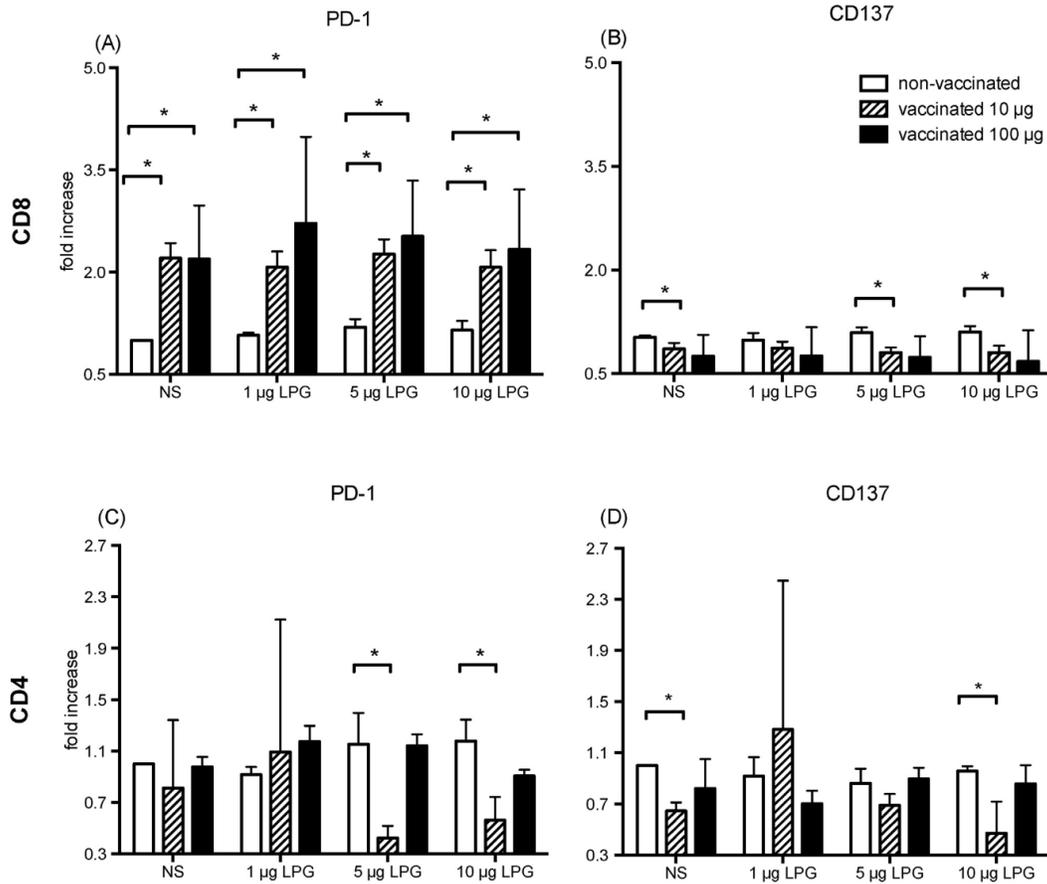


Fig. 3. PD-1 expression is dose-dependent in BALB/c vaccinated with *L. mexicana* LPG. Mice were vaccinated three times at 2-week intervals with 10 µg (stripped bars) or 100 µg LPG (black bars). Non-vaccinated mice were used as controls (white bars). Spleen T lymphocytes were obtained and re-stimulated *in vitro* with 1, 5 or 10 µg LPG during 24 h, fixed with paraformaldehyde and stained with anti CD3, CD4, CD8, PD-1 and CD137 antibodies. (A) PD-1 expression in CD8⁺ T cells, (B) CD137 expression in CD8⁺ T cells. (C) PD-1 expression in CD4⁺ T cells, and (D) CD137 expression in CD4⁺ T cells. The bars represent normalized data of three separate experiments. Mean ± SD is shown. * $p \leq 0.05$ was considered significant.

further reduced CD137 in mice vaccinated with 10 µg, as compared to non-vaccinated controls (Fig. 3B).

