UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Caracterización del desarrollo y proliferación de células del sistema inmune en ratones deficientes en ICAP-1

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Yaiza Rodríguez García

DIRIGIDA POR

Joaquín Teixidó Calvo

Madrid

© Yaiza Rodríguez García, 2025

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

El papel de la fauna silvestre como especies centinela del género *Leishmania*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA

POR

Iris Azami Conesa

DIRECTORA

María Teresa Gómez Muñoz

MADRID, 2024

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

El papel de la fauna silvestre como especies centinela del género *Leishmania*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Iris Azami Conesa

Directora

María Teresa Gómez Muñoz

A mis padres.

Por Yasmina y mis abuelas.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de la Tesis Doctoral te enfrentas a muchos momentos en los que tienes que parar un segundo, respirar y coger fuerzas delante de una hoja en blanco. Ahora es uno de ellos. Sois muchos los que me habéis acompañado y apoyado en estos años, y no puedo estar más agradecida de tener esta red de personas que me han comprendido, me han guiado y me han ayudado en cada pequeño paso que he dado hasta llegar hoy aquí.

A la primera persona que le tengo que agradecer el poder estar escribiendo estas palabras es a mi directora, Teresa. Gracias por haber confiado en mí y por haberme dado la oportunidad de hacer este gran proyecto. El día que nos conocimos no podía ni imaginar todo lo que iba a aprender y todo el camino que nos quedaba por delante. Eres mi maestra, mi amiga y un grandísimo ejemplo a seguir, como científica, como docente y como persona. No podría haber tenido mejor directora de Tesis. Gracias por tu paciencia, tu soporte y por contar conmigo en todas las cosas que hemos hecho estos años, gracias a ti estoy hoy donde estoy. Solo espero poder seguir aprendiendo de ti muchos años más. Me hubiera gustado que Rafa nos hubiera acompañado en este camino que empezamos con él, seguro que estaría contento con el resultado final.

Papá, mamá, esto es vuestro. Gracias por apoyarme incondicionalmente siempre. Me habéis dado la oportunidad de ser Doctora y gracias a vosotros esto es posible. Gracias a vuestro esfuerzo, vuestro sacrificio y a vuestra paciencia. A pesar de no tener beca ni contrato durante mucho tiempo, me habéis permitido llegar hasta aquí, sin dudar ni un momento, solo apoyándome, escuchándome y dándome fuerzas cuando menos las tenía. Sois mis mayores pilares, y todo lo que veis en mi es gracias a vosotros, a vuestros valores y a vuestra educación. Me habéis enseñado a confiar en mi misma y a perseguir mis sueños siempre, acompañándome en cada momento, dándome alas cuando lo necesitaba y sosteniéndome cuando me caía. Tengo la mejor familia del mundo, os quiero muchísimo.

Todo esto es posible gracias al apoyo incansable de Álvaro, mi bichi, mi compañero en todo, mi amigo, mi confidente. Gracias por estar a mi lado, por tu infinita paciencia, por escucharme siempre y por limpiarme las lágrimas y hacerme reír cada vez que tropiezo. Me has hecho este largo camino más fácil, lleno de amor y comprensión. Gracias por apoyarme y acompañarme en cada paso que he dado estos años, siempre con un abrazo y un beso, por tus palabras y por tu visión objetiva y realista de las cosas. Me has ayudado a mirar hacia adelante, a seguir y a no desanimarme, sin ti todo esto habría sido mucho más duro. Gracias por estar aquí conmigo, por todos los planes de futuro y las ganas de compartirlo todo conmigo.

Antes de mí, han sido muchos los que han pasado por este camino, pero mis guías desde el principio han sido Miguel e Isa. Gracias por vuestros consejos, vuestra ayuda y vuestro apoyo en

todo momento. Habéis estado a mi lado en cada momento de los últimos 15 años, y no puedo tener más suerte de teneros cerca, de que seáis mis amigos y de compartir tanto con vosotros.

Además de todas estas personas, mi red de apoyo y confianza no estaría nunca completa sin ellas, mujeres que admiro y que forman parte de mi vida desde hace muchos años. Marina, Cris, Tania, Paloma, Sara. Sois parte fundamental de todo esto, de lo que soy hoy, de haber llegado hasta aquí. Me habéis apoyado y escuchado siempre, con consejos, con risas, con viajes, con momentos únicos, que me han llenado de alegría, amor y paz. A lo largo de los años hemos crecido juntas, hemos evolucionado como mujeres fuertes y valientes, y lo seguiremos haciendo de la mano.

Todo este camino no habría comenzado sin GREFA y, en especial, sin Fernando, que me presentó a Teresa y puso a mi disposición todos los recursos que estaban en su mano para llevar a cabo esta Tesis. Gracias a él y a Bárbara, Irene, Laura, Virginia, Natalia, Alberto y a todos los voluntarios que me han ayudado a contar con las muestras necesarias, y que hacen un grandísimo trabajo por la recuperación y la investigación sobre fauna silvestre, siendo referentes en España y Europa.

También me gustaría agradecer parte de este trabajo a Jose Sansano, que me ha ayudado tantísimo en Valencia, de donde proceden muchos de los animales que forman parte de esta Tesis, y que me ofreció la primera oportunidad como docente universitaria. Gracias por tus consejos y esfuerzo.

Otra de las cosas que me ha permitido esta Tesis Doctoral es tener la oportunidad de conocer y trabajar con investigadores fuera de España. Me hubiera gustado poder estar más tiempo, pero el mes que estuve en Roma, en la Universidad de la Sapienza, con Marco Pombi, Gioia Bongiorno, Simona Grabielli, Claudia y Eleonora fueron muy gratificantes, aprendí muchísimo con ellos y me recibieron y trataron de una forma increíble.

En los últimos años, he tenido la suerte de trabajar con José María Alunda, Javier Carrión, Marta Mateo y Pablo Matas, que han puesto su gran experiencia, recursos y trabajo a disposición de los últimos trabajos de esta Tesis.

Y no me puedo olvidar de mis compañeros de la UEM, Jorge, Sonia, Manu, Vivi, Cristina, Ana Fernández y todos los del grandísimo equipo de profes que desde hace dos años me apoyan, aconsejan y guían en estos últimos pasos, y que me acogieron con los brazos abiertos desde el primer día.

Todas estas personas han sido fundamentales en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

¡Muchísimas gracias!

"La evolución es un proceso caótico y creativo"

Lynn Margulis (1938- 2011)

ÍNDICE

Listado de abreviaturas.....I

Listado de figuras.....V

Listado de tablas.....VII

Listado de publicaciones.....IX

RESUMEN / SUMMARY.....1

Resumen.....3

Summary.....5

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....7

1.1. Género *Leishmania*.....9

1.1.1. Características generales y ciclo de vida.....9

1.1.2. Clasificación del género *Leishmania*.....11

1.1.3. Especies zoonóticas relevantes.....13

1.1.4. Leishmaniosis humana.....16

1.1.5. Reservorios animales del género *Leishmania*.....19

1.2. Transmisión y distribución de *Leishmania* spp.....22

1.2.1. Flebotomos: características generales y distribución geográfica.....22

1.2.2. Vías de transmisión alternativas.....26

1.2.3. Relevancia de *Leishmania* spp. en animales silvestres.....27

1.2.4. Distribución geográfica de *Leishmania* spp. en animales silvestres.....28

1.2.5. El papel de las especies exóticas invasoras en España.....31

1.2.6. Introducción de especies foráneas de *Leishmania* en España.....32

CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....35

2.1. Justificación.....37

2.2. Hipótesis.....37

2.3. Objetivos.....38

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA.....39

3.1. Animales y distribución.....41

3.2. Recogida y procesado de las muestras biológicas 42
3.3. Detección de *Leishmania* spp. mediante PCR y secuenciación 43
3.4. Mapas 46
3.5. Análisis estadístico 46
CAPÍTULO 4: RESULTADOS 47
4.1. Objetivo 1 49
4.1.1. Resumen 49
4.1.2. Artículo 50
4.2. Objetivos 2 57
4.2.1. Resumen 57
4.2.2. Ponencias 58
4.2.3. Artículo 58
4.3. Objetivos 3 69
4.3.1. Resumen 69
4.3.2. Ponencias 70
4.3.3. Artículo 71
4.4. Objetivo 4 85
4.4.1. Resumen 85
4.4.2. Ponencias 86
4.4.3. Artículo 86
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN 97
5.1. Discusión integradora 99
5.1.1. Animales silvestres como potenciales reservorios de *Leishmania* spp. 99
5.1.2. Utilidad de la detección de *Leishmania* spp. mediante PCR 102
5.1.3. Expansión de las especies de *Leishmania* 107
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES 109
BIBLIOGRAFÍA 113
ANEXOS 141
Otras publicaciones científicas 143

LISTADO DE ABREVIATURAS

µl: microlitros, unidad de medida de volumen

µm: micrómetro o micra, unidad de medida de longitud

µM: micromolar, unidad de medida de concentración

”: segundos

˚**:** grados

º C: grados centígrados, unidad de medida de temperatura

A: adenina, base nitrogenada

a.C.: antes de Cristo

ADN: ácido desoxirribonucleico

C: citosina, base nitrogenada

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention* o Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades

CERI: Centro de Estudio de Rapaces Ibéricas

dNTP: desoxiribonucleótidos- difosfato

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control* o Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades

EDO: enfermedad de declaración obligatoria

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay* o ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima

EWDA: *European Wildlife Disease Association*

G: guanina, base nitrogenada

GREFA: Grupo para la Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat

hsp70: *heat shock protein 70* o proteína de choque térmico 70

ICT: inmunocromatogragía

IFAT: *immunofluorescence antibody test* o prueba de inmunofluorescencia indirecta

ITS1: *internal transcribed spacer 1* o espaciador transcrito interno 1

JCR: *Journal Citation Reports*

kDNA: *kinetoplast deoxyribonucleic acid* o ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto

km: kilómetros, unidad de medida de longitud

LC: leishmaniosis cutánea

LMC: leishmaniosis mucocutánea

LV: leishmaniosis visceral

mg: miligramos, unidad de medida de peso

$MgCl_2$: cloruro de magnesio

msnm: metros sobre el nivel del mar

N: norte

n.a.: no analizado

nPCR: *nested polymerase chain reaction* o reacción en cadena de la polimerasa anidada

OMS: Organización Mundial de la Salud

OMSA: Organización Mundial de Sanidad Animal

pb: pares de bases nitrogenadas, medida de longitud de un fragmento genético

PCR: *polymerase chain reaction* o reacción en cadena de la polimerasa

pH: potencial de hidrógeno, medida de alcalinidad o acidez de una disolución

Q: *quartile* o cuartil

qPCR: *quantitative PCR* o PCR cuantitativa

rtPCR: *real time PCR* o PCR en tiempo real

S: sur

SARS-CoV-2: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* o Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo

s.f.: sin fecha

Spp.: hace referencia a todas las especies dentro de un género.

SOCEPA: Sociedad Española de Parasitología

SSUrRNA: *Small subunit ribosomal ribonucleic acid* o subunidad pequeña ribosomal de ácido ribonucleico

Syn: sinónimo

T: timina, base nitrogenada

TAE: Tris, Acetato y EDTA

Taq: enzima polimerasa comercial procedente de la bacteria *Thermus aquaticus*

UCM: Universidad Complutense de Madrid

UV: ultravioleta

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

WDA: *Wildlife Disease Association*

WOAH*: World organization of animal health* u Organización mundial de sanidad animal

LISTADO DE FIGURAS

- **Figura 1.** A: Promastigote de *Leishmania*. B: Amastigote de *Leishmania*. Diseño propio creado con Biorender.com.
- **Figura 2.** Ciclo biológico de *Leishmania*. Diseño propio creado con Biorender.com.
- **Figura 3.** Clasificación del género *Leishmania*. Elaboración propia.
- **Figura 4.** Mapa de distribución de leishmaniosis cutánea y mucocutánea. *: solapamiento de LC y LMC. Adaptación del mapa de la OMS 2022.
- **Figura 5.** Mapa de distribución de leishmaniosis visceral. Fuente: OMS 2022
- **Figura 6.** Mapa de distribución de *Phlebotomus perniciosus*. Fuente: ECDC, 2023
- **Figura 7.** Mapa de distribución de *Phlebotomus ariasi*. Fuente: ECDC, 2023
- **Figura 8.** Mapa de distribución de *Phlebotomus sergenti*. Fuente: ECDC, 2023
- **Figura 9.** Proceso de recogida, procesado y análisis de las muestras mediante PCR convencional y secuenciación. Diseño propio creado con Biorender.com.

LISTADO DE TABLAS

- **Tabla 1.** Especies zoonóticas de *Leishmania* y su distribución. Syn: sinónimo; ***** clasificación taxonómica sin consenso. Adaptación propia de Akhoundi et al., 2016.

- **Tabla 2**. Dianas del ADN, oligonucleótidos y condiciones de las PCR. *: nPCR. Ext: cebadores externos. Int: cebadores internos.

- **Tabla 3.** Porcentajes de animales positivos a *L. infantum* y/o *L. tropica* en relación con la diana de ADN utilizada en los diferentes estudios que se incluyen. n.a.: no analizado. *: PCR realizada solo en animales positivos a otras dianas.

- **Tabla 4.** Porcentaje de animales positivos según la muestra a analizar mediante PCR. n.a.: no analizado

LISTADO DE PUBLICACIONES

Esta Tesis Doctoral es un compendio de trabajos publicados en revistas científicas indexadas y con revisión por pares, todos ellos relacionados con la presencia de *Leishmania* spp. en fauna silvestre. A continuación, se muestra el listado de los trabajos incluidos:

- **Azami-Conesa, I.**, Martínez-Díaz, R. A., González, F., & Gómez-Muñoz, M. T. (2020). First detection of *Leishmania infantum* in common urban bats *Pipistrellus pipistrellus* in Europe. *Research in Veterinary Science*, *132*, 172–176. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.06.019

- **Azami-Conesa, I.**, Sansano-Maestre, J., Martínez-Díaz, R. A., & Gómez-Muñoz, M. T. (2021). Invasive species as hosts of zoonotic infections: The case of american mink (*Neovison vison*) and *Leishmania infantum*. *Microorganisms*, *9*(7), 1–10. https://doi.org/10.3390/microorganisms9071531

- **Azami-Conesa, I.**, Pérez-Moreno, P., Matas Méndez, P., Sansano-Maestre, J., González, F., Mateo Barrientos, M., & Gómez-Muñoz, M. T. (2023). Occurrence of *Leishmania infantum* in Wild Mammals Admitted to Recovery Centers in Spain. *Pathogens*, *12*(1048), 1–11. https://doi.org/doi.org/10.3390/pathogens12081048

- **Azami- Conesa, I.,** Matas- Méndez, P., Pérez- Moreno, P., Carrión, J., Alunda, J.M., Mateo-Barrientos, M., Gómez- Muñoz, M.T. (2024). Wildlife as a sentinel for pathogen introduction in non-endemic areas: Is *Leishmania tropica* circulating in wildlife in Spain?. bioRxiv 2024.03.16.585353. https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353. Prepint.

- **Azami- Conesa, I.,** Matas- Méndez, P., Pérez- Moreno, P., Carrión, J., Alunda, J.M., Mateo-Barrientos, M., Gómez- Muñoz, M.T. (2024). Wildlife as a sentinel for pathogen introduction in nonendemic areas: first detection of *Leishmania tropica* in wildlife in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases,* 2024 (8259712), 1-10. https://doi.org/10.1155/2024/8259712

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

Leishmania es un género de parásitos protozoarios capaces de afectar a humanos y animales domésticos y silvestres. Se transmite a través de la picadura de las hembras de flebotomos, un insecto díptero hematófago, provocando diferentes manifestaciones clínicas en el humano dependiendo de la especie de parásito y el estado inmunitario del hospedador.

En los últimos años se ha incrementado el interés por conocer cómo la fauna silvestre puede albergar a estos parásitos, pudiendo actuar como reservorios. En el presente trabajo, se han analizado diferentes especies de animales silvestres procedentes de distintas Comunidades Autónomas de España para determinar la presencia de *Leishmania* spp. Además, se ha determinado la sensibilidad y especificidad de distintas dianas del ADN utilizando PCR convencional.

Como parte de los resultados, se ha detectado por primera vez en Europa la presencia de *Leishmania infantum* en murciélago urbano común (*Pipistrellus pipistrellus*), siendo una especie ampliamente distribuida en Europa y muy relacionada con ambientes urbanos y peri-urbanos. Alrededor del 60% de los animales analizados fueron positivos al menos en una de las muestras estudiadas (bazo, pelo y coágulo de sangre de corazón). Además, el pelo aportó resultados esperanzadores, donde aproximadamente la mitad de los individuos positivos lo fueron a esta muestra no invasiva.

Asimismo, se ha detectado ADN de *L. infantum* en animales exóticos invasores, como el visón americano (*Neovison vison*), que supone una amenaza para los ecosistemas de ribera de la península ibérica, no solo por la competencia por los recursos naturales con otras especies autóctonas, sino también por la capacidad de albergar patógenos transmisibles a otros animales y a los humanos, como es el caso de *L. infantum*. El 90% de los animales analizados procedentes de la Comunidad Valenciana resultaron positivos a este parásito en muestras de bazo. Este órgano es uno de los más sensibles para detectar *L. infantum* debido a su localización visceral. Además, se analizaron las muestras con diferentes dianas del ADN para PCR, siendo la *SSUrRNA* y la *Repeat region* las más sensibles en comparación con la *ITS1* y el *kDNA*.

Otros animales silvestres como el tejón europeo (*Meles meles*), el erizo europeo (*Erinaceus europaeus*) y la ardilla roja (*Sciurus vulgaris*), entre otros, fueron analizados mediante PCR como posibles hospedadores de *L. infantum*. En este caso, todos los animales procedían de centros de recuperación de fauna silvestre de la Comunidad de Madrid, Castilla-La Mancha, Castilla y León y Comunidad Valenciana. Se detectó al parásito en tres de las nueve especies animales analizadas, siendo el tejón europeo en el que se observó una mayor presencia de *L. infantum* (35.7% de los individuos), seguido del erizo europeo (14.29%) y la ardilla roja (11,53%). Se analizaron muestras de bazo, piel, conjuntiva oral y conjuntiva ocular (estas dos últimas solo en erizos europeos)

resultando más sensible el bazo. También se estudiaron diferentes regiones del ADN, siendo la *SSUrRNA* y la *Repeat region*, una vez más, las más sensibles.

Por último, se ha detectado por primera vez en España la presencia de *Leishmania tropica* en animales silvestres autóctonos. Esta especie es propia de países vecinos como Marruecos o Túnez, pero nunca antes se había demostrado su presencia en nuestro país, más allá de algunos casos importados en personas. No debe resultar extraño este hallazgo, puesto que desde hace varias décadas el flebotomo responsable de la transmisión de *L. tropica* está establecido en la península ibérica, y solo era cuestión de tiempo que se detectaran los primeros casos autóctonos. El gato montés (*Felis silvestris*) ha sido el animal en el que se ha encontrado dicho parásito, siendo 18 los animales analizados en muestras de bazo y piel, y donde siete de los 18 resultaron positivos a *Leishmania* spp. De los siete, un animal fue positivo a *L. tropica* en muestras de piel mientras que otro individuo presentaba una secuencia mixta de *L. tropica* y *L. infantum*, pudiendo corresponder con una infección mixta o a un híbrido entre ambas especies. Este hallazgo abre la puerta al control y la prevención de esta especie de *Leishmania* foránea, que suele presentar una clínica cutánea, y donde los profesionales sanitarios, veterinarios y autoridades deben trabajar en conjunto para detectar, tratar y prevenir las infecciones con esta especie en la región.

La presente Tesis Doctoral ha puesto de manifiesto la presencia de *Leishmania* spp. en animales silvestres de la península ibérica, los cuales podrían investigarse como centinelas de la parasitosis, además de evaluar su posible papel como reservorio en futuros brotes epidemiológicos de leishmaniosis.

SUMMARY

Leishmania is a genus of protozoan parasites capable of affecting humans and domestic and wild animals. It is transmitted through the bite of female phlebotomine sandflies, a hematophagous dipteran insect, causing different clinical manifestations in humans depending on the parasite species and the immune status of the host.

In recent years, there has been increasing interest in how wildlife can harbour these parasites and act as reservoirs. In the present work, different species of wild animals from different Autonomous Communities of Spain have been analysed for the presence of *Leishmania* spp. In addition, the sensitivity and specificity of different DNA targets have been determined using conventional PCR.

As part of the results, the presence of *Leishmania infantum* has been detected for the first time in Europe in common urban bats (*Pipistrellus pipistrellus*), a species widely distributed in Europe and closely related to urban and peri-urban environments. About 60% of the animals tested were positive for at least one of the samples tested (spleen, hair and heart blood clot). In addition, hair provided encouraging results, where half of the positive individuals were positive to this non-invasive sample.

L. infantum DNA has also been detected in invasive exotic animals, such as the American mink (*Neovison vison*), which poses a threat to the river ecosystems of the Iberian Peninsula, not only because of competition for natural resources with other native species, but also because of its capacity to harbour pathogens transmissible to other animals and humans, as is the case of *L. infantum*. Ninety percent of animals tested from the Valencian Community were positive for this parasite in spleen samples. This organ is one of the most sensitive for detecting *L. infantum* due to its visceral location. In addition, samples were analysed by PCR with different DNA targets, being *SSUrRNA* and *Repeat region* the most sensitive compared to *ITS1* and *kDNA*.