The analysis of CD4⁺ T cells of mice vaccinated with 10 or 100 µg LPG showed no modification in the PD-1 expression. Yet *in vitro* re-stimulation with 5 or 10 µg LPG reduced PD-1 expression in CD4⁺ cells of mice vaccinated with 10 µg, as compared to non-vaccinated controls (Fig. 3C). When analyzing the expression of CD137 in CD4⁺ T cells, mice vaccinated with 10 µg mice showed a reduced expression, which diminished even more after these cells were re-stimulated *in vitro* with 10 µg LPG (Fig. 3D).

Together these data show that *L. mexicana* LPG negatively regulates CD8⁺ cell activation by enhancing PD-1 expression and concomitantly reducing CD137 expressions, where the degree of the modulation depends upon the dose of LPG used for immunization as well as the dose of the subsequent stimulus. In contrast to CD8⁺ T cells, vaccination with LPG had no inhibitory effect on CD4⁺ T cells, since it did not modify their PD-1 expression and re-stimulation with LPG reduced their PD-1 expression. Thus, LPG vaccination seems to exert the inhibitory effect only on CD8⁺ T cells, in a dose dependent fashion.

3.4. The expression of PD-1 in CD8⁺ T lymphocytes of mice infected with *L. mexicana* is related to parasite load

To analyze whether parasite infection modulates PD-1 expression in T lymphocytes, BALB/c mice were infected in the earlobe dermis with 1×10^4 or 1×10^5 *L. mexicana* promastigotes. Mice were sacrificed prior to ulceration of the lesions. Splenocytes were isolated and re-stimulated *in vitro* with 1, 5 or 10 µg LPG during 24 h and PD-1 as well as CD137 were analyzed. We found that PD-1 expression is enhanced in CD8⁺ T cells of mice infected with 1×10^4 (0.5-fold) or 1×10^5 (3.6-fold) parasites, as compared to CD8⁺ T cells from non-infected mice (Fig. 4A). *In vitro* stimulation with all three doses of LPG showed the same high expression of PD-1.

The analysis of CD137 in CD8⁺ T cells showed a 40% down-regulation in mice infected with 1×10^4 promastigotes, whereas mice infected with 1×10^5 promastigotes showed a similar expression as non-infected mice. *In vitro* re-stimulation with LPG did not alter CD137 expression (Fig. 4B).

CD4⁺ lymphocytes showed a minimal increase in PD-1 expression after infections with either number *L. mexicana* parasites, and

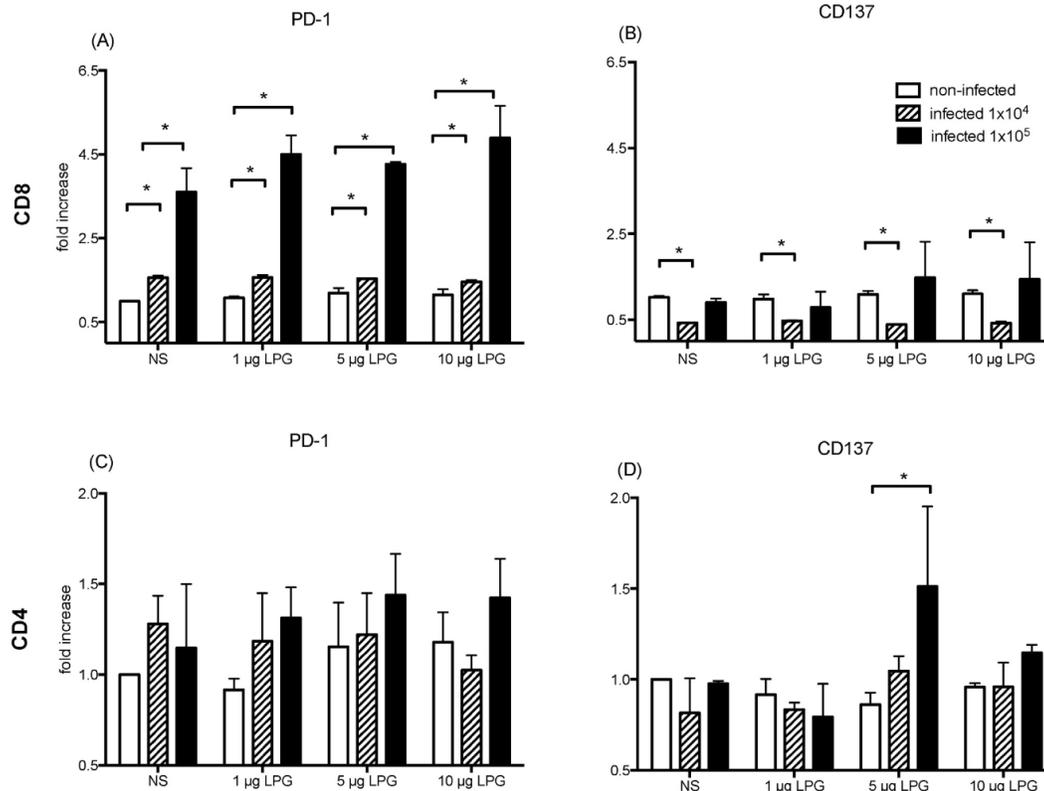


Fig. 4. *L. mexicana* infection promotes the PD-1 expression in CD8 T cells. Mice were infected in the ear dermis ear 1×10^4 (stripped bars) and a second group with 1×10^5 (black bars) *L. mexicana* promastigotes. Healthy BALB/c mice were used as a control group (white bars). Mice were euthanized before the lesions ulcerated. T cells from spleen were re-stimulated with 1, 5 or 10 µg LPG during 24 h, fixed with paraformaldehyde and stained with anti CD3, CD4, CD8, PD-1 and CD137 antibodies. (A) PD-1 expression in CD8 T cells, (B) CD137 expression in CD8 T cells, (C) PD-1 expression in CD4 T cells and (D) CD137 expression in CD4 T cells. The bars represent normalized data of three separate experiments. Mean \pm SD is shown. * $p \leq 0.05$ was considered significant.

showed no changes despite secondary stimuli with LPG (Fig. 4C). Furthermore, the expression of CD137 in CD4⁺ T cells of infected mice also remained unaltered. The only up-regulation of this activation marker was observed in CD4⁺ T cells of mice infected with 1×10^5 parasites after they were re-stimulated *in vitro* with 5 µg LPG (Fig. 4D).

In conclusion these results show that *L. mexicana* infection induces significantly enhanced PD-1 expression only in CD8⁺ T cells, in a dose-dependent fashion. The reduced expression of CD137 in association with the increased levels of PD-1 in these CD8⁺ T cells seems to indicate that they resemble an exhausted phenotype. PD-1 is minimally expressed in CD4⁺ cells during *L. mexicana* infections and not altered by *in vitro* LPG stimuli, showing that *L. mexicana* exerts a stronger inhibitory effect on CD8⁺ T cells, as compared to CD4⁺ T cells.

3.5. Vaccination with LPG or *L. mexicana* infection of mice regulates PD-L2 expression in spleen macrophages

Since vaccination with LPG immunomodulated CD8⁺ T lymphocytes toward inhibition, we analyzed if immunization with different LPG concentrations or infection with different parasite numbers also modulated the expression of PD-L2 on spleen macrophages. Macrophages from mice vaccinated with 10 µg LPG

and re-stimulated *in vitro* with 1 µg LPG, showed diminished expression of PD-L2 whereas vaccination with 100 µg LPG tended to increase the expression of PD-L2 in macrophages after receiving secondary stimuli with LPG (Fig. 5A).

Mice infected with 1×10^4 or 1×10^5 parasites down-regulated PD-L2 expression by 50% (Fig. 5B). Re-stimulation of macrophages from mice infected with 1×10^4 parasites with LPG always showed diminished expressions of this inhibitory marker, whereas those from mice infected with 1×10^5 parasites slightly increase their PD-L2 expression, albeit never reaching the levels expressed in cells of non-infected mice (Fig. 5B).

Together, these data show that *Leishmania* infections reduce PD-L2 expression in spleen macrophages and that this down-regulation persists despite secondary *in vitro* stimulation with LPG.