Other wild animals such as the European badger (*Meles meles*), European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and red squirrel (*Sciurus vulgaris*), among others, were tested as potential hosts of *L. infantum*. In this case, all animals came from wildlife recovery centres in Madrid, Castilla-La Mancha, Castilla y León and Valencia. The parasite was detected in three of the nine animal species tested, with the European badger showing the highest presence of *L. infantum* (35.7% of individuals), followed by the European hedgehog (14.29%) and the red squirrel (11.53%). Samples of spleen, skin, oral conjunctiva and ocular conjunctiva (the latter two only in European hedgehogs) were analysed, with the spleen being more sensitive. Different DNA regions were also studied, with *SSUrRNA* and *Repeat region* being, once again, the most sensitive.

Finally, the presence of *Leishmania tropica* in native wild animals has been detected for the first time in Spain. This species is native to neighbouring countries such as Morocco and Tunisia, but its

presence in Spain had never been demonstrated before, with the exception of a few imported cases in humans. This finding should not be surprising, since the phlebotomine sandfly responsible for the transmission of *L. tropica* has been established in the Iberian Peninsula for several decades, and it was only a matter of time before the first autochthonous cases were detected. The wildcat (*Felis silvestris*) was the animal in which the parasite was found, with 18 animals tested using spleen and skin samples, and where seven of the 18 were positive for *Leishmania* spp. Of these seven, one animal was positive for *L. tropica* in skin samples while another individual had a mixed sequences of *L. tropica* and *L. infantum* and may correspond to a mixed infection or a hybrid between the two species. This finding opens the way to the control and prevention of this foreign *Leishmania* species, which usually presents with a cutaneous clinic, and where health professionals, veterinarians and authorities must work together to detect, treat and prevent infections with this species in the region. This PhD thesis has highlighted the presence of *Leishmania* in wild animals in the Iberian Peninsula, which could be investigated as sentinels of this parasitosis, as well as evaluating their potential role as a reservoir in future epidemiological outbreaks of leishmaniasis.

CAPÍTULO 1:
INTRODUCCIÓN

1.1. GÉNERO *LEISHMANIA*

1.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CICLO DE VIDA

El género *Leishmania* es un grupo de organismos protozoarios incluidos dentro del orden Kinetoplastida y la familia Trypanosomatidae que fue descrito por primera vez en 1903 por el patólogo escocés sir William Boog Leishman en la India (Steverding, 2017). Este género abarca más de 20 especies consideradas los agentes causales de la leishmaniosis humana, siendo un grupo heterogéneo en cuanto a distribución geográfica y animales a los que parasitan (Azami-Conesa et al., 2021a). Sin embargo, a pesar de las diferencias entre ellas, estas especies comparten características morfológicas y biológicas.

El parásito tiene al menos dos morfotipos que se encuentran en todas las especies del género, siendo esenciales para el correcto desarrollo del ciclo. Las diferencias entre ambos son diversas, de manera que los amastigotes son intracelulares obligados, esféricos u ovoides y miden entre 2 y 5 µm, presentan un núcleo redondeado y central, un kinetoplasto con forma alargada o de bastón, un cuerpo basal y axonema presentes, pero no tienen flagelo libre. Por el contrario, los promastigotes tienen un largo flagelo libre que les proporciona movimiento, siendo de forma alargada y fina, de entre 14 y 20 µm de largo y de 2 a 4 µm de ancho. En esta última forma se observa el núcleo en posición central y el kinetoplasto muy próximo, así como el axonema y el cuerpo basal (Figura 1) (Llanos-Cuenta, 2013).

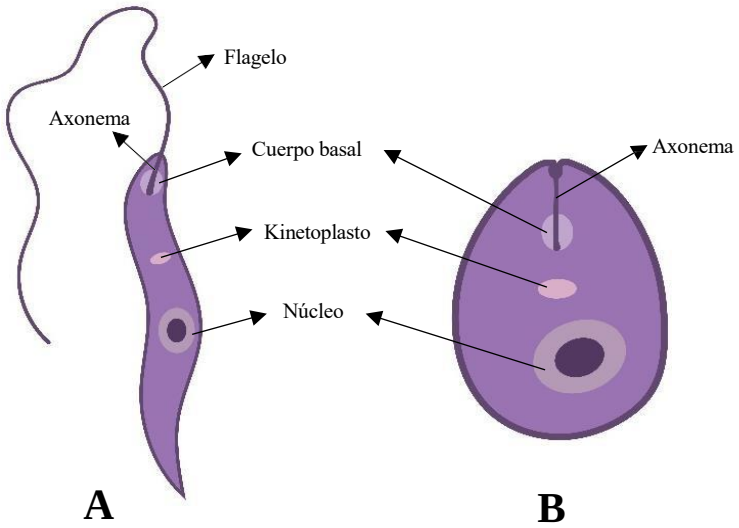


Figura 1. A: Promastigote de *Leishmania*. B: Amastigote de *Leishmania*. Diseño propio creado con Biorender.com.

El kinetoplasto es uno de los orgánulos más significativos de estos parásitos. Es común a todos aquellos organismos pertenecientes al orden Kinetoplastida, incluyendo a géneros como *Trypanosoma* o *Crithidia*, y se trata de una acumulación de ADN mitocondrial exclusiva de estos parásitos. La posición de este orgánulo, así como del flagelo y el núcleo, se han empleado para identificar las diversas fases de estos parásitos (Halliday et al., 2020). Además, el kinetoplasto es habitualmente utilizado como marcador o diana para la detección de estos organismos mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) debido a su elevada especificidad y sensibilidad (Aransay et al., 2000).

El ciclo de vida de los parásitos del género *Leishmania* es complejo, ya que presenta fases de desarrollo en animales mamíferos y fases de desarrollo en insectos, principalmente flebotominos, más comúnmente denominados flebotomos, que actúan como vectores (Figura 2). Durante este ciclo, el parásito infecta al mamífero a través de la picadura de los flebotomos, insectos del orden Diptera y de la familia Psychodidae (Bates, 2007). La fase infectante para el mamífero es el promastigote metacíclico, que se inocula a través de la saliva del flebotomo, entrando, así, en contacto con los macrófagos y otras células, como las células dendríticas del mamífero, que iniciarán el proceso de fagocitosis para eliminar al patógeno. Los promastigotes se situarán en un fagosoma, que se fusiona con los endosomas y lisosomas, formando así un fagolisosoma, donde cambia el morfotipo de promastigote a amastigote. En el interior de este fagolisosoma se ataca al parásito mediante la acción de enzimas lisosomales y diversas toxinas, como los radicales libres de oxígeno o los intermediarios de nitrógeno (óxido nítrico, entre otros) (Matlashewski, 2001). Sin embargo, los amastigotes son capaces de evadir la acción de estas sustancias mediante diversos mecanismos, como por ejemplo la inhibición selectiva de la señal de transducción (Descoteaux et al., 1992) o la inhibición transitoria de la fusión de los fagosomas y los endosomas (Olivier et al., 1998), consiguiendo sobrevivir a las acciones ofensivas de la célula del mamífero, continuando con su ciclo vital. Superada la acción destructiva de la célula hospedadora, el amastigote tiene la capacidad de multiplicarse en el interior de los macrófagos mediante fisión binaria hasta llegar a provocar la lisis de la célula hospedadora, liberando así una elevada cantidad de amastigotes que infectarán nuevas células sanas (Matlashewski, 2001). El vector se infectará al ingerir sangre con macrófagos parasitados con los amastigotes, que llegarán al sistema digestivo del flebotomo, donde provocarán la lisis de la célula mamífera ingerida, liberándose en el estómago. En este momento del ciclo, el parásito se transformará a la forma promastigote, capaz de fijarse con su flagelo y multiplicarse en distintas zonas del intestino del insecto, según la especie de *Leishmania* y, tras su maduración (promastigote metacíclico), se trasladará hasta la probóscide, concretamente a las glándulas salivares, a la espera de ser liberados en un nuevo mamífero durante el momento de la picadura (U.S. Disease Control and Prevention. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern., 2017).

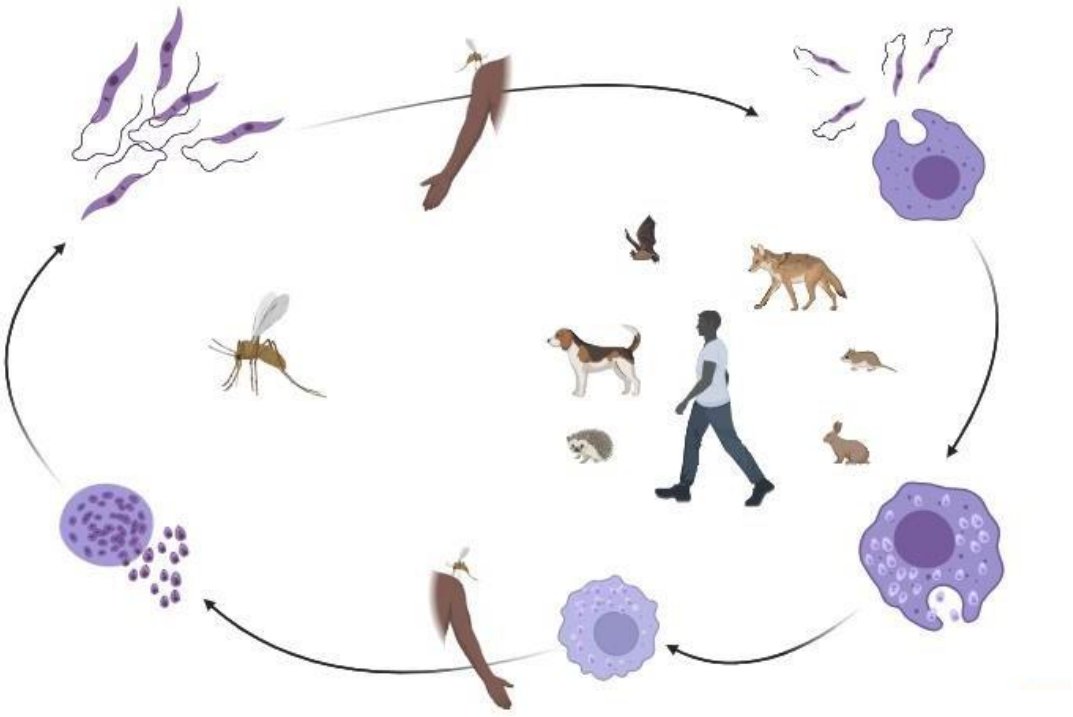


Figura 2. Ciclo biológico de *Leishmania*. Diseño propio creado con Biorender.com.

1.1.2. CLASIFICACIÓN DEL GÉNERO *LEISHMANIA*

El género *Leishmania* abarca un gran número de especies, muchas de ellas históricamente vinculadas al ser humano. Los primeros registros de este parásito en el hombre datan del 3.500 a.C., encontrándose ADN de *Leishmania* en momias del Antiguo Egipto. Asimismo, se han encontrado numerosos registros en antiguos escritos que describen patologías compatibles con la enfermedad que causa el parásito, especialmente de su manifestación cutánea (Akhoundi et al., 2016; Maxfield & Crane, 2019).

Establecer una taxonomía fiable y definitiva sobre el grupo no es una tarea fácil, debido a las variadas manifestaciones clínicas que se presentan y al elevado número de animales que infecta, pero actualmente existe un amplio consenso en clasificar a los parásitos del género *Leishmania* en el Reino Protista (Haeckel, 1866), phylum Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1993), clase Kinetoplastea (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976), dentro del orden Trypanosomatida (Kent, 1880) y la familia Trypanosomatidae (Döflein, 1901) (Akhoundi et al., 2016; Armúa-Fernández & Venzal, 2019). No podemos olvidar que los protozoos y otros eucariotas son aún objeto de revisión

taxonómica (Adl et al., 2005) y algunos autores insisten en la dificultad de llegar a un consenso en el caso de los protozoos (Ruggiero et al., 2015). En una de las revisiones más recientes, se sugiere la presencia de dos dominios principales en los eukariotas: Diaphoretickes y Amorphea. El infrarreino Excavata, que engloba a tripanosomátidos y metamonádidos, se situaría dentro del dominio Diaphoretickes junto con las algas microscópicas y la mayor parte de los protozoos, tales como apicomplejos, ciliados y una minoría de amebas. Por otro lado, el dominio Amorphea englobaría la mayoría de las amebas, hongos y animales (Adl et al., 2019). También debemos tener en cuenta que las técnicas moleculares son de gran ayuda para la clasificación de organismos y, en general, más fiables y sensibles que las técnicas utilizadas en el momento de la descripción de nuevas especies, hace décadas en la mayoría de los casos (Schönian et al., 2010).

Dentro de la familia Trypanosomatidae podemos encontrar tanto parásitos monoxenos (aquellos con un solo hospedador, en su mayoría insectos) como parásitos heteroxenos (aquellos con la necesidad de pasar por dos hospedadores). Estos últimos son agentes causales de enfermedades tanto en mamíferos como en reptiles o plantas y, por tanto, son los más estudiados dentro del grupo. Todos ellos son organismos flagelados, entre los que encontramos 3 géneros: *Phytomonas, Trypanosoma* y *Leishmania* (Akhoundi et al., 2016; Votýpka et al., 2013).

El género *Phytomonas* abarca organismos parásitos de más de 100 especies de plantas, como el tomate, el café o la palma, siendo de gran relevancia debido a las pérdidas económicas que causa en la agricultura (Jaskowska et al., 2015; Kaufer et al., 2017). Dentro del género *Trypanosoma* encontramos parásitos de mamíferos que se transmiten mediante insectos hematófagos y que causan enfermedades en el ser humano de gran importancia, como la enfermedad de Chagas en América Central y del Sur (*Trypanosoma cruzi*) y la enfermedad del sueño en África (*Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*) (Kaufer et al., 2017).

El género *Leishmania* es uno de los más ampliamente distribuidos y diversos dentro de los tripanosomátidos, abarcando más de 50 especies parásitas de mamíferos, entre ellos el ser humano, así como especies cuyos hospedadores son reptiles. Tradicionalmente, las especies de *Leishmania* se habían clasificado según tres criterios: las características morfológicas, los hospedadores que afectaban y los ciclos de vida que presentaban. Sin embargo, desde la aparición y mejora de los métodos moleculares, la clasificación y sistemática de este amplio grupo ha sufridos diversos cambios, siendo una herramienta de ayuda, combinada con los criterios biológicos anteriores (Klatt et al., 2019; Kostygov & Yurchenko, 2017). Actualmente se reconocen dos grandes clados dentro del género: *Euleishmania* y *Paraleishmania* y dentro de cada de uno se encuentran los diferentes subgéneros (Klatt et al., 2019).

En el caso de *Euleishmania*, está aceptado por la mayoría de los investigadores que incluye los subgéneros *L.* (*Leishmania*), *L.* (*Sauroleishmania*), *L.* (*Viannia*) y *L.* (*Mundinia*), siendo los tres primeros los que engloban a la mayor parte de las especies del género (Figura 3). Sin embargo, *Paraleishmania* levanta una mayor controversia debido a la heterogeneidad de sus integrantes. Muchos autores le consideran el "cajón de sastre" del género, ya que incluye algunas especies que tradicionalmente pertenecían al género *Endotrypanum*, que abarcaba inicialmente a tripanosomátidos endoeritrocíticos descritos en su mayoría en la Guayana Francesa (Espinosa et al., 2018).

Las especies de *Leishmania* que afectan a mamíferos se engloban, principalmente, dentro de los subgéneros *L.* (*Leishmania*) y *L.* (*Viannia*), con un total de 53 especies actualmente reconocidas dentro de estos grupos. Estas especies están ampliamente distribuidas, estando 29 de ellas presentes en el continente americano (clásicamente llamado Nuevo Mundo), 20 en África, Europa y Asia (Viejo Mundo), tres en las dos áreas de distribución anteriores, mientras que solo una especie del subgénero *L.* (*Mundinia*) ha sido descrita de forma exclusiva en Australia, (Klatt et al., 2019; Panahi et al., 2023). En torno a 20 de estas especies están descritas en el ser humano, causando distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad conocida como leishmaniosis. Todas ellas son comunes a diversas especies de mamíferos, tratándose de organismos zoonóticos de elevada relevancia a nivel mundial.

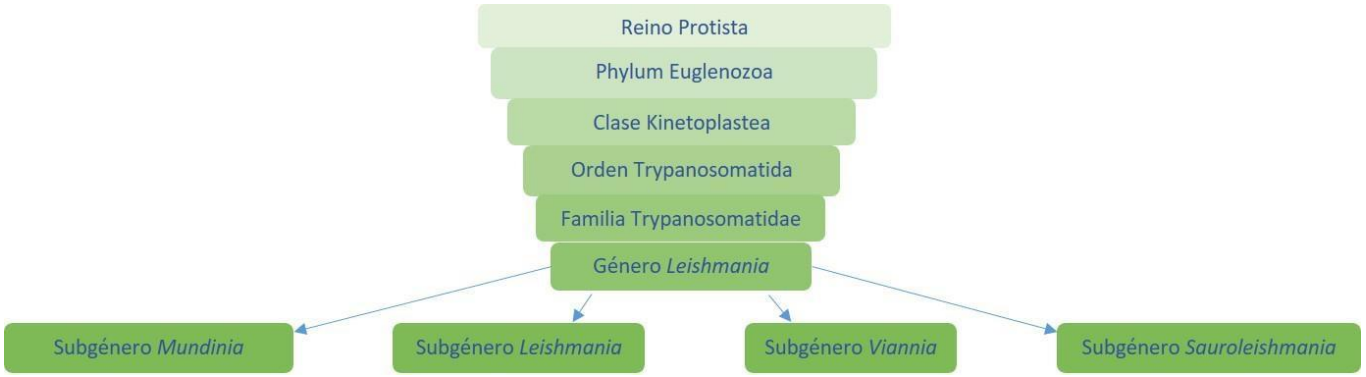


Figura 3. Clasificación del género *Leishmania*. Elaboración propia

1.1.3. ESPECIES ZOONÓTICAS RELEVANTES

Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) se define a una enfermedad zoonótica como aquella capaz de transmitirse entre los animales y los seres humanos. Puede estar causada por diversos patógenos, entre los que se encuentran con gran frecuencia los parásitos, entre ellos el género *Leishmania* (Centers for Disease Control and Prevention One Health office, s.f.).

Uno de los continentes más afectados por la leishmaniosis es América, en especial América del Sur y Centroamérica (Tabla 1). En esta amplia región, una de las especies más estudiadas y más extensamente distribuida es *L.* (*Viannia*) *braziliensis*, abarcando desde México hasta Argentina, describiéndose la infección principalmente en humanos, perros, caballos, gatos, así como en numerosas especies de fauna silvestre, como murciélagos, armadillos y varias especies de roedores (Azami-Conesa et al., 2021a; Ratzlaff et al., 2023).

En Europa, África y Asia podemos encontrar especies tan relevantes como *L. tropica*, principalmente en el norte de África, Oriente Próximo y esporádicamente en Grecia, *L. donovani* en África central, Oriente Medio y determinadas regiones de Asia, o *L. major* en países como Kenia, Etiopía, Túnez o Israel (Tabla 1). Estas especies se han descrito en humanos, gatos, murciélagos, primates o roedores (Azami-Conesa et al., 2021a; Cardoso et al., 2021; El Idrissi Saik et al., 2022).

Sin embargo, la especie más ampliamente distribuida y con mayor número de grupos de animales afectados es *L. infantum*. Se ha descrito tanto en el continente americano como en Europa, Asia y África. Es un parásito claramente zoonótico teniendo en cuenta tanto la sintomatología que produce en el hombre y otras especies, como la elevada prevalencia descrita en humanos, perros, gatos, tejones, murciélagos, zorros o lobos, entre otros. *L. infantum* se puede encontrar principalmente en la cuenca mediterránea (tanto norte de África como sur de Europa), en América del Sur, Oriente Próximo, India, Sudeste Asiático o Asia central (Tabla 1) (Akhoundi et al., 2016; Azami-Conesa et al., 2021a; Cardoso et al., 2021).

Por último, cabe destacar a *L.* (*Sauroleishmania*) *tarentolae*, un parásito considerado, hasta el momento, propio de reptiles, pero que en los últimos años se ha detectado tanto en perros como en humanos en varias regiones de Italia (Iatta et al., 2021; Mendoza-Roldan et al., 2021; Pombi et al., 2020). Se considera no patógena en el hombre, pero podría tener numerosas implicaciones en los nuevos tratamientos contra la leishmaniosis humana (Taylor et al., 2010).

Tabla 1. Especies zoonóticas de *Leishmania* y su distribución. Adaptación propia de Akhoundi et al., 2016.

SECCIÓN	SUBGÉNERO	ESPECIE	ZONA GEOGRÁFICA
Euleishmania	*Leishmania*	*L. aethiopica*	Este de África
		L. amazonensis syn. *L. gamhami*	Centro de América del Sur
		L. donovani syn. *L. archibaldi*	África central, sur de Asia, Oriente Próximo, India y China
		L. infantum syn. *L. chagasi*	Cuenca mediterránea (sur de Europa y norte de África), Oriente Próximo, Asia central, centro y sur de América.
		L. major	Centro y sur de África, Oriente Próximo y Asia central.
		L. mexicana	Norte América y centro de América del Sur
		L. tropica syn. *L. killicki*	Centro y norte de África, Oriente Próximo, Asia central e India
		L. venezuelensis	Norte de América del Sur
	Viannia	*L. braziliensis*	América del Sur y Centroamérica
		L. guyanensis	Norte de América del Sur y Centroamérica
		L. lainsoni	Centro de América del Sur
		L. lindenbergi	Centro de América del Sur
		L. naiffi	Centro de América del Sur y Centroamérica
		L. panamensis	América del Sur y Centroamérica
		L. peruviana	Centro de América del Sur
		L. shawi	Centro de América del Sur
Paraleishmania	*L. enriettii complex*	*L. colombiensis*	Norte de América del Sur
		*L. martiniquensis**	Sudeste asiático
		*L. siamensis**	Europa, Sudeste asiático y América del Norte

Syn: sinónimo; * clasificación taxonómica sin consenso.

1.1.4. LEISHMANIOSIS HUMANA

La leishmaniosis humana afecta actualmente a más de un millón de personas al año en todo el mundo, especialmente en zonas tropicales, subtropicales y la cuenca mediterránea, encontrándose en más de 90 países. Más de un billón de personas viven en zonas endémicas y, por tanto, están expuestas a la infección. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la leishmaniosis como una de las denominadas "Enfermedades Olvidadas" o "Neglected Diseases" debido a su distribución en países en vías de desarrollo, lo que dificulta el acceso a un diagnóstico precoz y tratamiento adecuado, además de una falta importante de recursos económicos destinados a la investigación de la enfermedad y desarrollo de nuevos fármacos. Anualmente, la OMS destina grandes esfuerzos humanos y económicos para frenar la transmisión y mejorar el acceso a los tratamientos en zonas endémicas, con numerosas campañas informativas de detección y tratamiento de la infección en zonas comprometidas (Akhoundi et al., 2016; World Health Organization, 2010).

Existen tres formas clínicas principales de la infección en el ser humano: leishmaniosis cutánea (LC), leishmaniosis mucocutánea (LMC) y leishmoniasis visceral (LV). Cada una de ellas presenta un cuadro clínico propio y es provocada por distintas especies del parásito, aunque algunas especies pueden producir varias formas clínicas.

La LC es la forma clínica más habitual, con una estimación de entre 600 000 y un millón de casos nuevos al año a nivel mundial, provocando daños cutáneos visibles, lo que provoca la estigmatización y aislamiento social de las personas que lo padecen. Son numerosas las especies de *Leishmania* capaces de provocar esta forma clínica, siendo *L. tropica*, *L. major* y *L. infantum* las habituales en el norte de África, Asia central y Oriente Próximo y *L. amazonensis, L. guyanensis, L. panamensis, L. peruviana, L. mexicana* y *L. braziliensis* las propias del continente americano (Desjeux, 2004; Saidi et al., 2023), como se observa en la Figura 4. Esta forma clínica se caracteriza por la aparición de lesiones cutáneas en la zona de la picadura del vector, donde se produce la multiplicación de los amastigotes. Estas lesiones pueden ser difusas en aquellos individuos donde se produce una inhibición de la respuesta inmune mediada por receptor, provocando lesiones de mayor tamaño y con aspecto lepromatoso y afección de los nervios periféricos de la zona. A este tipo de lesiones se les denomina leishmaniosis cutánea difusa (Desjeux, 2004).

En el caso de la afección mucocutánea (LMC), se caracteriza por la destrucción parcial o total de tejido mucoso, especialmente de nariz, paladar y faringe, provocando daños irreversibles y con un elevado coste psico-social para el afectado. Esto se produce por la dispersión de los amastigotes desde la zona cutánea hasta las capas mucosas de la región nasofaríngea (Yadav et al., 2023). Las especies de *Leishmania* que habitualmente provocan este tipo de sintomatología son *L. braziliensis,*

L. amazonensis, L. guyanensis y *L. peruviana* en América del Sur y Central, donde es más habitual, pero esporádicamente lo encontramos en países asiáticos, africanos o europeos causada por *L. donovani, L. infantum, L. major, L. tropica* y *L. aethiopica*, aunque con menor frecuencia, siendo más habitual en pacientes inmunodeprimidos (Figura 4) (Desjeux, 2004; World Health Organization & Control of neglected tropical diseases, 2023a; Yadav et al., 2023).

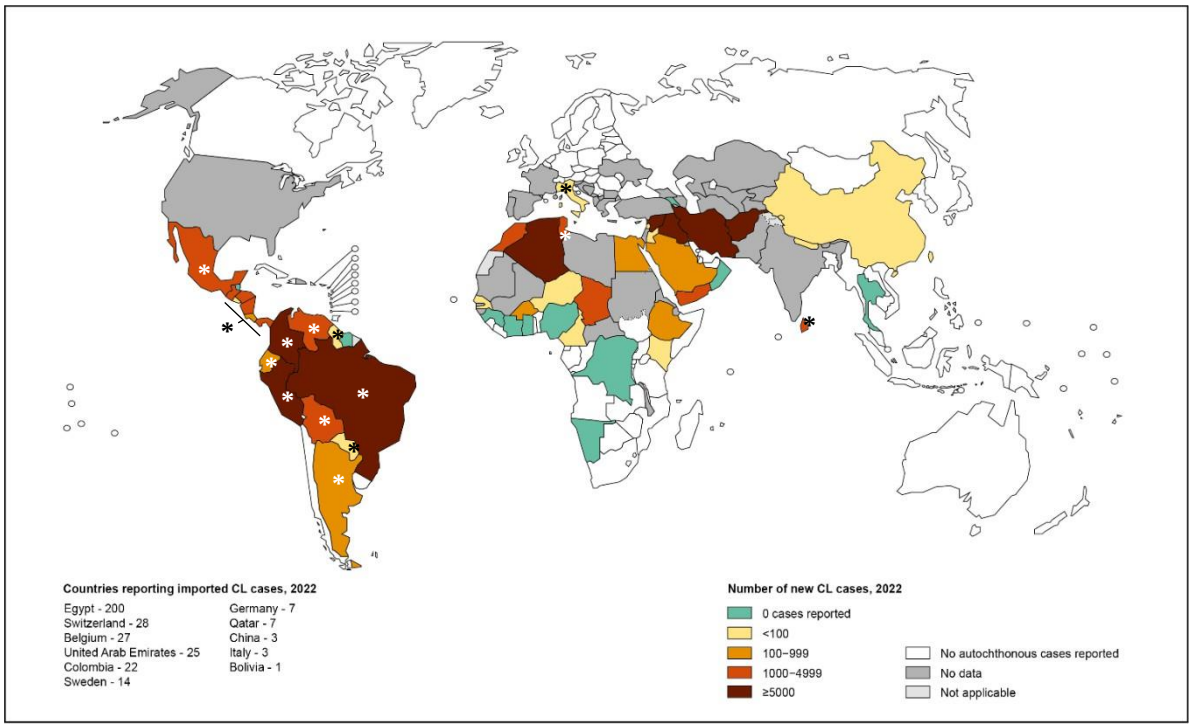


Figura 4. Mapa de distribución de leishmaniosis cutánea y mucocutánea. *: solapamiento de LC y LMC. Adaptación del mapa de la OMS 2023.

La clínica de la LV difiere en gran medida de las anteriores debido a los órganos donde habitualmente se acantona el parásito y a la sintomatología que presenta. En este caso, se observan alteraciones clínicas sistémicas, como fiebre, pérdida de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia severa o linfoadenopatías, debido a la presencia de los amastigotes en ganglios linfáticos, médula espinal, hígado y bazo, principalmente (Desjeux, 2004). En este caso se produce la translocación de los amastigotes desde la zona cutánea de picadura hasta estos órganos, donde provoca un granuloma debido a la parasitación de las células del órgano afectado y la respuesta inflamatoria que lo acompaña (Costa et al., 2023). Se trata de la forma clínica de mayor gravedad, ya que presenta tasas de mortalidad muy elevadas en personas y animales sin tratamiento adecuado. Esta enfermedad está provocada principalmente por *L. infantum* y *L. donovani*, tanto en Asia como en Europa, África y América (Figura 5) (World Health Organization & Control of neglected tropical diseases, 2023b). Además, en ciertas regiones de Asia, especialmente en India y sudeste asiático, los pacientes pueden

desarrollar recidivas con una afectación cutánea, denominada leishmaniosis post Kala-azar, que se caracteriza por la aparición de máculas y pápulas eritematosas en cara, extremidades superiores y tronco. Esto se produce generalmente en pacientes inmunocompetentes curados de LV provocada por *L. donovani* y en pacientes inmunodeprimidos con LV por *L. infantum*, unos 2 o 3 años después de recibir tratamiento frente a la enfermedad (Costa et al., 2023; Desjeux, 2004).

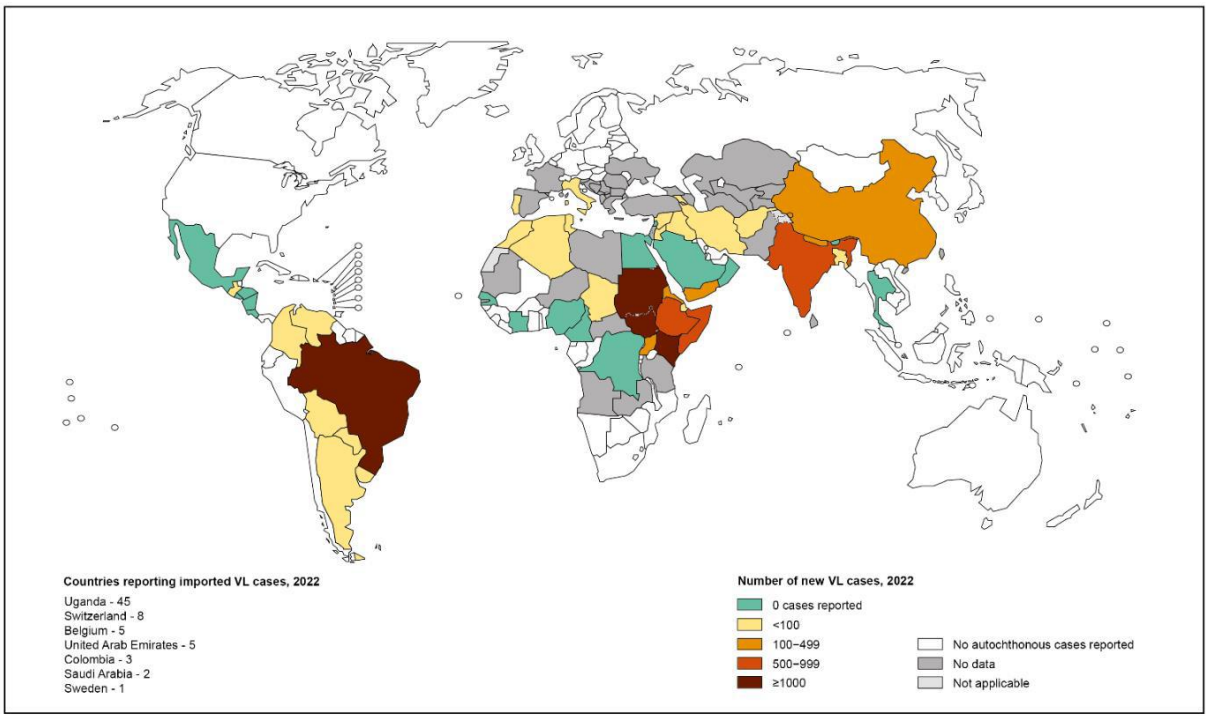


Figura 5. Mapa de distribución de leishmaniosis visceral. Fuente: OMS 2023

Estas manifestaciones clínicas tienen una especial relevancia en personas inmunocomprometidas, como los pacientes VIH-positivo o personas con tratamientos inmunosupresores, que además suelen presentar una sintomatología agravada por diversas co-infecciones (Costa et al., 2023).

Sin embargo, en numerosas ocasiones, las personas parasitadas no presentan sintomatología, y esto dependerá principalmente del estado inmunológico del paciente, (especialmente en zonas endémicas), de la carga parasitaria y de la especie de *Leishmania*. Además, algunas personas son más propensas a desarrollar síntomas que otras (Saidi et al., 2023).

En relación con el diagnóstico, siempre se va a realizar mediante técnicas de laboratorio que pongan de manifiesto la presencia del parásito en el individuo, pero la clínica y los datos epidemiológicos facilitan la sospecha (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015; Morales-Yuste et al., 2022). Las técnicas inmunológicas como la inmunocromatografía (ICT), la inmunofluorescencia indirecta (IFAT por sus siglas en inglés) o el enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA por sus siglas en inglés) son muy

utilizadas para detectar los anticuerpos específicos contra *Leishmania*, utilizando suero como muestra principal y obteniendo los resultados con relativa rapidez. Sin embargo, presentan algunas desventajas como un elevado porcentaje de falsos positivos por la reacción cruzada de otros patógenos o su limitada sensibilidad cuando el grado de parasitación es bajo (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015; Morales-Yuste et al., 2022; Solano-Gallego et al., 2009). En las últimas décadas, la detección mediante PCR es una de las técnicas diagnósticas por excelencia, en especial la PCR en tiempo real (rtPCR), debido a su elevada sensibilidad y especificidad, la rápida obtención de resultados y que permite realizar un seguimiento del paciente y de la eficacia del tratamiento, cuantificando la carga parasitaria mediante la PCR cuantitativa (qPCR) (Solano-Gallego et al., 2009). Para estas técnicas se pueden usar numerosas muestras como sangre, tejido esplénico o hepático, tejido cutáneo, aspirado linfático o muestra de médula ósea, entre otros (Azami-Conesa et al., 2021a; Morales-Yuste et al., 2022). Además de estas técnicas, otras como la microscopía, la histopatología o el cultivo de promastigotes también son metodologías eficaces, aunque actualmente menos frecuentes para diagnóstico (Mathison & Bradley, 2023; Morales-Yuste et al., 2022).

Por último, actualmente el tratamiento contra la leishmaniosis es uno de los mayores retos a los que se enfrentan los investigadores del área, ya que no existe un tratamiento universal, los efectos citotóxicos de los fármacos actuales en los pacientes son graves y la respuesta al tratamiento depende de numerosas variables como la especie de *Leishmania*, el estado inmunológico del paciente o la carga parasitaria (Pradhan et al., 2022). En humanos, el tratamiento de elección para LC y LV son los antimoniales pentavalentes (antimoniato de meglumina o estibogluconato de sodio) por vía intravenosa o intramuscular o la anfotericina B liposomal en el caso de LC y LMC (Pradhan et al., 2022; Wu et al., 2022). Sin embargo, en los últimos años son numerosos los grupos de investigación que trabajan sobre alternativas efectivas y menos tóxicas para estos fármacos, obteniendo resultados esperanzadores (Bouabdallah et al., 2022).

1.1.5. RESERVORIOS ANIMALES DEL GÉNERO *LEISHMANIA*

Las especies zoonóticas de *Leishmania* se han descrito en numerosos animales que pueden actuar como reservorios o actores clave en el mantenimiento del parásito en determinadas áreas, facilitando así su presencia en zonas urbanas, peri-urbanas o rurales. El animal más estudiado y hospedador habitual de 13 especies de *Leishmania* es el perro. La leishmaniosis canina es endémica en todas las zonas anteriormente citadas, tratándose de una de las enfermedades parasitarias más importantes de este animal. Se trata de una enfermedad crónica y grave, que cuando presenta síntomas se caracterizan por una afectación cutánea y/o visceral severa, donde se desarrollan alteraciones como úlceras y dermatitis, inflamación de ganglios linfáticos, afectación ocular y diseminación a bazo,

hígado y médula espinal, junto con pérdida de peso, anemia severa y enfermedad renal crónica en las fases más avanzadas de la parasitosis. En la península ibérica, zona endémica de leishmaniosis, se han declarado más de 1100 casos nuevos en perros entre 2005 y 2020 según datos de la Organización Mundial de Sanidad Animal (WOAH por sus siglas en inglés) (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Maia et al., 2023; Müller et al., 2022).

Sin embargo, no todos los animales donde se ha detectado este parásito pueden ser considerados reservorios, ya que el término reservorio solo se puede aplicar, según la OMS, a aquellos que son lo suficientemente abundantes y viven el suficiente tiempo como para que interactúen con el vector y sean capaces de mantener y desarrollar al parásito en su interior (World Health Organization, 2010). Además, existen otras consideraciones, como que al menos el 20% de los individuos deben estar parasitados, el parásito se tiene que mantener el tiempo necesario en el organismo y estar disponible en la piel o sangre para el vector y, por último, que el parásito presente en el reservorio y en el humano sean de la misma especie. Por tanto, en muchas ocasiones se habla de "potenciales reservorios" más que de reservorios propiamente dichos, debido a la complejidad de estudiar y demostrar todas estas características en un animal (Ashford, 1996; Roque & Jansen, 2014). Sin embargo, en los últimos años cada vez es más frecuente el uso de diversos términos para hacer referencia a los distintos tipos de reservorios u hospedadores de *Leishmania*, como pueden ser "hospedadores de mantenimiento" que son aquellos mamíferos sin síntomas ni signos pero capaces de mantener el parásito en su interior; "hospedadores de ampliación" o "amplifier hosts" en inglés, que son aquellos animales que favorecen la transmisión al vector porque tienen carga parasitaria suficiente como para que los parásitos estén disponibles en sangre y/ o piel; u "hospedadores de punto final", donde los parásitos no se pueden transmitir al vector por diversos motivos (Ashford, 1996).

Aparte de todos estos términos, los animales que actualmente se consideran reservorios principales de *Leishmania* son los siguientes:

1. Perro: se trata del principal reservorio de *L. infantum*, y se han descrito otras 12 especies de *Leishmania* en ellos. No solo se encuentran perros con *Leishmania* en países endémicos, sino también en otras regiones como Estados Unidos o Centroeuropa debido al movimiento de estos animales por diversos países. Se estima que en torno al 50% de los perros infectados son asintomáticos, lo que aumenta la dificultad de control de esta parasitosis (Baneth & Solano-Gallego, 2022; Solano-Gallego et al., 2009; World Health Organization, 2010).
2. Liebre (*Lepus granatensis*) y conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*): reservorios de *L. infantum* en Europa, en concreto en la península ibérica y Grecia (Jiménez et al., 2014; Ortuño et al., 2019; Tsokana et al., 2016).

3. Gran Jerbo (*Rhombomys opimus*): principal reservorio de *L. major* en Asia central. No solo alberga esta especie, sino también otras no zoonóticas como *L. gerbilli* (Bakhshi et al., 2013; World Health Organization, 2010).
4. Jird Gordo (*Psammomys obesus*): es un roedor propio del este de Asia y el norte de África que se alimenta principalmente de cultivos de cereal, estando presente en zonas peri-urbanas y rurales, donde participa como reservorio principal de *L. major* (Ghawar et al., 2011; World Health Organization, 2010).
5. Hiracoideos: mamíferos placentarios involucrados en la transmisión de *L. tropica* en África y Oriente Próximo (Lemma et al., 2009; Pareyn et al., 2019; World Health Organization, 2010).
6. Perezoso de dos dedos (*Choloepus didactylus*): principal reservorio de *L. guyanensis* en Brasil y Guayana Francesa, así como de *L. shawi* en la región amazónica. Estrechamente relacionado con comunidades rurales de esos países (Dedet et al., 1989; Lainson et al., 1989; World Health Organization, 2010).
7. Osos hormiguero amazónico (*Tamandua tetradactyla*): en Brasil es el reservorio más importante de *L. guyanensis* (Caldart et al., 2021; Calvopina et al., 2004; World Health Organization, 2010).

Además de éstas, numerosas especies animales, tanto domésticas como silvestres, han sido descritas como hospedadores del género *Leishmania*, pudiendo actuar como especies centinela, que se definen como aquellos organismos capaces de poner de manifiesto el riesgo existente para la salud humana, animal o ambiental de un determinado patógeno u otro efecto perjudicial. La información obtenida a partir de estas especies centinela resulta de gran utilidad para llevar a cabo medidas preventivas o detectar de manera precoz los posibles brotes de leishmaniosis (Aguirre, 2009). Cabe destacar que muchas de ellas son habituales en zonas urbanas, peri-urbanas o rurales, y por tanto pueden estar en contacto estrecho y cercano con el ser humano, lo que incrementa en gran medida la posibilidad de que presenten papeles relevantes en el mantenimiento del ciclo de vida de este parásito y faciliten su transmisión al ser humano (Alcover et al., 2020, 2021; Ashford, 1996; Azami-Conesa et al., 2021a; Cardoso et al., 2021; Galán-Puchades et al., 2019; Kushwaha et al., 2022; Montaner-Angoiti & Llobat, 2023; Roque & Jansen, 2014; Tsokana et al., 2020; World Health Organization, 2010).

1.2. TRANSMISIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE *LEISHMANIA* SPP.

La leishmaniosis es una enfermedad vectorial, cuya transmisión está determinada por la presencia y capacidad de los vectores para mantener el ciclo en los diferentes escenarios donde se desarrolla (Bates, 2007). Además de éstos, existen numerosos factores que favorecen la presencia de la enfermedad.

1.2.1. FLEBOTOMOS: CARACTERÍSTICAS GENERALES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Los organismos responsables de la mayor parte de las transmisiones de *Leishmania* son los flebotomos, insectos del orden Diptera, suborden Nematocera, familia Psychodidae y subfamilia Phlebotominae (Akhoundi et al., 2016). Estos insectos hematófagos están involucrados en la transmisión, no solo de *Leishmania*, sino también de otros patógenos como virus, bacterias y otros protozoos. Los estudios taxonómicos más recientes describen más de 1000 especies distintas de flebotomos, tanto en el Viejo Mundo, con 538 especies incluidas en 9 géneros, como en el Nuevo Mundo con 488 especies de 23 géneros. De todos ellos, los géneros más habituales implicados en el ciclo de vida de este parásito son *Phlebotomus* y *Sergentomyia* en Europa, África y Asia, y *Lutzomyia* en América (Rodrigues & Galati, 2023).