4. Discussion

Our data shed new light on the cause of enhanced disease progression after immunization with *Leishmania* LPG that has also been reported in the literature [16]. In an attempt to understand the underlying cause of this unsuccessful vaccination with LPG, we immunized mice with different concentrations of LPG and thereafter stimulated their spleen cells with various doses of LPG *in vitro* in an attempt to simulate a secondary exposure to LPG antigen, as

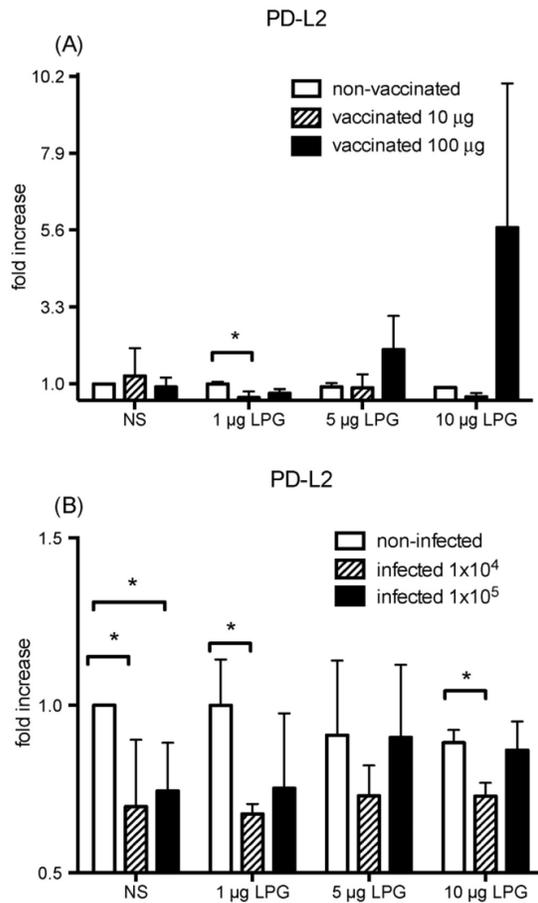


Fig. 5. Analysis of the PD-L2 expression in spleen macrophages from vaccinated (A) and infected mice (B). After vaccination with 10 or 100 µg LPG or infection with 1×10^4 or 1×10^5 *L. mexicana* promastigotes, macrophages were isolated from the spleen and re-stimulated with 1, 5 or 10 µg LPG during 24 h, fixed with paraformaldehyde and stained for F4/80 and PD-L2. The expression was analyzed by flow cytometry. (A) PD-L2 expression in vaccinated animals: white bars represent healthy mice, striped bars represent mice vaccinated with 10 µg and black bars are mice vaccinated with 100 µg LPG. (B) PD-L2 expression in macrophages of mice infected with different parasite numbers. White bars represent healthy mice, striped bars are mice infected with 1×10^4 and black bars are mice infected with 1×10^5 *L. mexicana* promastigotes. The bars represent normalized data of three separate experiments. Mean \pm SD is shown. * $p \leq 0.05$ was considered significant.

would occur during a natural infection. Additionally, we infected mice with different *L. mexicana* numbers and also re-exposed their lymphocytes to a secondary challenge with LPG. We here show that immunization of BALB/c mice with LPG or infections with *L. mexicana* promastigotes enhances the expression of the inhibitory receptor PD-1 in CD8⁺, whereas CD4⁺ T cells remain unaltered. The increase of these inhibitory molecules in CD8⁺ T cells acts in concert with their reduction of the activating molecule CD137, when these cells are confronted with a new challenge of LPG. These changes vary according to the amount of the LPG used for the vaccination and the parasite load during infection and they also vary according to the amount of parasite antigen (LPG) encountered by these cells after renewed exposure. The combination of these events possibly leads to a severe down-regulation of the functional capacity of CD8⁺

T cells in controlling the parasite infection. The response of CD4⁺ T cells was less clear.

PD-1 (programmed-death 1) receptor is related to CD28 and CTLA-4. It is inducible after T cell activation and down-regulates activated T cells [11]. Its ligands, PD-L1 and PD-L2, are up-regulated in APCs following activation [8]. PD-1 and PD-L2 may have distinctive roles in regulating Th-1 and Th-2 responses and reducing T cell proliferation by arresting the cell cycle [17,18]. This inhibitory receptor and its ligands have been studied in tumors, showing that the engagement of PD-1 with PD-L1 and PD-L2 attenuate T cell responses and help tumor cells escape immunosurveillance [19]. In chronic viral infections, suppressed CD8⁺ T cell responses have been attributed to PD-1:PD-L1 interactions [20].