La importancia del vector radica en la necesidad del parásito en desarrollar ciertas fases de su ciclo en el interior de este animal. Cuando el flebotomo ingiere sangre de un mamífero parasitado, los amastigotes de *Leishmania* alcanzan el sistema digestivo, donde las diferencias en temperatura y pH con el mamífero provocan el cambio morfológico a promastigotes procíclicos, capaces de replicarse. Pasados unos días, la digestión de la sangre del mamífero provoca un nuevo cambio en el parásito, pasando a la forma de promastigote nectomonado, con capacidad de migración, dirigiéndose a la zona anterior del sistema digestivo. Con este movimiento, el parásito evita la salida del vector por medio de la defecación. Una vez en el nuevo destino, los promastigotes sufren un nuevo cambio de forma a promastigotes leptomonados, forma replicativa, que, tras varios ciclos de multiplicación, pasarán a la forma de promastigote metacíclico, que será la fase infectante para el vertebrado (Bates, 2007).

Los flebotomos, por tanto, son parte esencial del ciclo de *Leishmania* y por ello se habla de un proceso de "coevolución" entre ambos organismos. Existen registros fósiles tanto de flebotomos como de los parásitos en las mismas zonas geográficas, evidenciando la relación y la

similar distribución que han presentado a lo largo de millones de años, aunque existen ciertas dudas sobre el término correcto a usar para definir esta relación, ya que distintos autores hablan de co-asociación, interacción y co-especiación (Akhoundi et al., 2016; Esseghir et al., 2000).

Sin embargo, la sola presencia de estos parásitos en el interior de un flebotomo no puede considerarse rasgo característico de su papel como vector de una especie en concreto. Es necesario que se observen una serie de condiciones, como los comportamientos alimenticios del insecto, la capacidad para desarrollar todas las fases del ciclo del parásito en su interior, la habilidad para transmitir a un nuevo vertebrado dicho protozoo y la concurrencia en espacio y tiempo con el hospedador definitivo, entre otras (Akhoundi et al., 2016). Actualmente existen alrededor de 35 especies de flebotomos consideradas vectores probados de *Leishmania*, mientras que hay otras 63 especies de las que se sospecha un papel crucial en la transmisión de más de 40 especies de este parásito. En la zona geográfica denominada "Viejo Mundo" el género *Sergentomyia* se relaciona con la transmisión de especies de *Sauroleishmania*, mientras que el vector más habitual de las especies que afectan a mamíferos sería *Phlebotomus*. Sin embargo, en América este último papel lo realizan las especies de género *Lutzomyia*. Algunas especies de flebotomos están ligadas a una sola especie de *Leishmania*, denominándose vectores restrictivos, como es el caso de *Phlebotomus papatasi* que solo es capaz de transmitir *L. major*. Esto se debe a la presencia de receptores específicos en el sistema digestivo de estos insectos (Akhoundi et al., 2016; Labbé et al., 2023). Por otro lado, se han estudiado algunas especies de flebotomos, que en condiciones controladas de laboratorio son capaces de albergar distintas especies del parásito (vectores permisivos), aunque solo se ha demostrado la infección natural con *L. infantum* a *Luztomyia longipalpis* y *L. tropica* a *P. perniciosus* (Bongiorno et al., 2019; Labbé et al., 2023; Vaselek & Volf, 2019).

Las hembras de estos dípteros son hematófagas, al igual que pasa en otras muchas especies de dípteros, y por tanto van a ser las implicadas en la transmisión, mientras que los machos son de hábitos fitófagos. Las hembras necesitan el aporte nutritivo de la sangre para el correcto desarrollo y maduración de los huevos. La periodicidad diaria con la que las hembras se alimentan depende de la especie y del animal del que se alimenten con mayor frecuencia. En la mayor parte de las especies, los picos de movimiento se producen durante el amanecer y el atardecer, pero aquellos individuos que se encuentren en madrigueras, cuevas o selvas frondosas, pueden alimentarse durante las horas centrales del día. Los lugares de reposo y cría de los flebotomos son variados, siendo los más habituales las madrigueras, huecos de los troncos de los árboles, en el suelo bajo la hojarasca, en termiteros o incluso bajo las piedras en el caso de especies que se encuentren en zonas selváticas o rurales, mientras que en zonas urbanas y periurbanas se pueden encontrar en drenajes de carretera, basuras, agujeros en el suelo o huecos de edificaciones. La selección de los vertebrados dependerá de los niveles de dióxido de carbono, el olor y los hábitos y

tamaño del hospedador. Los flebotomos son capaces de detectar todos estos factores a la hora de seleccionar al animal (Alten et al., 2015; Bray & Hamilton, 2007; Ready, 2013). Las distintas especies de flebotomos, por tanto, se pueden encontrar en diversos nichos ecológicos, teniendo en cuenta su limitado rango de vuelo, de aproximadamente 1,5 km por día (Akhoundi et al., 2016).

Abarcan ecosistemas tan variados como las selvas tropicales en América o las zonas desérticas y semidesérticas en el Viejo Mundo. Además, su amplia distribución mundial abarca desde los 50º de latitud N (sur de Canadá, norte de Francia y Mongolia) hasta los 40º de latitud S, excluyendo Nueva Zelanda y las islas del Pacífico. En cuanto a la altitud, se pueden encontrar desde zonas más bajas que el nivel del mar, como en el área del Mar Muerto, hasta los 3500 msnm en Afganistán (Alten et al., 2015).

En Europa se estima la presencia de alrededor de 10 especies de flebotomos relevantes desde el punto de vista sanitario, siendo la mayoría vectores demostrados de *Leishmania*. En el caso concreto de España, los primeros flebotomos descritos eran de la especie *Phlebotomus ariasi* y datan de 1909, pero el mayor número de estudios sobre estos insectos se realizaron entre los años 1970 y 1990, con un nuevo repunte a partir del brote de leishmaniosis humana en la Comunidad de Madrid en 2009. A lo largo de todos estos años, se han descrito un total de 14 especies diferentes de flebotomos en España, incluidas en los dos géneros habituales en Europa, *Phlebotomus* y *Sergentomyia* (Bravo-Barriga et al., 2022; González et al., 2023).

Las especies más ampliamente distribuidas en España son *P. perniciosus* (en todas las provincias excepto Vizcaya y Gran Canaria) (Figura 6), *P. ariasi* (en todas las provincias excepto A Coruña, Pontevedra, Palencia y Tenerife) (Figura 7) y *S. minuta* (en todas las provincias excepto A Coruña, Palencia y País Vasco) (Bravo-Barriga et al., 2022), siendo las dos primera las consideradas de mayor relevancia en la transmisión de *L. infantum* en el país (Alonso Capitán & Vázquez Torres, 2013; Amela et al., 2012; European Centre for Disease Prevention and Control, 2023).

Además, en los últimos años, otras especies de flebotomos han sufrido una notable expansión en la Península Ibérica, como *P. sergenti,* vector de *L. tropica,* y en menor medida *P. perfiliewi*, recientemente descrito en Mallorca (González et al., 2023), y *P. papatasi,* vectores de *L. tropica, L. infantum* y *L. major* en países cercanos como Marruecos, Argelia, Túnez e Italia, entre otros (Calzolari et al., 2022; ECDC, 2023; Karmaoui, 2020), como se comentará posteriormente con mayor profundidad.

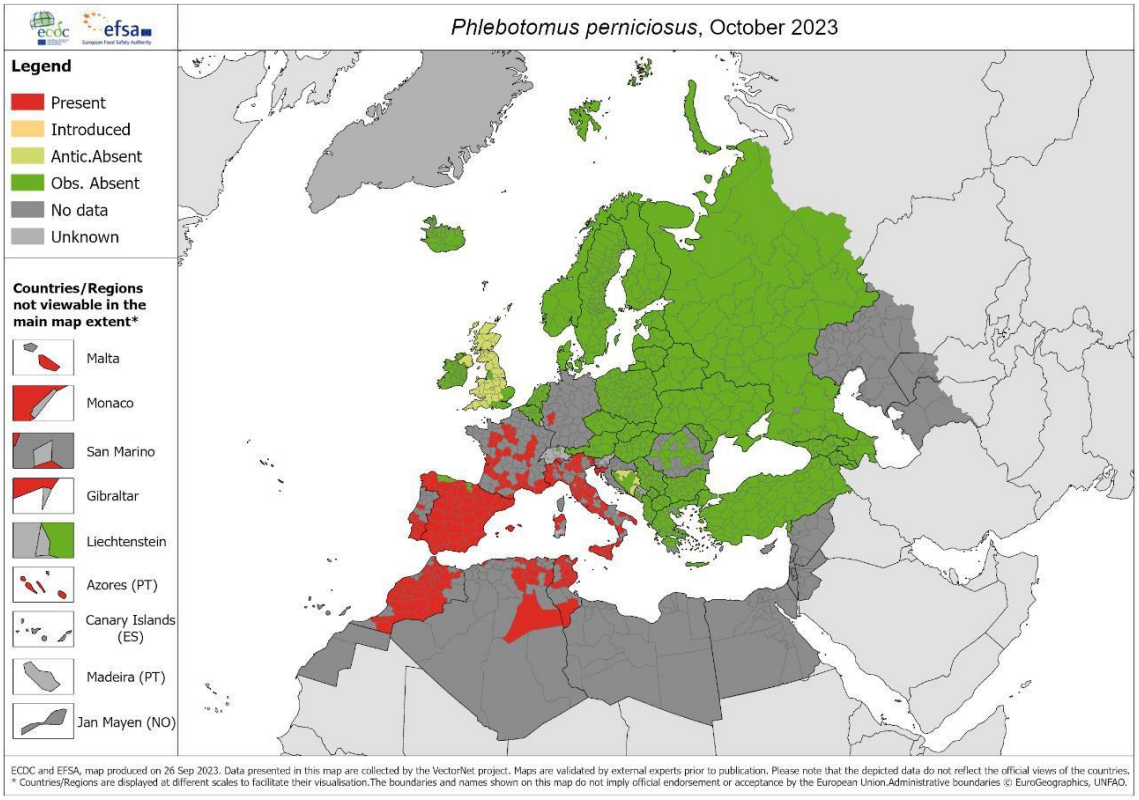


Figura 6. Mapa de distribución de *Phlebotomus perniciosus*. Fuente: ECDC, 2023

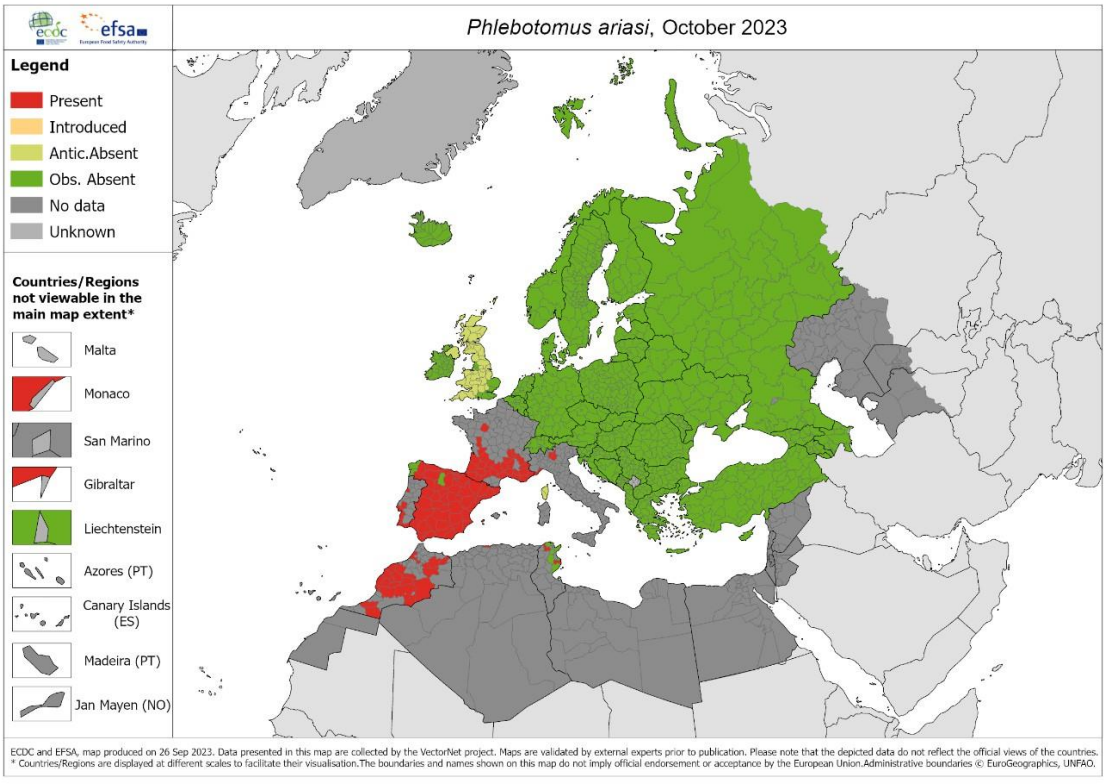


Figura 7. Mapa de distribución de *Phlebotomus ariasi*. Fuente: ECDC, 2023

1.2.2. VÍAS DE TRANSMISIÓN ALTERNATIVAS

A pesar de que la picadura de flebotomo es la vía más habitual de transmisión de *Leishmania*, en los últimos años se han descrito numerosas formas alternativas en las que el parásito puede pasar a un nuevo hospedador vertebrado, incluso sin la necesidad de que intervenga el vector.

Sin embargo, la mayoría de estas vías de transmisión son solo sugeridas por los autores, con la excepción de la vía vertical transplacentaria y la vía sexual, ambas probadas en perros (Boggiatto et al., 2011; Franssen et al., 2022; Naucke & Lorentz, 2012; Silva et al., 2009), en roedores (Martín-Sánchez, Torres-Medina, et al., 2020) y en humanos (Boehme et al., 2006; Mescouto-Borges et al., 2013; Toepp et al., 2019). En todos estos casos, se informa de resultados positivos a PCR, ELISA, IFAT y/ o examinación microscópica en individuos recién nacidos, siendo las madres positivas también al parásito. Estos hallazgos implican un mayor esfuerzo en el control y prevención de la enfermedad, en especial en zonas no endémicas del parásito, donde es posible su llegada por el movimiento global de personas y animales domésticos, ya que muchos de estos informes se dan en países como Alemania o Estados Unidos, que no son considerados endémicos de la parasitosis (Boehme et al., 2006; Boggiatto et al., 2011; Franssen et al., 2022; Naucke & Lorentz, 2012; Toepp et al., 2019).

Otras vías de transmisión sugeridas son:

- Pulgas: Coutinho y Linardi (2007) estudian el papel de estos insectos en la transmisión de *Leishmania* procedente de perros positivos. Observaron promastigotes por microscopía, obtuvieron resultados positivos a PCR e IFAT e inocularon un macerado de estas pulgas a roedores, obteniendo resultados positivos en dichos animales. Sin embargo, remarcan la necesidad de nuevos estudios para demostrar esta nueva vía de transmisión.
- Jejenes: varios autores han reportado la presencia de distintas especies de *Leishmania* en individuos del orden Ceratopogonidae, tanto en Asia como América, sugiriendo un posible papel relevante en la transmisión (Rebêlo et al., 2016; Sunantaraporn et al., 2021).
- Mordedura de perro: esta posible vía de transmisión se ha estudiado en perros, donde la mordedura de otro individuo pudo haber sido la fuente de parasitación en un país no endémico (Naucke et al., 2016).
- Ingesta de flebotomos: sugerida por De Oliveira et al. (2015), que la estudian en murciélagos insectívoros positivos a *Leishmania* en Brasil, los cuales se alimentan habitualmente de estos insectos. Esta vía de transmisión ha sido demostrada en otros tripanosomátidos, como *T. cruzi*, tanto en humanos como en otros animales, aunque es necesario tener en cuenta las numerosas diferencias entre los ciclos de vida de ambos parásitos (Barreto-de-Albuquerque et al., 2015; de Noya & González, 2015).

1.2.3. RELEVANCIA DE *LEISHMANIA* SPP. EN ANIMALES SILVESTRES

Los perros y otros animales domésticos han sido estudiados durante décadas en relación con su posible papel como reservorios y actores importantes en la transmisión y mantenimiento del ciclo de *Leishmania*. Esto se debe a su cercanía al ser humano, y a la posible implicación que pueden tener en brotes de leishmaniosis humana (Alcover et al., 2020; Amela et al., 2012; Cardoso et al., 2021). Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado considerablemente el número de estudios sobre el posible papel de otros animales, más allá de los domésticos, que puedan estar implicados en el ciclo de vida de especies zoonóticas de *Leishmania*. Esto supone modificar numerosas estrategias de control y vigilancia de esta parasitosis, donde la perspectiva "One Health" ("Una Salud" en español) resulta de gran importancia debido a la propia naturaleza de la enfermedad, que implica al ser humano, a diversos vectores y a numerosas especies animales y, donde los cambios ambientales y socioeconómicos suponen factores de riesgo para el desarrollo de brotes epidémicos. Una de las características del género *Leishmania* es su presencia en tres tipos diferentes de ciclos: selvático, doméstico y urbano. En todos ellos se encuentran involucradas especies zoonóticas del parásito, permitiendo así la interacción entre los distintos ciclos (Hong et al., 2020; Quaresma et al., 2011). Estos continuos contactos entre los participantes de los diferentes ciclos de la parasitosis se deben, en parte, al aumento de la exposición de los humanos a zonas con mayor abundancia de animales silvestres, fruto de la fragmentación de los hábitats, el incremento de la urbanización hacia zonas rurales, el aumento de las actividades relacionadas con la agricultura y el ecoturismo, así como al movimiento de los animales silvestres a zonas urbanas y peri-urbanas en busca de alimento. Todos estos escenarios han provocado un aumento de la presencia de patógenos zoonóticos en humanos, entre ellos *Leishmania*, en especial en las zonas endémicas (Aguirre & Tabor, 2008; Roque & Jansen, 2014).

Además, el cambio climático y el movimiento global de personas y animales incrementa el riesgo de expansión de esta parasitosis a nuevas zonas, tradicionalmente consideradas como no endémicas, donde ya se realizan programas de vigilancia de flebotomos, como es el caso de Alemania u otros países del centro de Europa (Oerther et al., 2020). El establecimiento de los vectores, así como la presencia del parásito y de animales (tanto domésticos como silvestres) que puedan mantener el ciclo biológico, son cada vez más estudiados, habiéndose descrito ya varios casos de transmisión autóctona en estos países (Maia et al., 2023).

1.2.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE *LEISHMANIA* SPP. EN ANIMALES SILVESTRES

La presencia de *Leishmania* en animales silvestres es conocida desde hace décadas, siendo larga la lista de especies capaces de albergar al parásito. Además, en los últimos años, ha crecido notablemente el interés de los investigadores por revelar el posible papel de estos animales como potenciales reservorios y como parte importante en brotes humanos registrados. Esto implica un mayor esfuerzo en el control y vigilancia de la parasitosis, ya que muchas de las medidas tomadas en los últimos años pueden verse alteradas por el papel de los animales silvestres en brotes humanos. Todas las especies zoonóticas de *Leishmania* han sido descritas en animales silvestres, en todas las regiones endémicas del parásito (Azami-Conesa et al., 2021a; Cardoso et al., 2021; Millán et al., 2014a).

El orden Carnivora es uno de los más estudiados, probablemente por su relación con los perros, uno de los reservorios más importantes de *Leishmania* spp. Especies como el zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*), el mapache (*Procyon cancrivorous*), el coatí (*Nasua nasua*), el lobo de crin (*Chrysocyon brachyurus*), el ocelote (*Leopardus pardalis*), el jaguar (*Panthera onca*) y el puma (*Puma concolor*), entre otros, han sido descritos como hospedadores de *L. infantum, L. mexicana, L. braziliensis* y *L. amazonensis* en América (Azami-Conesa et al., 2021a; Dahroug et al., 2010; De Almeida Curi et al., 2006; Luppi et al., 2008; Telleria et al., 1999; Voltarelli et al., 2009).

En Europa, Asia y África los carnívoros también han sido ampliamente estudiados, detectando *L. infantum* principalmente en animales como el lobo gris (*Canis lupus*), el gato montés (*Felis silvestris*), la gineta común (*Genetta genetta*), el meloncillo (*Herpestes ichneumon*), la nutria europea (*Lutra lutra*), el lince ibérico (*Lynx pardinus*), la garduña (*Martes foina*), la marta (*Martes martes*), el tejón europeo (*Meles meles*), el visón europeo (*Mustela lutreola*), el turón europeo (*Mustela putorius*), el oso pardo (*Ursus arctos*) o el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), todos ellos estudiados en España y otros países mediterráneos, como Italia o Grecia. Además, se ha descrito *L. infantum* en el chacal común (*Canis aureus*) en países como Georgia, Rumanía, Irán e Israel (Alcover et al., 2020; Babuadze et al., 2014; Battisti et al., 2020; Mitková et al., 2017; Mohebali et al., 2016; Oleaga et al., 2018; Sastre et al., 2008; Sobrino et al., 2008; Talmi-frank et al., 2010).

Otro de los grupos más estudiados es el de los roedores, en parte debido a su próxima relación con entornos urbanos y peri-urbanos pero, además, por el papel como reservorios de alguno de ellos conocido desde hace tiempo. En este grupo encontramos varias especies de jerbo (*Rhombomys opimus, Gerbillus andersoni, G. nanus*), así como el ratón común o doméstico (*Mus musculus*), entre otros, capaces de albergar *L. tropica, L. donovani* y *L. major*, mientras que *L. infantum* ha sido descrito en roedores más ligados al hombre, como la ardilla roja (*Sciurus vulgaris*), la rata gris (*Rattus novergicus*), la rata negra (*R. rattus*), el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*), el ratón

argelino (*M. spretus*) o el ratón común. Todos ellos se han estudiado en Europa principalmente, pero también en África (tanto en países del norte del continente como en Kenia y Etiopía) y Asia, en especial en Oriente Próximo (Alcover et al., 2020; Echchakery et al., 2017; Galán-Puchades et al., 2019; Helhazar et al., 2013; Martín-Sánchez et al., 2020b; Navea- Pérez et al., 2015). En cuanto a América, las especies de *Leishmania* endémicas se han encontrado en roedores como el puercoespín paraguayo enano (*Coendou spinosus*), el capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) o las ratas gris y negra, entre otras muchas especies, en el caso de *L. infantum*, y en más de 45 especies diferentes de roedores en el caso de *L. mexicana*, *L. amazonensis* y las especies del grupo *Leishmania* (*Viannia*) (Azami-Conesa et al., 2021a; De Castro Ferreira et al., 2015; Richini-Pereira et al., 2014).

Más allá de los humanos, otros primates han sido investigados como potenciales reservorios, tanto por encontrarse cerca de poblaciones humanas rurales en América como por su similitud al ser humano. Estos estudios revelan la presencia de *L. braziliensis, L. amazonensis* y *L. mexicana* en primates, como el mono araña (*Ateles paniscus*), el mono aullador negro (*Allouatta caraya*) o el mono capuchino (*Cebus apella*), mientras que *L. infantum* se ha detectado en un mayor número de especies de primates, más de 10 en total (Azami-Conesa et al., 2021a; Malta et al., 2010; Martínez et al., 2020; Voltarelli et al., 2009). En África también se han descrito primates infectados con *L. major*, como gorilas (*Gorilla gorilla*) y babuinos (*Papio cynocephalus anubis*), entre otros, en países como Kenia o Camerún (Gicheru et al., 2009). En el caso de Europa, los animales parasitados se encontraban en zoológicos, donde se observaron signos clínicos compatibles con la parasitosis por *Leishmania* y donde cabe destacar al orangután de Borneo (*Pongo pygmaeus*) infectado con *L. infantum* en España (Miró et al., 2018).

Otro de los órdenes a destacar es el de los quirópteros, especialmente en América, donde la variedad, abundancia y hábitos alimenticios de estos animales, ha levantado mucho interés en cuanto al papel que pueden jugar en el ciclo de *Leishmania*. Más de 12 especies de estos animales han sido descritas como posibles hospedadores de *L. braziliensis* y otras especies de *Leishmania* (*Viannia*). Además, se han descrito 14 especies infectadas con *L. amazonensis*, 13 especies con *L. mexicana* y alrededor de 18 especies diferentes con *L. infantum*. En todos los casos, se analizaron tanto animales de hábitos frugívoros como insectívoros, siendo los menos habituales los hematófagos (Azami-Conesa et al., 2021a; Castro et al., 2020; De Oliveira et al., 2015; Gómez-Hernández et al., 2017; Savani et al., 2010). En el caso del Viejo Mundo, se han descrito algunas especies de murciélagos positivos a *L. tropica* y *L. major* en Etiopía, Kenia y Egipto (Azami-Conesa et al., 2021a; Kassahun et al., 2015), mientras que en Europa solo se ha detectado en España, siendo esta primera descripción parte de la presente Tesis Doctoral (Azami-Conesa et al., 2020).

Tanto en Europa como en el norte de África se han estudiado varias especies de erizo como hospedadores de *L. infantum* y *L. major,* ya que sus hábitos son compatibles con las horas de mayor actividad de los vectores y cada vez es más habitual encontrarlos cerca de comunidades humanas.

Concretamente en España, se han analizado muestras de erizo europeo (*Erinaceus europaeus*) que resultaron positivas a *L. infantum* en diversos tejidos (Alcover et al., 2021; Azami-Conesa et al., 2023; Muñoz-Madrid et al., 2013). En el caso del erizo moruno (*Atelerix algirus*), ha sido estudiado en zonas endémicas de leishmaniosis de Túnez y Argelia, donde se han encontrado evidencias de la presencia de *L. infantum* y *L. major* (Chemkhi et al., 2015; Souguir-Omrani et al., 2018). Esta última especie ha sido descrita también en el erizo del desierto (*Paraechinus aethiopicus*) y en el erizo orejudo (*Hemiechinus auritus*) (Chemkhi et al., 2015; Pourmohammadi & Mohammadi-Azni, 2019; Rouhani et al., 2014; Souguir-Omrani et al., 2018; Tomás-Pérez et al., 2014).

En los últimos años, los lagomorfos han sido uno de los órdenes que más se ha estudiado como potencial reservorio de *Leishmania*, especialmente en Europa, y en concreto en España. Esto se debe al papel fundamental que presentaron estos animales en uno de los últimos brotes relevantes de leishmaniosis humana en Europa, que se inició en julio de 2009 en la Comunidad de Madrid. El incremento significativo de casos en humanos hizo saltar todas las alarmas y, tras el estudio de los datos epidemiológicos de la zona, no se observó un aumento en la prevalencia en perros u otros reservorios conocidos. Tras numerosos estudios, se determinó que los animales que podrían haber participado en la dispersión de estos parásitos por zonas urbanas eran la liebre y el conejo europeo, cuyas poblaciones habían sufrido un incremento muy significativo, debido a la presencia de nuevas zonas de refugio y alimentación por la creación de un parque urbano de grandes dimensiones, así como por la ausencia de depredadores. Este parque, situado entre los municipios de Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes, fue clave para la transmisión del parásito, ya que era una zona donde convivían en espacio y tiempo ser humano, reservorios y vectores (Arce et al., 2017). Tras este brote, numerosos investigadores pusieron el foco en estos animales, realizando varios estudios, incluyendo estudios serológicos, moleculares y de xenodiagnóstico, para finalmente sugerir el papel relevante de los lagomorfos como reservorios de *L. infantum* en España (Jiménez et al., 2014; Molina et al., 2012; Ortega-García et al., 2019).

Sin embargo, no solo en Madrid se ha descrito la presencia de este parásito en liebres. Es el caso de Grecia, donde se ha detectado *L. donovani* en liebres europeas en el 23,5% de los animales estudiados (Tsokana et al., 2016), o el de Colombia, donde *L. braziliensis* ha sido descrito en un ejemplar de conejo brasileño (*Sylvilagus brasiliensis*) (Alexander et al., 1998).

Además, cabe destacar la presencia de *Leishmania* en otros animales en América, como son: didelfimorfos, como las zarigüeyas (*Didelphis* spp.) (*L. baziliensis, L. amazonensis* y *L. infantum*) (Santiago et al., 2007); los osos hormigueros (*Myrmecophaga tridactyla*) y osos meleros (*Tamandua tetradactyla*) del orden Pilosa (*L. mexicana, L. amazonensis* y *L infantum*) (De Araújo et al., 2013; Richini-Pereira et al., 2014); y los armadillos (*Dasypus septemcinctus*) con *L. infantum* (Richini-Pereira et al., 2014). Por último, en Europa también se ha descrito *L. infantum* en una especie de marsupial, el walabí (*Macropus rufogriseus*) (Montoya et al., 2016).

1.2.5. EL PAPEL DE LAS ESPECIES EXÓTICAS INVASORAS EN ESPAÑA

Uno de los mayores riesgos a los que se enfrentan los ecosistemas en la actualidad es la introducción de especies exóticas invasoras. Estas especies afectan directa o indirectamente a las comunidades en las que se establecen de manera permanente. Esta problemática se produce por la competencia por los recursos alimentarios, el refugio y, especialmente, por la dispersión de patógenos, en la que estos animales exóticos pueden tener una gran implicación (Cassan et al., 2018; MAGRAMA, 2013). Sin embargo, a pesar de su transcendencia, son escasos los estudios que tengan como objetivo analizar el posible papel que juegan las especies exóticas invasoras en la epidemiología de las enfermedades zoonóticas. En el caso de España, el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico tiene registradas 13 especies de mamíferos consideradas invasoras en la península ibérica (más 3 especies en las Islas Canarias), de las cuales, únicamente el visón americano (*Neovison vison*) ha sido seleccionado como posible implicado en la transmisión y dispersión de ciertos patógenos (MITECO, 2024). En concreto, esta especie ha sido descrita como hospedador de algunos virus, como Influenza A y SARS-CoV-2 (Gholipour et al., 2017; Mahdy et al., 2020), así como de algunos parásitos, como *Toxoplasma gondii* o varias especies de helmintos no zoonóticos (Martínez-Rondán et al., 2017; Ribas et al., 2018). Además, como parte de la presente Tesis Doctoral, se ha estudiado la presencia de *L. infantum* en esta especie exótica invasora, hallándose prevalencias relativamente elevadas en el este de España (Azami-Conesa et al., 2021b). Fuera de nuestras fronteras, se ha descrito la presencia de *L. infantum* en visones americanos en granjas, en concreto en Grecia, donde, al igual que en España y otros muchos países, se introdujo esta especie para el negocio de la peletería (Filioussis et al., 2018; Tsakmakidis et al., 2019). El problema radica principalmente en que numerosos ejemplares consiguen escapar de estar granjas o son liberados intencionadamente en los ecosistemas, provocando la dispersión de poblaciones, así como el incremento de contacto con animales silvestres, domésticos y humanos, pudiendo jugar papeles relevantes en el mantenimiento y diseminación de parasitosis como leishmaniosis y otras enfermedades zoonóticas (Cassan et al., 2018).

Sin embargo, estos mustélidos no son los únicos estudiados dentro del amplio grupo de los invasores. Los roedores también han sido objeto de análisis, como es el caso del ratón común o doméstico y la rata negra en Senegal, donde se consideran especies foráneas e invasoras. El estudio de Cassan et al. (2018) revela la presencia de *L. major* y *Trypanosoma lewisi* en estos dos roedores, pudiendo ser responsables de la dispersión y transmisión de estos parásitos, el primero claramente zoonótico, y el segundo más ligado a las poblaciones animales, pero del que ya se han reportado algunos casos en humanos.

A pesar de estos estudios, resulta insuficiente la información que se tiene acerca de la implicación de estas especies en sus nuevos hábitats donde, generalmente, llegan de la mano del ser humano, y donde resultan un problema cada vez mayor, tanto ecológica como sanitariamente.

1.2.6. INTRODUCCIÓN DE ESPECIES FORÁNEAS DE *LEISHMANIA* EN ESPAÑA

España es uno de los países considerados endémicos en cuanto a la transmisión y presencia de *L. infantum*. Hasta el año 2024 la única especie de este parásito considerada autóctona es *L. infantum*, cuyos vectores habituales son *P. perniciosus* y *P. ariasi*. La distribución geográfica tanto de vectores como del parásito cada vez es mayor, estando más presente en la región central y mediterránea (especialmente Comunidad Valenciana, Islas Baleares, Murcia y Comunidad de Madrid), pero cuya presencia ya se ha detectado en toda la zona norte del país, que clásicamente se había considerado libre de leishmaniosis (Amela et al., 2012; Centro Nacional de Epidemiología, 2022).

Sin embargo, en los últimos años cada vez es más habitual la detección de especies no autóctonas en personas con leishmaniosis, principalmente debido al movimiento global de personas, que facilita la presencia de estas especies en lugares diferentes a los habituales. En el caso concreto de España, la tasa de incidencia de casos de leishmaniosis humana (tanto autóctona como importada) en 2022 fue de 0.61 por cada 100 000 habitantes, siendo 291 casos autóctonos y 13 importados (Centro Nacional de Epidemiología, 2022). En muchos casos no se llega a determinar la especie concreta de *Leishmania* que está causando la infección, pero cuando se ha realizado dicho diagnóstico, se han detectado especies como *L. braziliensis, L. guyanensis, L. major, L. donovani* y *L. tropica* (Fernández-Arévalo et al., 2022; Pérez-Ayala et al., 2009).

Debido a la presencia de especies distintas a *L. infantum* en los casos importados, cada vez son más los investigadores que plantean la posibilidad de que se produzca una transmisión local de especies no presentes aún en España, en concreto de aquellas que proceden de países cercanos como Marruecos, Argelia o Túnez, donde *L. tropica* y *L. major* son endémicas, y cuyas condiciones climáticas cada vez son más similares a las de España. Estas condiciones facilitan la presencia y dispersión de los vectores principales de dichas especies foráneas en la península ibérica, como es el caso de *P. sergenti* (Figura 8), vector principal de *L. tropica*. *P. sergenti* se ha descrito desde hace varios años en prácticamente todas las provincias del país y su establecimiento y expansión es hoy en día una realidad (Baghad et al., 2020; Barón et al., 2013; Echchakery et al., 2020; European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority., 2019; Fernández-Arévalo et al., 2022; Gijón-Robles et al., 2018; Tomás-Pérez et al., 2014).

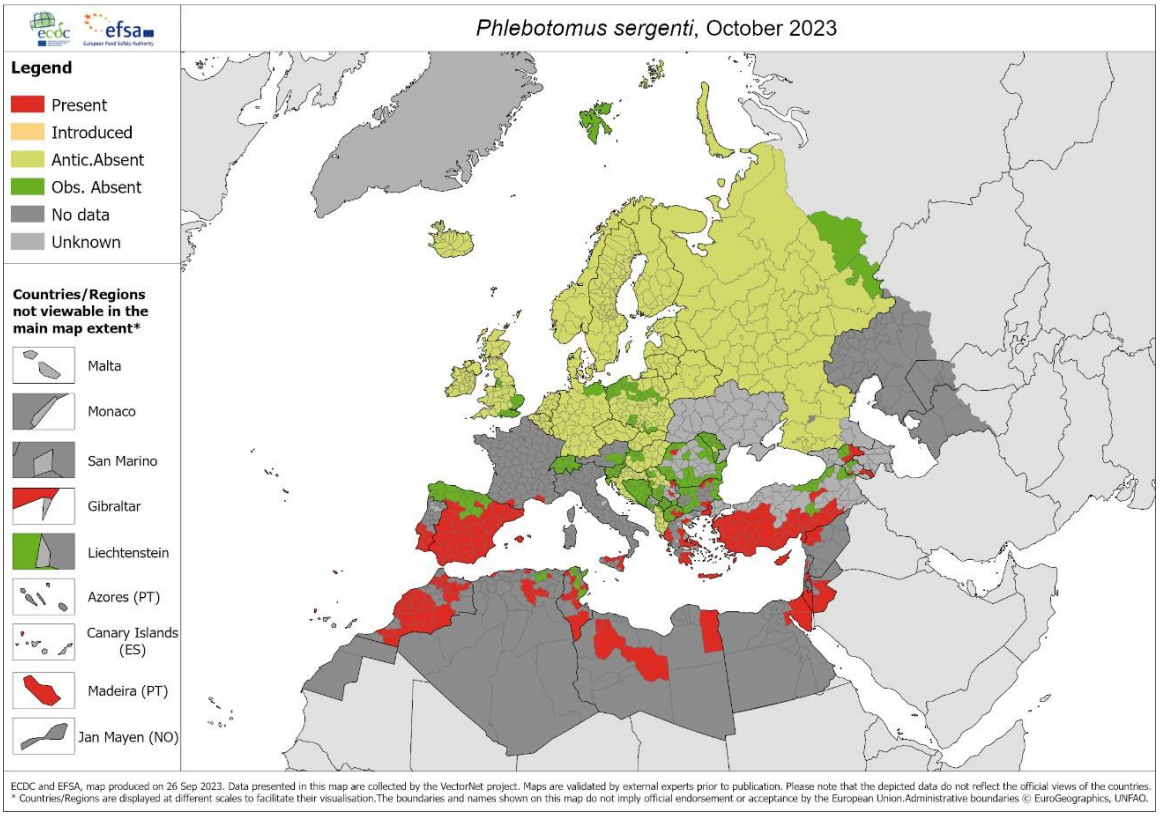


Figura 8. Mapa de distribución de *Phlebotomus sergenti*. Fuente: ECDC, 2023

En cuanto a los motivos de dicha expansión, la mayoría de los autores hablan de los movimientos humanos, de animales y de enseres como uno de los principales motivos de la ampliación de las zonas de distribución, tanto de vectores como de patógenos. Estos movimientos entre países, junto con la modificación de las condiciones climáticas en prácticamente todas las regiones del mundo, hacen más probable la presencia de nuevos patógenos en zonas no endémicas (Dujardin et al., 2008; Maroli et al., 2013; Shaw, 2007).

En el caso concreto de la leishmaniosis, en los últimos 20 años se ha observado un incremento relativamente elevado de los casos a nivel mundial. Esto se debe a numerosos motivos, donde cabe destacar el movimiento de personas debido a los conflictos bélicos, las condiciones socioeconómicas o el turismo masivo. Otros factores son el cambio climático, que provoca un aumento de las zonas de estabilización de los vectores, la falta de recursos económicos disponibles para el desarrollo de nuevos tratamientos, lo que obliga a utilizar fármacos no del todo efectivos y contra los que hay cada vez más resistencias, y, por último, la falta de recursos y medios para frenar de manera efectiva la transmisión mediante una detección precoz de las personas infectadas (Dujardin et al., 2008; Shaw, 2007).

Por todos estos motivos, cada vez se hace más urgente la detección temprana de introducción de especies foráneas de *Leishmania*, así como de sus vectores, en nuevas zonas de expansión, como es

el caso de España, donde la amplia expansión de *P. sergenti* se ha señalado como el principal factor de riesgo para la transmisión de *L. tropica*. Además, se ha identificado en España una línea genética del flebotomo muy común en zonas endémicas de leishmaniosis de Marruecos (Barón et al., 2013; Merino-Espinosa et al., 2016). Esta situación, probablemente, ha facilitado la detección en fauna silvestre de *L. tropica* por primera vez en la península ibérica, y cuya publicación es parte de la presente Tesis Doctoral (Azami-Conesa et al., 2024).

CAPÍTULO 2:
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades zoonóticas han cobrado gran importancia en los últimos años y, en especial, la leishmaniosis ha sido objeto de numerosos estudios desde diversos enfoques. En el caso de esta Tesis Doctoral, se pretende analizar la presencia de este parásito en distintos animales silvestres, que se encuentran en zonas urbanas y/o peri-urbanas, lo que puede aportar información sobre la situación epidemiológica de *Leishmania* más allá de los casos notificados en perros y humanos. En estos últimos, se trata de una enfermedad de declaración obligatoria (EDO), por lo que se realiza un diagnóstico y tratamiento relativamente temprano en España (Centro Nacional de Epidemiología, 2022). En el caso de los perros, el uso de medidas preventivas, como collares antiparasitarios y otros productos, hace que el desarrollo de la leishmaniosis esté cada vez más controlado (Baxarias et al., 2022). Todo ello hace que los brotes de esta enfermedad puedan estar relacionados con otros factores, como la presencia de fauna silvestre en áreas circundantes y/o la dispersión de nuevas especies del parásito en nuestro país. Por tanto, el estudio y análisis de diferentes animales silvestres puede aportar información relevante para el control y detección de futuros brotes de leishmaniosis, así como la detección de la introducción de especies foráneas del parásito.

2.2. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta la justificación anterior, se plantea la siguiente hipótesis:

Los animales silvestres urbanos, peri-urbanos y que habitan cerca de las zonas naturales de recreo endémicas de leishmaniosis podrían estar parasitados con el protozoo zoonótico *L. infantum.* Estos animales podrían actuar como potenciales reservorios de la enfermedad, facilitando la transmisión al hombre y favoreciendo el mantenimiento del parásito en determinadas zonas. Además, estos animales silvestres podrían emplearse como especies centinela de la leishmaniosis y de la situación epidemiológica, teniendo en cuenta su mayor contacto con el vector, principal factor de riesgo para la aparición y persistencia de la enfermedad. Considerando la posible presencia del parásito en los animales silvestres a estudiar, no se ha determinado el órgano en el que éste se encuentra en mayor cantidad para ser detectado, por lo que la hipótesis de partida es que son más fáciles de encontrar en órganos donde teóricamente se acantonan, como la piel o el bazo. Dentro de este planteamiento debemos tener en cuenta que existen técnicas que serán más sensibles, y por tanto capaces de detectar mejor la presencia de *Leishmania*, y técnicas de mayor especificidad que serán de elección a la hora de determinar la especie de *Leishmania*. Ambas son de utilidad en el contexto de la vigilancia epidemiológica.

2.3. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis es analizar la presencia de *Leishmania* en distintas especies de fauna silvestre poco estudiadas en relación con esta parasitosis. En concreto, especies presentes en ambientes urbanos y/o peri-urbanos, donde se evalúa su relevancia como potenciales reservorios y/ o especies centinela para la detección de *Leishmania* en España. Para ello se han especificado los siguientes objetivos concretos:

- **Objetivo 1.** Determinar el papel de mamíferos silvestres en los que aún no se ha estudiado la presencia de *Leishmania*, pero que cumplen las condiciones de longevidad y contacto frecuente con el vector y con el ser humano para poder considerarse potenciales reservorios. Análisis de la utilidad de diferentes órganos diana para la detección del parásito.

- **Objetivo 2.** Estudiar el papel de las especies exóticas invasoras que se encuentran en zonas urbanas, peri-urbanas o de recreo en relación con el posible papel como reservorios o especies centinela de la parasitosis. Análisis de las dianas de PCR más adecuadas para los objetivos planteados.

- **Objetivo 3**. Análisis del posible papel como reservorios o especies centinela de varias especies de mamíferos en los que se ha detectado previamente la presencia de *Leishmania*. Estimación de la prevalencia empleando un mayor número de ejemplares de cada especie.

- **Objetivo 4.** Estudio sobre la utilidad de diversas dianas de PCR en relación con la sensibilidad y la especificad con el fin de confirmar la presencia de especies foráneas de *Leishmania* en la península ibérica.