To the best of our knowledge, we here describe for the first time that suppressor receptor PD-1 is induced after vaccination with elevated doses of *Leishmania* LPG or with the infection with elevated amounts of *L. mexicana* promastigotes. This expression is specifically dominant on CD8⁺ T lymphocytes possibly leading to a suppression of these cells that are critical in the control of leishmaniasis, both through IFN- γ production, as well as in their cytotoxic effect against autologous *Leishmania*-infected macrophages [5,6]. These results call for a careful pre-immunization evaluation of potential vaccination candidates against *Leishmania*, since the induction of a suppressive effect can lead to detrimental blockage of the immune response, favoring a more virulent disease progression. These data open a new field of research in vaccine developments and provide a novel strategy for therapeutic intervention in leishmaniasis, where the blockade of PD-1 could represent a valuable approach for anti-*Leishmania* immunotherapy.

Our data also yield information on novel parasite evasion strategies, achieving CD8⁺ T cell suppression, thereby eliminating one of the more powerful defense mechanisms against *L. mexicana* [13].

We conclude that vaccination models should assess whether PD-1 and/or PD-L2 are induced, that, far from activating CD8⁺ T cells, it could lead to their inhibition. Additionally, during experimental models of *L. mexicana* infections, the parasite load must be taken into account, since it can have opposing effects on PD-1 expression in lymphocytes. This study provides insight into the regulatory pathways elicited in vaccine models using different antigen concentrations or during *Leishmania* infections with different parasite loads, showing that the outcome can be polarly opposed, leading to contradictory results.

Acknowledgments

Maria Berenice Martínez Salazar was supported by a PhD fellowship from CONACyT and is a doctoral student of Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The Project was financed by CONACyT-102155 and PAPIIT IN215212

Conflict of interest: The authors state that there is no conflict of interest.

References

- [1] Becker I, Salaiza N, Aguirre M, et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003;130(2):65–74.
- [2] Villasenor-Cardoso MI, Salaiza N, Delgado J, Gutierrez-Kobeh L, Perez-Torres A, Becker I. Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host. *Parasite Immunol* 2008;30(8):425–34.
- [3] Delgado-Dominguez J, Gonzalez-Aguilar H, Guirre-García M, et al. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasite Immunol* 2010;32(6):440–9.
- [4] Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002;2(11):845–58.

- [5] Belkaid Y, von Stebut E, Mendez S, et al. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 2002;168(8):3992–4000.
- [6] Uzonna JE, Joyce KL, Scott P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med* 2004;199(11):1559–66.
- [7] Rhee EG, Mendez S, Shah JA, et al. 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. *J Exp Med* 2002;195(12):1565–73.
- [8] Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001;2(3):261–8.
- [9] Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *PNAS* 2003;100(9):5336–41.
- [10] Shin T, Yoshimura K, Shin T, et al. In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2005;201(10):1531–41.
- [11] Carter L, Fouser LA, Jussif J, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 2002;32(3):634–43.
- [12] Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, et al. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Int Health* 1999;4(12):801–11.
- [13] Hernandez-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(11):e871.
- [14] Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, Stager S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog* 2009;5(5):e1000431.
- [15] Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JR, Guedes HL, Fentanes RF, Rossi-Bergmann B. TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes Infect* 2005;7(13):1317–23.
- [16] Pinheiro RO, Pinto EF, de Matos Guedes HL, et al. Protection against cutaneous leishmaniasis by intranasal vaccination with lipophosphoglycan. *Vaccine* 2007;25(14):2716–22.
- [17] Greenwald RJ, Latchman YE, Sharpe AH. Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2002;14(3):391–6.
- [18] Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2002;20:29–53.
- [19] Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 2007;19(7):813–24.
- [20] Ascierto PA, Simeone E, Sznol M, Fu YX, Melero I. Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. *Semin Oncol* 2010;37(5): 508–16.