CAPÍTULO 3:
METODOLOGÍA

3.1. ANIMALES Y DISTRIBUCIÓN

Como se ha mencionado en el apartado de objetivos, en esta Tesis Doctoral se pretende analizar la presencia de *Leishmania* spp. en diferentes especies de animales silvestres, en concreto de mamíferos procedentes de áreas rurales y periurbanas de España, con el fin de aportar luz a su posible papel como reservorios o especies centinela de la enfermedad.

Según datos recientes, España cuenta con 107 especies de mamíferos terrestres, 94 de ellas presentes en la parte continental europea. En estas especies se incluyen ejemplares introducidos, endémicos y autóctonos, siendo estos últimos los más numerosos (Delibes & Palomo, 2007). Por tanto, resulta importante seleccionar de manera adecuada a aquellas especies que cumplan una serie de requisitos para analizar su posible papel en el mantenimiento del ciclo biológico de *Leishmania* es el país. Los criterios de inclusión que se han seguido son los siguientes:

1. Mamíferos silvestres de vida libre que ingresen en centros de recuperación de fauna silvestre o recogidos por las autoridades competentes en caso de accidente o colisión con vehículos.
2. Animales que fallezcan por causas naturales o en centros de fauna por causas ajenas a la investigación.
3. Mamíferos cuyas áreas de distribución se solapen con las zonas de presencia de los flebotomos.
4. Especies que se encuentren cerca de poblaciones urbanas o de áreas recreativas, con posible contacto con humanos y/o animales domésticos.

La selección de los animales viene dada inicialmente por los centros de fauna silvestre con los que se colabora, presentes en distintas Comunidades Autónomas, permitiendo así el acceso a animales con diferentes patrones de distribución, todos ellos de la península ibérica. Los centros de fauna silvestre que han participado en los distintos estudios llevados a cabo dentro de la presente Tesis doctoral se encuentran en la Comunidad de Madrid, la Comunidad Valenciana, Castilla y León y Castilla-La Mancha.

Gran parte de las muestras proceden de GREFA (Grupo para la Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat) ubicado en Majadahonda (Madrid), así como del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre “La Granja de El Saler” en Valencia. Además, se ha contado con la colaboración de Mini-zoo, Guadalajara; “El Chaparrillo” en Ciudad Real y el CERI (Centro de Estudio de Rapaces Ibéricas) en Toledo.

Los animales proceden de tres líneas diferentes de trabajo, dentro de estos centros de fauna. Por un lado, animales que ingresan por trauma o enfermedad en centros de recuperación de fauna y, que por

causas naturales o bajo el control veterinario, fallecen en las instalaciones. Por otro lado, animales que fallecen por accidente con vehículos, y que son trasladados a los centros de fauna correspondientes en cada provincia. Por último, animales que pertenecen al grupo de Especies Exóticas Invasoras, y que según la normativa europea (European Parliament, 2014), nacional (Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, 2013) y provincial (Conselleria Medio Ambiente, Agua, 2009) son objeto de control y erradicación, y que, por tanto, son eutanasiados bajo supervisión veterinaria estricta.

Cabe destacar la limitación que supone el hecho de trabajar con fauna silvestre, en cuanto al número de animales de los que se dispone, debido a que esto dependerá exclusivamente de los que ingresen en dichos centros. No debemos olvidar que en estos estudios siempre va a haber un sesgo de selección difícil de evitar, puesto que no se analizan animales silvestres sanos en libertad, aunque este grupo se encuentra parcialmente representado por los animales atropellados y exóticos invasores.

3.2. RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

La recogida de muestras de los animales se realizó en instalaciones apropiadas, como salas de necropsia o lugares similares, donde primero se observaban los animales en busca de posibles lesiones compatibles con leishmaniosis, y después se determina el peso, sexo y estado de desarrollo del animal, en aquellos casos en los que fuera posible. Una vez obtenidos estos datos, se recogieron muestras de diferentes órganos, entre los que se incluye bazo, piel de oreja, pelo, hígado y coágulo de sangre del corazón, para su posterior análisis. Estas muestras eran identificadas y recogidas en tubos Eppendorf individuales mediante el empleo de cuchillas estériles desechables. En aquellos animales (erizos europeos, principalmente) donde se pretendía obtener información sobre la utilidad de muestras no invasivas, como pelo, hisopo ocular e hisopo oral, se tomaron las muestras bajo anestesia de los animales vivos, procedimiento que fue llevado a cabo por parte de los veterinarios de los centros de recuperación, dentro de las actuaciones de rutina de control y revisión de los animales seleccionados y sin perjudicar la salud del animal. Todas estas muestras fueron conservadas a -20 ºC hasta el momento de su procesado en el laboratorio.

En cuanto a la temporalidad, la recogida de muestras se dio principalmente entre los meses de febrero a octubre, coincidiendo con la época de mayor actividad de los animales y, por tanto, con

un mayor número de ingresos en los centros de fauna. Esta época coincide con los meses en los que los flebotomos son más activos.

3.3. DETECCIÓN DE *LEISHMANIA* spp. MEDIANTE PCR Y SECUENCIACIÓN

Para detección de *Leishmania* e identificación de la especie del parásito en las muestras procedentes de los animales se utilizó como principal técnica la PCR convencional, seguida de secuenciación, empleando diversas dianas de amplificación en cada caso.

Para ello, primero se seleccionaban las muestras a analizar, especialmente los animales objeto de estudio, así como los órganos y tejidos de interés. A continuación, se procedía a la extracción de ADN usando kits comerciales de extracción por columnas (NZY Tissue gDNA Isolation kit, NZYTech, Lisboa, Portugal). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizaban entre 10 y 15 mg de bazo o 20 mg de otros tejidos, con una elución final de ADN de entre 50 µl en buffer de elución para incrementar la concentración de ADN. Las diferentes cantidades de tejido utilizadas vienen dadas por la necesidad de evitar inhibidores enzimáticos presentes en el bazo, que puedan alterar los resultados de la detección de ADN. En todos los casos se utilizaron controles de extracción, siendo cultivo de promastigotes de *L. infantum*, *L. braziliensis* o *L. major* los controles positivos y agua autoclavada el control negativo. El ADN obtenido se conservó a -20 ºC hasta su análisis.

Para el análisis de las muestras por PCR, se utilizaron distintas dianas del ADN, tanto mitocondriales como nucleares, así como PCR anidadas (nPCR) en algunos casos, con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la técnica, y obtener mejores resultados. Para poder realizar la PCR es necesario incluir una pareja de cebadores o primers para cada diana del ADN objeto de estudio, los cuales son pequeños fragmentos de ADN de alrededor de 20 oligonucleótidos o pares de bases (pb), complementarios del extremo de cada hebra del ADN que se pretende detectar, determinando así el tamaño del amplicón obtenido. Para el desarrollo de la PCR se utilizó una enzima ADN polimerasa comercial, procedente de la bacteria *Thermus aquaticus* (Taq), que incluye el tampón necesario para el correcto pH al que trabaja la enzima, los iones divalentes $MgCl_2$, así como los cuatro desoxiribonucleótidos- difosfato (dNTP) necesarios para la formación de las nuevas hebras de ADN, que son adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). El uso de estos complejos comerciales reduce de manera notable la posibilidad de contaminación de la PCR, así como el margen de error que pueda deberse a la manipulación humana de los compuestos a la hora de realizar la técnica. La enzima utilizada en este caso fue HotStart Supreme NZY Taq II 2x (NZYTech, Lisboa, Portugal),

empleando 12,5 µl por cada muestra. A esto se añadían entre 0.4 µl y 1 µl de cada cebador a 10 µM, y entre 2,5 µl y 5 µl de ADN, dependiendo de la diana y el protocolo a seguir, y agua libre de DNAsas hasta un volumen final de 25 µl. Todo el proceso realizado, así como los cebadores y dianas utilizadas, se pueden ver en la Figura 9 y la Tabla 2.

Para poder iniciar la PCR, es necesario un primer paso de activación de la enzima ADN polimerasa, que se consigue a 95 ºC durante 5 minutos ("hot start"), seguido de tres fases repetidas de forma cíclica hasta 40 veces, que incluyen la desnaturalización, anillamiento y elongación de las nuevas moléculas de ADN, y que varían según los cebadores utilizados. Por último, se incluye una etapa de extensión, a 72 ºC durante 10 minutos, antes de finalizar la PCR. En todas la PCRs realizadas se añadieron controles positivos y negativos, siendo, una vez más, ADN procedente de cultivo de promastigotes de *L. infantum*, *L. major* o *L. braziliensis* y agua autoclavada, respectivamente.

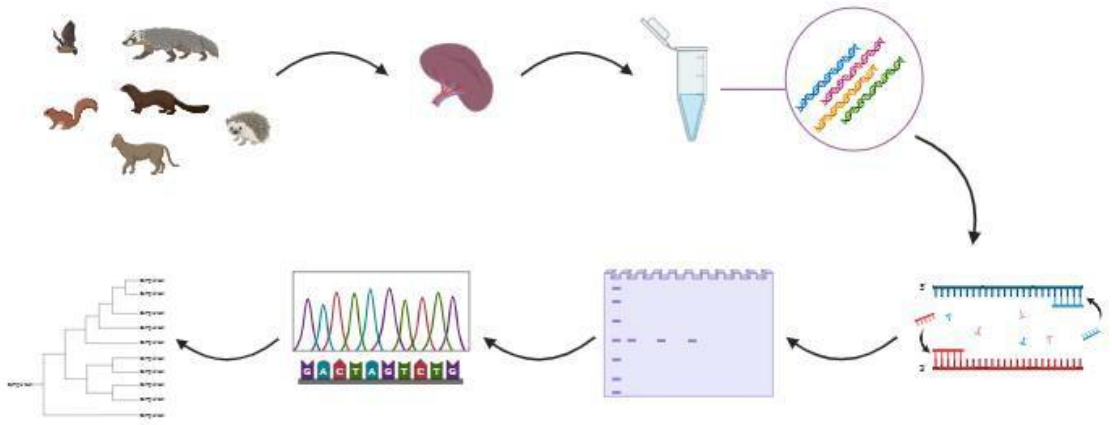


Figura 9. Proceso de recogida, procesado y análisis de las muestras mediante PCR convencional y secuenciación. Diseño propio creado con Biorender.com.

Una vez obtenidos los amplicones, es necesario ponerlos de manifiesto mediante una electroforesis en gel de agarosa para poder ver los resultados obtenidos y, así, seleccionar las muestras que requieren secuenciación. Para ello, se realiza un gel de agarosa, que contiene tampón TAE (Tris, acetato y EDTA) y agarosa del 1%. A este gel de agarosa se le añadió SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para observar los resultados bajo luz ultravioleta (UV), tras la realización de la electroforesis.

Aquellas muestras que presentaron banda compatible con el número de pb esperado, se consideraron positivas y se seleccionaron para la secuenciación.

Tabla 2. Dianas del ADN, oligonucleótidos y condiciones de las PCR.

DIANA ADN	OLIGONUCLEÓTIDOS	TAMAÑO AMPLICÓN	CONDICIONES PCR	REFERENCIA
*SSUrRNA**	Ext R221 5′-GGTTCCTTTCCTGATTTACG-3′	603pb	94 ºC — 30” 60 ºC — 30” 72 ºC — 30”	(Cruz et al., 2002)
	Ext R332 5′-GGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3′			
	Int R223 5′- TCCATCGCAACCTCGGTT-3′	358pb	94 ºC — 30” 65 ºC — 30” 72 ºC — 30”	
	Int R333 5′- AAAGCGGGCGCGGTGCTG-3′			
*ITS1**	Ext LITSR 5′-CTGGATCATTTTCCGATG-3′	320 pb	94 ºC — 30” 53 ºC — 30” 72 ºC — 15”	(Echchakery et al., 2020)
	Ext L5.8S 5′-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3′			
	Int SAC 5′-CATTTTCCGATGATTACACC-3′	280 pb	94 ºC — 30” 57 ºC — 30” 72 ºC — 15”	
	Int VAN2 5′-CGTTCTTCAACGAAATAGG -3′			
*hsp70**	Ext HSP70-F25 5′-GGACGCCGGCACGATTKCT-3′	1286 pb	94 ºC — 40” 61 ºC — 60” 72 ºC — 120”	(Pereira et al., 2020; Van der Auwera et al., 2013)
	Ext HSP70-R1310 5′-CCTGGTTGTTGTTCAGCCACTC-3′			
	Int HSPF 5′-GACAACCGCCTCGTCACGTTC-3′	741 pb	94 ºC — 40” 61 ºC — 60” 72 ºC — 60”	
	Int HSPR 5′-GTCGAACGTCACCTCGATCTGC-3′			
Repeat region	T2 5`-CGGCTTCGCACCATGCGGTG-3`	250 pb	94 ºC — 30” 61 ºC — 30” 72 ºC — 15”	(Piarroux et al., 1995)
	B4 5`-ACATCCCTGCCCACATACGC-3`			

*: nPCR. Ext: cebadores externos. Int: cebadores internos.

En la etapa de secuenciación, se contó con el servicio de la empresa Macrogen (Madrid), así como con el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Genómica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid (Madrid). En Macrogen se utilizó un termociclador “DNA

Engine Tetrad 2 Peltier" (BIO-RAD) y el kit comercial ABI BigDYE® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, MA, USA), siguiendo el protocolo del fabricante. En el caso del Servicio de Secuenciación de la UCM, se utilizó el termociclador 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) y el mismo kit comercial que en Macrogen.

Una vez obtenidas las secuencias, se analizaron manualmente para su alineamiento y comparación con las depositadas en la base de datos GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/), mediante la herramienta BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), gracias al programa MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión X (MEGA X) (Kumar et al., 2018).

Una vez obtenidas las secuencias de aquellas muestras positivas, se depositaron en GenBank para hacerlas accesibles, siempre y cuando tuvieran más de 200 pb. Todas las secuencias están identificadas con un número de acceso, en su correspondiente publicación científica.

En algunos casos, se han utilizado árboles filogenéticos para una mejor comprensión y exposición de los resultados. Para la realización de estas figuras se utilizó el programa MEGA X, donde se incluyeron las secuencias obtenidas en el estudio, así como otras secuencias obtenidas de GenBank de *Leishmania* spp. próximas filogenéticamente y secuencias de *T. cruzi* como referencia de grupo externo. Este análisis filogenético se realizó siguiendo la Estimación de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood Method) basado en el modelo de Tamura- Nei (Tamura & Nei, 1993) y con 2000 repeticiones para que el análisis sea más robusto (Bootstrap).

3.4. MAPAS

En aquellas publicaciones donde se han realizado mapas para indicar la procedencia y/o resultados de los animales analizados, se ha utilizado el programa AutoCad (Autodesk® Inc., San Francisco, CA, USA).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados fueron analizados estadísticamente mediante análisis de factores de riesgo, utilizando la herramienta digital gratuita WinEpi (Work in Epidemiology) (De Blas, 2023). En todos los análisis de estadística descriptiva se asumió un factor de confianza del 95% y se obtuvieron los límites de confianza para el nivel mencionado.

CAPÍTULO 4:
RESULTADOS

4.1. OBJETIVO 1

Determinar el papel de mamíferos silvestres en los que aún no se ha estudiado la presencia de *Leishmania*, pero que cumplen las condiciones de longevidad y contacto frecuente con el vector y con el ser humano para poder considerarse potenciales reservorios. Análisis de la utilidad de diferentes órganos diana para la detección del parásito.

4.1.1. RESUMEN

En los últimos años se ha incrementado de manera notable el número de estudios en los que se analizan distintas especies de animales silvestres como posibles reservorios de *Leishmania* spp. En el caso concreto de España, este incremento está relacionado, entre otros motivos, con el brote de leishmaniosis humana de la Comunidad de Madrid, donde se planteó que los conejos y las liebres pudieron tener un papel fundamental en el aumento de los casos en las personas (Jiménez et al., 2014; Molina et al., 2012). Los principales grupos analizados en España han sido carnívoros y roedores, quizás por su similitud con el perro, en el primer caso, y con su amplia distribución, en el segundo, además de ser dos grupos que incluyen reservorios importantes de leishmaniosis (Alcover et al., 2020; Ortega et al., 2017; Ortuño et al., 2019; Risueño et al., 2018).

Sin embargo, existen numerosas especies de animales silvestres que se encuentran cerca de ambientes urbanos habitualmente, y que podrían albergar al parásito zoonótico. Uno de estos grupos de animales muy abundantes en ambientes urbanos y peri-urbanos son los quirópteros (orden Chiroptera). De hecho, en América del Sur y África se ha estudiado desde hace algunos años a estos mamíferos como actores importantes en el mantenimiento del ciclo silvestre de varias especies de *Leishmania*, entre ellas *L. braziliensis, L. major, L. mexicana* y *L. tropica* (Berzunza-Cruz et al., 2015; Castro et al., 2020; De Castro Ferreira et al., 2017; De Oliveira et al., 2015; Kassahun et al., 2015). A pesar de esto, en Europa no han sido objeto de análisis, con la excepción de la publicación de Millán et al. del año 2014, donde no se encontraron murciélagos positivos en el área de estudio (Millán et al., 2014b).

Teniendo en cuenta que España, al igual que otros países de la cuenca mediterránea, presenta prevalencias relativamente elevadas de animales silvestres infectados por *L. infantum*, resulta interesante analizar a los murciélagos urbanos comunes (*Pipistrellus pipistrellus*) como posibles hospedadores del parásito, ya que el estudio anterior realizado en el país se centró en murciélagos de Schreibers (*Miniopterus schreibersii*), que habitan cuevas alejadas de los núcleos urbanos. Para ello, se analizaron un total de 27 murciélagos procedentes de distintas localidades de la Comunidad de

Madrid, de los cuales se recogieron muestras de bazo, pelo del abdomen y coágulo de sangre de corazón. Estas muestras se analizaron mediante PCR y secuenciación, utilizando la diana *Repeat region* del ADN, que presenta elevada sensibilidad y especificidad para la detección de *L. infantum*. El 59,2% de los animales estudiados (16 de 27) resultaron positivos al menos a una muestra, siendo el bazo el que arrojó un mayor número de positivos (14 de los 16) seguido del pelo (7 de los 16) y del coágulo de sangre (6 de los 16). Estos resultados suponen la primera descripción de *L. infantum* en el murciélago común y la primera descripción en Europa.

4.1.2. ARTÍCULO

Este artículo científico ha sido publicado en una revista con revisión por pares y se encuentra incluido en la presente Tesis Doctoral.

- **Azami-Conesa, I.,** Martínez-Díaz, R.A., González, F., Gómez-Muñoz, M.T. (2020). First detection of *Leishmania infantum* in common urban bats *Pipistrellus pipistrellus* in Europe. Res. Vet. Sci. 132: 172-176. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.06.019.
    - Índice de impacto en 2020 (según el Journal Citation Reports- JCR): 2,534
    - Clasificación en 2020 en el área “Veterinary Sciences”: 21/167 (Q1).

ResearchinVeterinaryScience132(2020)172–176

Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

First detection of *Leishmania infantum* in common urban bats *Pipistrellus pipistrellus* in Europe

Iris Azami-Conesa[a], Rafael A. Martínez-Díaz[b], Fernando González[c], María Teresa Gómez-Muñoz[a,*]

[a] Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Sciences, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain
[b] Department of Preventive Medicine and Public Health, and Microbiology, Faculty of Medicine, University Autónoma of Madrid, Madrid, Spain
[c] GREFA (Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat), Monte del Pilar, Majadahonda, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Bats
Leishmania infantum
Pipistrellus pipistrellus
Zoonosis

ABSTRACT

Leishmania infantum is a protozoan causing leishmaniasis in humans and in dogs, among other animals, which is an endemic disease in the Mediterranean basin. In recent years, the role of wildlife as a possible reservoir of the disease was analyzed and several species of carnivores were reported to have the highest infection rates, with foxes and wolves being the more widely studied species; the role of rabbits and hares as reservoirs of leishmaniasis has also been described. In addition, several studies highlighted the role of bats as suitable hosts for *Leishmania* species (*L. braziliensis*, *L. major*, *L. mexicana*, and *L. tropica*) in South and Central America and Africa, but no *Leishmania* spp. infection in Chiroptera has been reported in Europe. In this study, samples from spleen, hair, and blood were analyzed to detect *L. infantum* DNA in bats from the Community of Madrid (Spain). Infection by *L. infantum* was detected in 59.2% of the bats studied ($n = 16/27$), with the spleen being selected as the site for detection, yielding 14/16 positive results (87.5% sensitivity), followed by hair ($n = 7/16$) and blood ($n = 6/16$). In two animals, samples from all three anatomical sites tested positive (7.4% of the total animals), while in four animals the spleen and hair samples tested positive (14.8%), in one animal the blood and hair samples tested positive (3.7%), and in another animal the blood sample only tested positive (3.7%). This is the first report of *L. infantum* detection in the common urban bat (*Pipistrellus pipistrellus*) in Europe.

1. Introduction

Leishmania spp. is a parasitic protozoan belonging to the order Kinetoplastida, which includes over 20 species that cause a vector-borne disease transmitted by phlebotomine sand flies (order Diptera, family Psychodidae) with a worldwide distribution (Europe, Africa, the Americas and Asia) and an endemic presence in more than 90 countries (Maxfield and Crane, 2019). Three different clinical forms of leismaniasis have been described, namely, cutaneous, mucocutaneous and visceral diseases, with the last one being endemic in the Mediterranean basin. The life cycle includes the amastigote stage, which multiplies in phagocytic mononuclear cells from a wide range of vertebrate animals, including humans, and the promastigote form, which multiplies in the digestive tract of phlebotomines, inoculating them to different vertebrate hosts during female blood meals. The World Health Organization (WHO) estimates one million new cases per year in people around the world, making leishmaniasis one of the most relevant yet neglected parasitic diseases (https://www.who.int/leishmaniasis/en/).

Leishmania infantum is present throughout the entire territory of Spain, including the Balearic and Canary Islands, due to the distribution of vectors and hosts and the suitable climatic conditions. The main vectors are *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi*, which have a wide distribution in the country and therefore any area is susceptible to the infection. Nevertheless, some regions of Spain have a greater prevalence, such as the Valencian Community, the Balearic Islands, Catalonia, Andalusia, and the Community of Madrid. In fact, in the Community of Madrid, there has been an active human leishmaniasis outbreak since 2009, although with a regressive tendency at present (Arce et al., 2017; Suárez Rodríguez et al., 2012).

Dogs are the species most widely studied with regard to leishmaniasis because they can be severely affected by the disease and are considered the main reservoir of *L. infantum*. However, the relevance of other animal species as reservoirs, such as wildlife, has been investigated and the presence of *L. infantum* has been reported in many species, including foxes, wolves, wild cats, bears, rats, hedgehogs, squirrels, jackals, genets, mice, martens, minks, rabbits, and hares (Alcover et al., 2020; Ortega et al., 2017; Ortuño et al., 2019; Risueño et al., 2018) (Table 1). During the aforementioned outbreak in Madrid,

* Corresponding author.
E-mail address: mariateg@ucm.es (M.T. Gómez-Muñoz).

https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.06.019
Received 11 March 2020; Received in revised form 13 June 2020; Accepted 17 June 2020
0034-5288/©2020ElsevierLtd.Allrightsreserved.

Table 1
Wildlife species in which L. *infantum* has been detected in Europe using PCR techniques in different tissues. Prevalence rates depend on the target tissue.

Species	Samples	Prevalence (%)	Reference
Western Mediterranean mouse (*Mus spretus*)	Liver, spleen, skin, heart blood	42.9	Alcover et al., 2020
American mink (*Mustela vison*)	Liver, spleen, skin, heart blood	100	Alcover et al., 2020
Beech marten (*Martes foina*)	Spleen, liver, skin	100	Ortuño et al., 2019
	Liver, spleen, skin, heart blood	50	Alcover et al., 2020
	Skin, organs	14–20	Risueño et al., 2018
Brown bear (*Ursus arctos*)	Spleen, liver, skin	100	Ortuño et al., 2019
European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)	Spleen, liver, skin	47–59	Ortuño et al., 2019
	Spleen, skin, hair	26.2–79.8	Ortega et al., 2017
	Skin, organs	5–26	Risueño et al., 2018
Long-tailed field mouse (*Apodemus sylvaticus*)	Spleen, liver, skin	0–50	Ortuño et al., 2019
	Skin, organs	20	Risueño et al., 2018
Red fox (*Vulpes vulpes*)	Spleen, liver, skin	19–73	Ortuño et al., 2019
	Skin, organs	39–45	Risueño et al., 2018
Common genet (*Genetta genetta*)	Spleen, liver, skin	100	Ortuño et al., 2019
	Skin	100	Risueño et al., 2018
Western European hedgehog (*Erinaceus europaeus*)	Liver, spleen, skin, heart blood	34.4	Alcover et al., 2020
Iberian hare (*Lepus granatensis*)	Spleen, skin, hair	10.1–55.7	Ortega et al., 2017
Brown rat (*Rattus norvegicus*)	Spleen, liver, skin	40–100	Ortuño et al., 2019
Red squirrel (*Sciurus vulgaris*)	Liver, spleen, skin, heart blood	20	Alcover et al., 2020
Wild cat (*Felis silvestris*)	Skin, organs	0–50	Risueño et al., 2018
Grey wolf (*Canis lupus*)	Spleen, liver, skin	50	Ortuño et al., 2019
	Skin	33	Risueño et al., 2018

new reservoirs were described in the area, e.g., hares and rabbits, who were studied after verifying that cases in dogs had not increased (Jiménez et al., 2014; Molina et al., 2012). Thus, a relationship between human cases and wildlife infection was suspected. Today studies on wildlife and its role as a possible reservoir of leishmaniasis have become increasingly important, especially studies that focus on wildlife living close to urban areas and sharing ecological niches with vectors and other hosts.

A few studies from South and Central America and Africa have analyzed the role of bats (order Chiroptera) as potential reservoirs, since they coexist with phlebotomines in the same caves. In Mexico, Berzunza-Cruz et al. (2015) detected infection with *L. mexicana* in approximately 10% of bats out of a total of 420 analyzed, using samples from the spleen, liver, skin, and heart. De Castro Ferreira et al. (2017) investigated bats from Brazil and found the presence of DNA from *L. braziliensis* in 6.4% of the skin samples examined. De Oliveira et al. (2015) analyzed bats from strictly urban areas of Brazil and found a high percentage of samples positive for *Leishmania* spp. from skin and spleen (47.9% and 37.6%, respectively), while Castro et al. (2020) found 4.8% of the skin samples and 54.7% of the liver samples positive for *Leishmania* spp. In Ethiopia, Kassahun et al. (2015) described the presence of *L. major* and *L. tropica* in approximately 5% of spleen samples from captured bats. These data highlight the relevance of these mammals as hosts of *Leishmania* spp. in different parts of the world.

In contrast to the number of studies from South and Central America, in Europe, infection by *Leishmania* spp. in bats has been poorly studied, despite the high number of bat species throughout the continent. The presence of the parasite was investigated in Spain by Millán et al. (2014), who studied 35 Schreiber's bats (*Miniopterus schreibersii*) from caves in Catalonia, but they did not find *L. infantum* DNA in blood samples using polymerase chain reaction (PCR). In the present study, we analyzed the presence of *L. infantum* in common pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*) from Spain.

2. Material and methods

2.1. Animals and origin of the samples

A total of 27 common pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*) from the Community of Madrid and adjoining provinces were analyzed in the study (Fig. 1). All of them were admitted to the wildlife recovery center of GREFA (Group for the Rehabilitation of the Autochthonous Fauna and their Habitat; Madrid, Spain) because of illness or trauma, from September 2018 to December 2019. Samples were obtained only from those animals that died of natural causes or that were humanely euthanized, minimizing pain and distress, according to veterinary criteria, following sickness or injury in cases where recovery or reintroduction into the wild was impossible. Death animals were kept frozen until samples were obtained. Protocols and procedures were supervised by the veterinary staff of GREFA, following the AVMA guidelines for the euthanasia of animals (Leary et al., 2020). The maps in Fig. 1 were elaborated using the free software gvSIG (Version: 2.3.1–2501, gvSIG Association).

Bat species were identified on the basis of morphological measurements: body length, body and tail length, wingspan, ear length, and arm wing length (Schmieder et al., 2015). All the samples belonged to the same species, the common pipistrelle bat.

The distribution of *P. pipistrellus* in Europe is shown in Fig. 1. It is widely distributed across the Mediterranean basin, where *L. infantum* is also present in a large part of the territory. In the Community of Madrid two species of phlebotomines that can act as vectors of the disease are present: *P. perniciosus* and *P. ariasi* (European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority, 2019).

2.2. DNA isolation

Samples from spleen, abdominal hair, and blood clots from the heart were aseptically collected from each animal and frozen at −20 °C until DNA isolation. DNA was extracted using the commercial kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), following the manufacturer's protocol, and including positive and negative controls in each batch. The DNA obtained was stored at −20 °C until use.

2.3. PCR of L. infantum

DNA of *L. infantum* was detected by amplification of a DNA repeat region with conventional PCR using the primers T2 and B4 (Piarroux et al., 1995) and HotStart Taq© Master Mix Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). DNA from the bone marrow of a dog infected with *L. infantum*, kindly supplied by Dr. Luis Cardoso, was used as positive control for the PCR and autoclaved water was used as negative control. The temperature profile was: 15 min at 95 °C for activation of the enzyme, followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C for denaturation, 30 s at 60 °C for annealing, and 1 min at 72 °C for extension, with a final

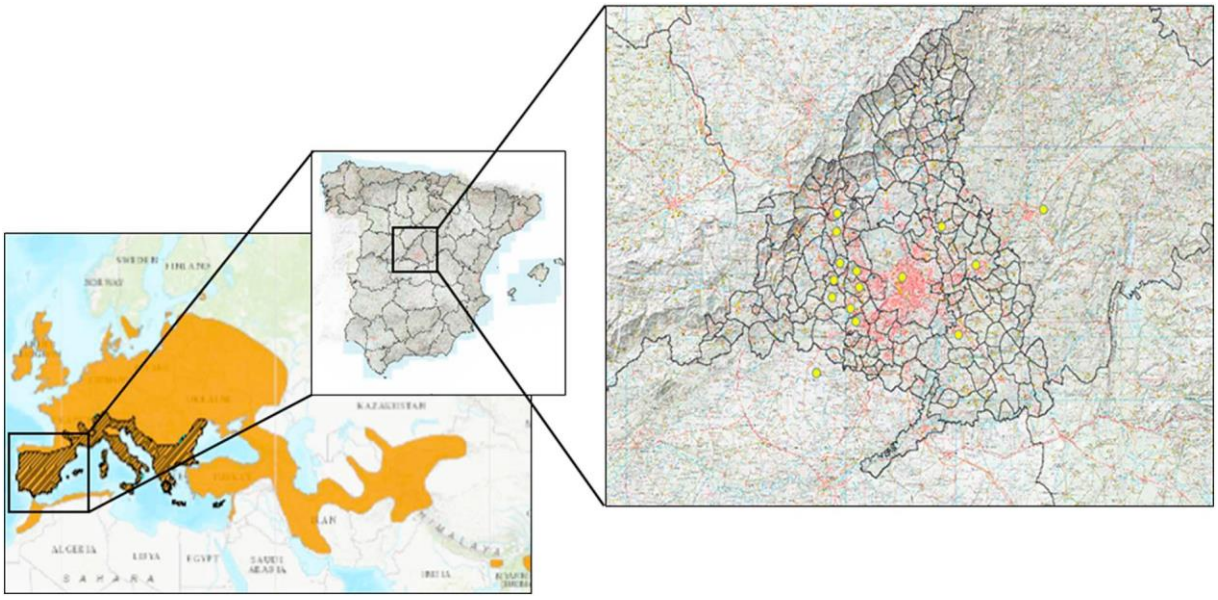


Fig. 1. Distribution of *P. pipistrellus* and *L. infantum* in Europe (modified map from Hutson et al., 2008) and amplified maps of Spain and the Community of Madrid. The black striped area indicates the overlapping of *L. infantum* and *P. pipistrellus*. The origin of the animals is highlighted with yellow dots. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 2
Detection of *L. infantum* in samples from spleen, hair, and blood of bats analyzed in this study. GenBank accession numbers of positive samples are included. Sample 19/0698 displayed a sequence length of less than 200 bp. Sequence ID refers to the sequence with the highest homology to the sequences obtain in the present study.

Sample ID	Spleen	Blood clot	Hair	GenBank acc. no.	% Homology (% query cover)	Sequence ID
18/6515	+	–	–	MN994838	100 (100)	FR796463.1
19/0698	+	–	–	Short sequence	–	–
18/6640	+	–	+	MN994839	98.4 (92)	KU680922.1
18/6843	–	–	–	–	–	–
19/0873	–	–	–	–	–	–
19/3434	–	–	–	–	–	–
19/4545	–	–	–	–	–	–
19/3236	+	–	+	MN994840	100 (100)	FR796463.1
19/3302	+	–	–	MN994846	99.1 (100)	FR796463.1
19/2784	+	+	+	MN994841	100 (100)	KU680931.1
19/2949	–	–	–	–	–	–
19/2386	–	–	–	–	–	–
19/1553	–	–	–	–	–	–
18/6649	+	–	+	MN994842	99.1 (100)	FR796463.1
18/6490	+	+	+	MN994843	99.6 (100)	FR796463.1
18/6311	+	+	–	MN994844	99.6 (100)	FR796463.1
19/5525	–	–	–	–	–	–
19/5839	–	+	+	MN994849	99.6 (100)	FR796463.1
19/5561	–	–	–	–	–	–
19/5760	+	–	+	MN994848	100 (100)	KU680931.1
19/5612	–	–	–	–	–	–
19/5540	+	+	–	MN994847	99.6 (100)	FR796463.1
19/6520	–	+	–	MN994851	99.1 (99)	FR796463.1
19/6370	+	–	–	MN994850	99.6 (100)	FR796463.1
19/6585	+	–	–	MN994852	99.5 (100)	KU680931.1
19/6556	+	–	–	MN994845	98.2 (100)	FR796463.1
19/6445	–	–	–	–	–	–
Total	14/27	6/27	7/27			

extension step at 72 °C for 10 min. The PCR products were visualized under UV light after electrophoresis in 1.5% agarose stained with GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Inc., California, USA).

2.4. Sequencing and alignment

After PCR amplification, positive samples were cleaned using the ExoSAP-IT commercial kit (Exonuclease I/Shrimp Alkaline Phosphatase, Applied Biosystems). Amplicons were sequenced in both directions at the Genomic Unit of the University Complutense of Madrid (Genomic Unit, Faculty of Biological Sciences, UCM, Madrid, Spain) with a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) and employing the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems).

The sequences obtained were aligned using Lasergene SeqMan software version 7.0.0 (DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA) and the chromatograms were manually checked. The consensus sequences were compared with previously published sequences using the BLAST algorithm of NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Consensus sequences were submitted to GenBank for accession number identification.

2.5. Statistical analysis

The sensitivity of the PCR was evaluated according to the Youden approach with a confidence level of 95% and using the online software WinEpi (Working in Epidemiology) (http://www.winepi.net/). Animals with one or more sites testing positive in the PCR were considered as true positives, while animals with no site testing positive in the PCR were considered as true negatives. When more than one site was used to calculate sensitivity, the results were interpreted in parallel.

3. Results

3.1. Origin of the animals

The animals in this study had been sent to the GREFA Centre from different towns in the Community of Madrid, with the exception of two animals that came from Toledo and Guadalajara, two provinces close to Madrid (Fig. 1).

3.2. Detection of L. infantum

In total, 27 bats were analyzed in this study. Samples from spleen, hair, and blood clots were assessed separately (Table 2). Overall, 16 of

the animals tested positive in at least one of the anatomical sites analyzed, yielding a prevalence of *L. infantum* infection of 59.2%. Regarding the animals that tested positive in more than one sample, it is noteworthy that only two of them tested positive in all three anatomical sites: spleen, hair, and blood, i.e., 12.5% of the infected animals (7.4% of the total) (Table 2). The most common anatomical sites in animals with more than one PCR-positive sample were the spleen and hair (n = 4, 25% of infected animals, 14.8% of the total).

3.3. Evaluation of anatomical sites for PCR of L. infantum

The spleen was the site yielding the highest number of positive results (n = 14); however, in two animals that tested positive, the infection was not detected using samples from this anatomical location. These preliminary results indicate a sensitivity of 87.5% (71.3–103.7%, 95% CI) when the spleen is selected as the target site for detection, considering the total number of infected animals.

Samples from hair and blood clots were also useful for the detection of *L. infantum,* since seven samples from hair and six from blood tested positive, indicating a sensitivity of 43.8% (19.4–68.1%, 95% CI) and 37.5% (13.8–61.2%, 95% CI), respectively (i.e., 25.9% and 22.2% of the total, respectively). The highest sensitivity level was obtained when combining two sites in parallel for detection: spleen and blood clot (100%, 95% CI = 100–100%) (Table 3).

The specificity of the PCR was 100% when taking into account the results and the homology of the obtained sequences with other *L. infantum* sequences available at GenBank (vide infra).

3.3.1. Sequences and GenBank submission

The consensus sequences were submitted to GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) under the accession number MN994838–MN994852 (Table 2). The obtained sequences showed 98–100% homology with *L. infantum*.

4. Discussion

In Europe, there are 45 species of Chiroptera living in urban, peri-urban, and rural environments. Among them, *P. pipistrellus* is one of the most widely distributed throughout the continent, maintaining its population at a stable level. The IUCN Red List category of this species is “Least Concern”. It is also the most common species of Chiroptera usually admitted to animal recovery centers across Europe, where more than 2500 bats are admitted each year and finally rescued and rehabilitated in 25 European countries. Their diet is based on insects and they live close to human and domestic animals, occupying cracks, hollows and trees, and breeding in buildings and other human infrastructures (Guardiola and Fernández, 2007; Barova and Streit, 2018). For these reasons, *P. pipistrellus* has a higher risk of infection with *L. infantum* in endemic areas, especially when taking into account its wide distribution, which overlaps with the main vector.

Several species of bats have been analyzed for the presence of *Leishmania* spp. in Central and South America and Africa (Berzunza-Cruz et al., 2015; De Castro Ferreira et al., 2017; De Lima et al., 2008; Kassahun et al., 2015) but the presence of bats infected with *Leishmania* spp. has not been reported in Europe. There is one study on the potential role of bats as hosts of *L. infantum* in Europe (Millán et al., 2014), but the authors analyzed one species only, *Miniopterus schreibersii*, and did not find *Leishmania* DNA. The data obtained in the present study reveal the presence of *L. infantum* in bats originating from the center of Spain, representing the first report in Europe. The fact that Millán et al. (2014) analyzed only peripheral blood could explain the differences found between the two studies, since peripheral blood seems to be less sensitive for detection compared with other anatomical sites, according to our results. Furthermore, the location in the two studies is different: the study by Millán et al., (2014) was carried out in sylvatic areas while our study comprises bats from urban and peri-urban locations, where the infection is common.

The data from the present study showed a higher number of positive results obtained from spleen than from hair and blood samples. The fact that spleen samples are positive in infected animals is not surprising in view of the biological cycle of *L. infantum*, whose amastigote forms remain in the spleen of the host in the chronic phase. By contrast, in recently infected animals, the incidence of parasites in skin or blood is frequent, especially when skin lesions are present. In other studies comparing sites for detection of *L. infantum* infection, the distribution of the parasite varies with the host, with the spleen being the preferred site in dogs and several mammals (Reis et al., 2013; Alcover et al., 2020), while for Leporidae it was hair and skin (Ortega et al., 2017). Some authors explain the difference between positive samples from different anatomical sites as a variation in the immune response of each individual, depending on the progression and distribution of the parasite as well as on the general condition of each animal (Maia and Campino, 2008; Reis et al., 2013). In the present study, the time of infection of the analyzed bats was unknown, but no skin lesions were found on them and, therefore, hair samples were randomly taken from the abdominal area. The absence of macroscopic lesions in bats infected with different species of *Leishmania* is a common finding (Berzunza-Cruz et al., 2015; Kassahun et al., 2015; De Oliveira et al., 2015; De Castro Ferreira et al., 2017). Studies comparing the presence of *Leishmania* spp. in several tissues from bats (Berzunza-Cruz et al., 2015; De Oliveira et al., 2015) reported the presence of DNA also in spleen, even when the species detected were *L. mexicana* and *L. amazonensis*, respectively, which usually cause cutaneous leishmaniosis. Moreover, the mode of *Leishmania* spp. infection in bats is unknown, although the feeding of some *L. infantum* vectors (*P. perniciosus*) on these animals has been demonstrated (Cotteaux-Lautard et al., 2016). However, it has been suggested that insectivorous bats could be infected via the digestive tract, as can occur occasionally in *Trypanosoma cruzi* (De Oliveira et al., 2015; De Rezende et al., 2017), and this might influence the main location of the parasite in the host. More studies are necessary to provide in-depth knowledge of this aspect.

The use of hair samples is a new and promising approach for the diagnosis of *L. infantum,* since Muñoz-Madrid et al. (2013) described it as a noninvasive and effective approach for the detection of the parasite. We also found a high number of positive samples from bat hair (25.9%), and confirm this site as a potential source of samples for diagnosis. Hair samples offer multiple advantages for the detection of *L. infantum* in live animals, although with a lower sensitivity.

The results obtained suggest that European bats are a suitable host of *L. infantum* in Spain and probably other European endemic areas. In recent years, several authors have selected the Community of Madrid as a study area due to the recent outbreak of human leishmaniasis, where rabbits and hares were described as new hosts of *L. infantum* (González et al., 2018; Jiménez et al., 2014; Molina et al., 2012; Ruiz- Fons et al., 2013). According to our findings, bats may also play a role in the life cycle of this parasite in peri-urban environments, and more studies of this mammal are necessary. Another point to be taken into consideration is the influence of *L. infantum* on the health of the infected animals.

Table 3
Evaluation of the anatomical sites for detection of *L. infantum* by PCR. The combinations of results from two anatomical sites interpreted in parallel are also shown. The Youden approach was used to establish the sensitivity at 95% confidence intervals.

Sites for PCR of *L. infantum* samples	Sensitivity	(95% CI)
Spleen	87.5%	71.3%–103.7%
Hair	43.8%	19.4%–68.1%
Blood clot	37.5%	13.8%–61.2%
Spleen + Hair	93.8%	91.9%–105.6%
Spleen + Blood clot	100%	100%–100%
Hair + Blood clot	62.5%	38.8%–86.2%

Being a recently described infection, it should be explored as a possible cause of sickness in endangered species of bats.

5. Conclusion

This is the first report in Europe of *L. infantum* in bats. It is an important finding as this is the most common bat in urban and peri-urban areas of Spain and other European countries. To detect the presence of the parasite in endemic areas, the spleen should be the target site for analysis in dead animals, while hair can be used in live animals. These results will help to establish control measures if more outbreaks of leishmaniasis occur, which can be expected in view of global warming and the potential increase of vector-borne diseases.

Funding

This work has been partially supported by grants from University Complutense of Madrid to established research groups.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the cooperation in the framework of the research group “GEMAS” (Grupo de Estudio de Medicina y Conservación de los Animales Silvestres) with the wildlife veterinary hospital of GREFA (Madrid, Spain).

References

Alcover, M.M., Ribas, A., Guillén, M.C., Berenguer, D., Tomás-Pérez, M., Riera, C., Fisa, R., 2020. Wild mammals as potential silent reservoirs of *Leishmania infantum* in a Mediterranean area. Prev. Vet. Med. 175. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104874.

Arce, A., Estirado, A., Ordobás, M., Moratilla, L., García, N., Pérez, A.M., Gil, E., Aranguez, E., García Puente, E., Martínez, A.M., 2017. Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid: detección e investigación epidemiológica. In: Dirección General de Salud Pública, de S, C. (Eds.), Brote de Leishmaniasis En Fuenlabrada y Otros Municipios de La Comunidad de Madrid. El Papel de Las Liebres y Los Conejos Como Reservorios, Madrid, pp. 105–112.

Barova, S., Streit, A., 2018. Action Plan for the Conservation of all Bat Species in the European Union 2018–2024. Brussels, Belgium.

Berzunza-Cruz, M., Rodríguez-Moreno, Á., Gutiérrez-Granados, G., González-Salazar, C., Stephens, C.R., Hidalgo-Mihart, M., Marina, C.F., Rebollar-Téllez, E.A., Bailón-Martínez, D., Balcells, C.D., Ibarra-Cerdeña, C.N., Sánchez-Cordero, V., Becker, I., 2015. *Leishmania* (*L.*) *mexicana* infected bats in Mexico: novel potential reservoirs. PLoS Negl. Trop. Dis. 9. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003438.

Castro, L.S., Dorval, M.E.C., Matheus, L.M.D., Bednaski, A.V., Facco, G.G., Silveira, M., Santos, C.F., Gontijo, C.M.F., Oliveira, A.P.G., Ferreira, E.C., 2020. *Leishmania* presence in bats in areas endemic for leishmaniasis in central-West Brazil. Int. J. Parasitol. Parasite. Wildl. 11, 261–267. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.02.008.

Cotteaux-Lautard, C., Leparc-goffart, I., Berenger, J.M., Plumet, S., Pages, F., 2016. Phenology and host preferences *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Phlebotominae) in a focus of Toscana virus (TOSV) in south of France. Acta Trop. 153, 64–69. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.020.

De Castro Ferreira, E., Pereira, A.A.S., Silveira, M., Margonari, C., Marcon, G.E.B., de Oliveira França, A., Castro, L.S., Bordignon, M.O., Fischer, E., Tomas, W.M., Dorval, M.E.C., Gontijo, C.M.F., 2017. *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* infecting bats from Pantanal wetland, Brazil: first records for *Platyrrhinus lineatus* and *Artibeus planirostris*. Acta Trop. 172, 217–222. https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2017.05.012.

De Lima, H., Rodríguez, N., Barrios, M.A., Ávila, Á., Cañizales, I., Gutiérrez, S., 2008. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 103, 412–414. https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000400018.

De Oliveira, F.M., Costa, L.H.C., de Barros, T.L., Rauschkolb Katsuda Ito, P.K., Colombo, F.A., de Carvalho, C., Pedro, W.A., Queiroz, L.H., Nunes, C.M., 2015. First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. Acta Trop. 150, 176–181. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.010.

De Rezende, M.B., Herrera, H.M., Carvalho, C.M.E., Carvalho Anjos, E.A., Ramos, C.A.N., De Araújo, F.R., Torres, J.M., De Oliveira, C.E., 2017. Detection of *Leishmania* spp. in bats from an area of Brazil endemic for visceral Leishmaniasis. Transbound. Emerg. Dis. 64, 36–42. https://doi.org/10.1111/tbed.12597.

European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority, 2019. Phlebotomine sandflies maps [WWW Document]. In: Stock. ECDC, URL. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/images/map-Phlebotomus_perniciosus distribution July 2019.png (accessed 3.9.20).

González, E., Molina, R., Jiménez, M., 2018. Rabbit trypanosome detection in *Phlebotomus perniciosus* sand flies from the leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain. Acta Trop. 187, 201–206. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.011.

Guardiola, Á., Fernández, M.P., 2007. *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774). In: Palomo, L.J., Gisbert, J., Blanco, J.C. (Eds.), Atlas y Libro Rojo de Los Mamíferos Terrestres de España. Madrid, pp. 199–202.

Hutson, A., Spitzenberger, F., Aulagnier, S., Coroiu, I., Karataş, A., Juste, J., Paunovic, M., Palmeirim, J., Benda, P., 2008. *Pipistrellus pipistrellus*. IUCN Red List Threat. Species 2008, 8235. https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T17317A6968203.en.

Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., Molina, R., 2014. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? Vet. Parasitol. 202, 296–300. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.027.

Kassahun, A., Sadlova, J., Benda, P., Kostalova, T., Warburg, A., Hailu, A., Baneth, G., Volf, P., Votypka, J., 2015. Natural infection of bats with *Leishmania* in Ethiopia. Acta Trop. 150, 166–170. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.024.

Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Grandin, T., Greenacre, C., Gwaltney-Brant, S., McCrackin, M.A., Meyer, R., Miller, D., Shearer, J., Turner, T., Yanong, R., 2020. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Schaumburg, Illinois.

Maia, C., Campino, L., 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vet. Parasitol. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.028.

Maxfield, L., Crane, J.S., 2019. Leishmaniasis, StatPearls. StatPearls Publishing [WWW Document]. URL. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531456/ (accessed 6.9.20).

Millán, J., López-Roig, M., Cabezón, O., Serra-Cobo, J., 2014. Absence of *Leishmania infantum* in cave bats in an endemic area in Spain. Parasitol. Res. 113, 1993–1995. https://doi.org/10.1007/s00436-014-3855-3.

Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. Vet. Parasitol. 190, 268–271. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006.

Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Parejo, J.C., Serrano, F.J., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez-Nieto, L.C., 2013. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. Acta Trop. 128, 706–709. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.009.

Ortega, M.V., Moreno, I., Domínguez, M., de la Cruz, M.L., Martín, A.B., Rodríguez-Bertos, A., López, R., Navarro, A., González, S., Mazariegos, M., Goyache, J., Domínguez, L., García, N., 2017. Application of a specific quantitative real-time PCR (qPCR) to identify *Leishmania infantum* DNA in spleen, skin and hair samples of wild Leporidae. Vet. Parasitol. 243, 92–99. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.015.

Ortuño, M., Latrofa, M.S., Iborra, M.A., Pérez, P., Bernal, L.J., Risueño, J., Muñoz, C., Bernal, A., Sánchez, P.F., Manuel, L., Giada, S., Carla, A., Cortes, S., Campino, L., Otranto, D., Berriatua, E., 2019. Genetic diversity and phylogenetic relationships between *Leishmania infantum* from dogs, humans and wildlife in south - East Spain. Zoonoses Public Health 0, 1–13. https://doi.org/10.1111/zph.12646.

Piarroux, R., Fontes, M., Perasso, R., Gambarelli, F., Joblet, C., Dumon, H., Quilici, M., 1995. Phylogenetic relationships between Old World *Leishmania* strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. Mol. Biochem. Parasitol. 73, 249–252. https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00097-k.

Reis, L.E.S., Coura-Vital, W., Roatt, B.M., Bouillet, L.É.M., Ker, H.G., Fortes de Brito, R.C., Resende, D. de M., Carneiro, M., Giunchetti, R.C., Marques, M.J., Carneiro, C.M., Reis, A.B., 2013. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. Vet. Parasitol. 197, 498–503. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.006.

Risueño, J., Ortuño, M., Pérez-cutillas, P., Goyena, E., Maia, C., Cortes, S., Campino, L., Bernal, L.J., Muñoz, C., Arcenillas, I., Martínez-rondán, F.J., Gonzálvez, M., Collantes, F., Ortiz, J., Martínez- Carrasco, C., Berriatua, E., 2018. Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain. Vet. Parasitol. 259, 61–67. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.05.012.

Ruiz- Fons, F., Ferroglio, E., Gortázar, C., 2013. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004-2010. Euro Surveill 30, 80–81. https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.006.

Schmieder, D.A., Benítez, H.A., Borissov, I.M., Fruciano, C., 2015. Bat species comparisons based on external morphology : a test of traditional versus geometric morphometric approaches. PLoS One 10, 8–13. https://doi.org/10.5061/dryad.705q4.

Suárez Rodríguez, B., Isidoro Fernández, B., Santos Sanz, S., Sierra Moros, M.J., Molina Moreno, R., Astray Mochales, J., Amela Heras, C., 2012. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. Rev. Esp. Salud Publica 86, 555–564. https://doi.org/10.4321/S1135-57272012000600002.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.2. OBJETIVOS 2

Estudiar el papel de las especies exóticas invasoras que se encuentran en zonas urbanas, peri-urbanas o de recreo en relación con el posible papel como reservorios o especies centinela de la parasitosis. Análisis de las dianas de PCR más adecuadas para los objetivos planteados.

4.2.1. RESUMEN

En Europa existen numerosas especies de organismos considerados exóticos invasores, los cuales son originarios de otras zonas del planeta y en el nuevo hábitat donde se encuentran tienen un efecto negativo sobre el ecosistema. Estos daños dependen del tipo de organismo, así como de la interacción que presenten con el entorno donde se sitúen. Dentro de este grupo de organismos invasores, encontramos numerosas especies de mamíferos que, como en el caso de visón americano (*Neovison vison*), alteran de manera muy significativa las poblaciones de otros animales autóctonos debido a la competencia por los recursos alimenticios y de refugio. Concretamente, los animales que se ven afectados principalmente por la presencia del visón americano son la nutria europea (*Lutra lutra*) y el amenazado visón europeo (*Mustela lutreola*), todos ellos carnívoros acuáticos, que residen en ecosistemas de ribera, provocando la inclusión del visón americano en programas de control y erradicación, según la normativa europea (Bonesi & Palazon, 2007; Sidorovich et al., 1999).

En España la presencia de estos mamíferos en libertad se detectó por primera vez en la década de 1970, siendo hoy en día numerosas las poblaciones de visón americano que se han asentado tanto en el norte como en el este del país (Ruiz-Olmo et al., 1997).

La presencia de estos animales en zonas de recreo naturales, donde las personas y animales domésticos acuden con relativa frecuencia, hace que hayan sido objeto de estudio en cuanto a su relación con patógenos zoonóticos. Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *L. infantum* en estos animales silvestres, como potenciales hospedadores del parásito y actores importantes en el mantenimiento del ciclo silvestre.

Se analizaron muestras de bazo de 22 visones americanos de los cuales 19 resultaron positivos a *L. infantum*. Para este estudio se utilizaron 4 dianas del ADN (*SSUrRNA, ITS1, kDNA* y *Repeat region*), que a su vez fueron comparadas para determinar su sensibilidad. Para ello, se utilizaron dos tipos de muestra: por un lado, un cultivo de promastigotes de *L. infantum* y, por otro, muestra de médula ósea de un perro parasitado. Bajo las condiciones y protocolos seleccionados, las dianas más sensibles resultaron ser *Repeat region* y *kDNA* (con la pareja de cebadores RV1/RV2), seguidos de la PCR anidada de *SSUrRNA*. En cuanto a las muestras de bazo de los visones americanos, la *Repeat region*

resultó la más idónea para detectar la presencia de *L. infantum* (19 positivos), quedando en segunda posición la diana *SSUrRNA* (2 positivos). Esto resultados obtenidos en visones americanos concuerdan con otros estudios realizados con estos animales en Grecia y España (Alcover et al., 2020; Filioussis et al., 2018; Tsakmakidis et al., 2019). La diferencia de resultados obtenidos con respecto al análisis del cultivo y la muestra de perro, en especial con respecto al *kDNA*, podría deberse a la variabilidad que presenta por su naturaleza multicopia, lo que hace que pequeños cambios en la secuencia se traduzcan en una imposibilidad para amplificar el ADN, otorgando una elevada diversidad de resultados en la bibliografía. También podría influir la carga parasitaria de las muestras analizadas, ya que el cultivo, así como la médula ósea de perro, presentaban elevadas cantidades de parásitos, lo cual no es habitual en un animal silvestre.

4.2.2. PONENCIAS

- **Azami- Conesa, I**., Sansano- Maestre, J., Martínez- Díaz, R.A., Gómez- Muñoz, M.T. "American mink (*Neovison vison*) as potential reservoir of *Leishmania infantum*. 69th International Wildlife Disease Association (WDA)/ 14th European Wildlife Disease Association (EWDA) Virtual Conference. Cuenca (España), del 31 de agosto al 2 de septiembre de 2021. Comunicación oral.

4.2.3. ARTÍCULO

- **Azami- Conesa, I**., Sansano- Maestre, J., Martínez- Díaz, R.A., Gómez- Muñoz, M.T. (2021). Invasive Species as Hosts of Zoonotic Infections: The Case of American Mink (*Neovison vison*) and *Leishmania infantum*. *Microorganisms*, 9 (7), 1513. DOI: 10.3390/microorganisms9071531.

  - Índice de impacto en 2021 (según el Journal Citation Reports- JCR): 4,926
  - Clasificación en 2021 en el área "Microbiology": 54/137 (Q2)

microorganisms

MDPI

Article

Invasive Species as Hosts of Zoonotic Infections: The Case of American Mink (*Neovison vison*) and *Leishmania infantum*

Iris Azami-Conesa [1], Jose Sansano-Maestre [2], Rafael Alberto Martínez-Díaz [3,*] and María Teresa Gómez-Muñoz [1,*]

1 Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain; irisazami@ucm.es
2 Department of Animal Health and Public Health, Catholic University of Valencia, 46002 Valencia, Spain; jose.sansano@ucv.es
3 Department of Preventive Medicine and Public Health, and Microbiology, Faculty of Medicine, Autonomous University of Madrid, 28029 Madrid, Spain
* Correspondence: rafael.martinez@uam.es (R.A.M.-D.); mariateg@ucm.es (M.T.G.-M.)

Abstract: *Leishmania infantum* produces an endemic disease in the Mediterranean Basin that affects humans and domestic and wild mammals, which can act as reservoir or minor host. In this study, we analyzed the presence of the parasite in wild American minks, an invasive species in Spain. We screened for *L. infantum* DNA by PCR using five primer pairs: Two targeting kinetoplast DNA (kDNA), and the rest targeting the ITS1 region, the small subunit of ribosomal RNA (SSU) and a repetitive sequence (Repeat region). The detection limit was determined for each method using a strain of *L. infantum* and a bone marrow sample from an infected dog. PCR approaches employing the Repeat region and kDNA (RV1/RV2 primers) showed higher sensitivity than the other PCR methods when control samples were employed. However, only PCR of the Repeat region and nested PCR of SSU (LnSSU) detected the parasite in the samples, while the other three were unable to do so. The majority of the analyzed animals (90.1%) tested positive. American mink may act as an incidental host of the disease for other mammals and should be further investigated, not only for their negative impact on the local fauna, but also as carriers of zoonotic diseases.

Keywords: American mink; ITS; kDNA; leishmaniasis; one health; hosts; Repeat region; SSUrRNA; wild carnivore; zoonosis

check for updates

Citation: Azami-Conesa, I.; Sansano-Maestre, J.; Martínez-Díaz, R.A.; Gómez-Muñoz, M.T. Invasive Species as Hosts of Zoonotic Infections: The Case of American Mink (*Neovison vison*) and *Leishmania infantum*. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1531. https://doi.org/10.3390/microorganisms9071531

Academic Editor: Katharine Carter

Received: 18 May 2021
Accepted: 14 July 2021
Published: 18 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The American mink (*Neovison vison*) is a mustelid native of North America that was introduced in Europe for fur farming. Throughout recent decades, accidental or deliberate escape of mink from farms caused the establishment of stable feral populations. In Spain, the first observation of feral animals was detected at the end of the 1970s, and at present, there are stable populations distributed throughout the northwest and east of the Iberian Peninsula (North of Galicia, Cantabria, and Teruel-Castellón) [1]. The presence of this mammal on the banks of rivers supposes a strong competition for resources with other aquatic carnivores such as the European otter (*Lutra lutra*) or the endangered European mink (*Mustela lutreola*) [2]. For this reason, American mink is included in the European list of invasive species and is subjected to control and eradication programs [3]. Moreover, American mink can act as a carrier of multiple pathogens, including several nematode species [4], protozoans such as *Toxoplasma gondii* [5], and viruses such as influenza A [6] and SARS-CoV-2 [7]. These pose potential health risks for man and also for autochthonous freshwater carnivores in areas where there is an overlap in the distribution with this alien species.

Leishmania infantum is one of the etiological agents of zoonotic leishmaniasis, which is an endemic parasite of the Mediterranean Basin. It is mainly transmitted by phlebotomine

sandfly bites [8], although other ways of transmission, such as sexually or transplacentally, have been proven in dogs, which are considered the main reservoir for human *Leishmania* parasites [9]. The disease has several forms, with the cutaneous (CL) and visceral (VL) forms being the most common. More than one billion people are at risk of leishmaniasis in endemic areas around the world, and 30,000 new cases of VL are estimated every year. In addition to the high number of infected humans and animals that develop the disease, there are also a significant amount of people, dogs, and other animals carrying asymptomatic infections [10].

Occasionally, conditions that favor the expansion of the disease, including spatial and temporal coincidence of humans, vectors, and potential reservoirs appear, lead to human outbreaks. The ideal habitats for vector expansions are warm areas rich in organic material, such as caves or burrows where animals breed, including wild mammals [11].

When leishmaniasis outbreaks appear, an exhaustive search of potential reservoirs and vectors begins, and monitoring activities can reveal new hosts for the parasite. In the case of Spain, an outbreak starting in 2009 in Madrid highlighted the importance of wildlife as potential reservoirs of the disease, specifically lagomorphs [12]. Thenceforward, several studies reported the presence of *Leishmania* in different species of wildlife, including wolfs, foxes, mustelids, bats, hedgehogs, and rodents [13–18]. Despite the number of articles studying the role of wildlife as reservoirs of leishmaniasis, invasive species are not widely studied thus far. Invasive species are relevant not only for other wild species, but also for humans, considering the growing approach to urban places, and the potential role as reservoirs of vector-borne pathogens [19]. The American mink is in the order Carnivora, which includes many species considered as reservoirs and/or hosts suffering the disease. The presence of *L. infantum* has been reported in mink farms in Greece [20,21] and in one wild American mink killed by a car in Spain [17], which suggest its role as a host of *L. infantum*.

In this article, we explored the role of wild communities of American mink as a host of *L. infantum* by PCR using five primer pairs to detect the DNA of the parasite.

2. Materials and Methods

2.1. Samples and Area of Study

Spleen samples from American minks of three different river basins (Mijares, Palancia, and Turia) located in the Valencian Community (Spain) were analyzed (Figure 1). The animals were hunted in the context of a European LIFE project for the conservation of the European mink (LIFE Lutreola Spain, LIFE13 NAT/ES/001171), which include the eradication of the American mink among its objectives, due to the high menace they impose on the autochthonous fauna. The American mink is categorized as an alien invasive species in Europe [22], and European [23], National [24], and regional legislation [25] regulate the control and/or eradication programs of invasive species, such as *Neovison vison*, according to the status in each country. One of the objectives of the LIFE13 NAT/ES/001171 and the Spanish strategy for control and eradication of the American mink is to capture and euthanize as many animals as possible. The total number of animals captured in the Valencian community in previous control programs was 220 in 8–10 years, which means that the present sample approaches the highest number of animals possibly subject to eradication per year, although a precise number of animals in the area is not available. More information on the distribution of stable populations of feral American minks in Spain can be found elsewhere [26]. The animals were captured from February to October 2016 and were humanely euthanized, minimizing pain and distress, according to veterinary or control program criteria (animals which could not be reintroduced into the wild) and following the recommendations of the Spanish strategy for the control and eradication of the American mink. Euthanasia was carried out by the veterinary staff of the wildlife recovery center "La Granja de El Saler" (Valencia, Spain), following the AVMA guidelines for euthanasia of animals [27]. Biometric measurements were taken from each animal and

a necropsy was performed. A sample from the spleen of each animal was kept frozen (−80 °C) until further analysis.

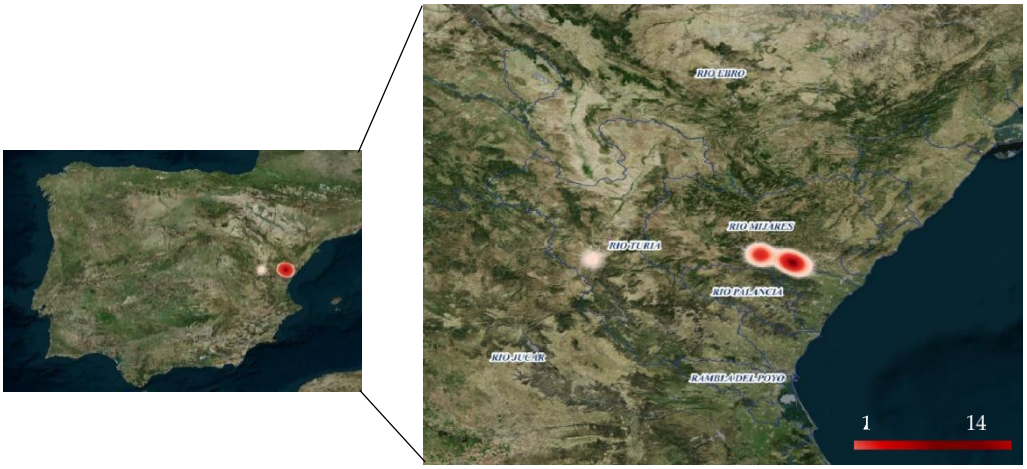


Figure 1. Geographic area where the animals were captured. The color intensity indicates the number of animals captured in each area (see bar on bottom).

2.2. Culture of Leishmania and Determination of the Detection Limit

A culture of the strain "JPC" (MCAN/ES/98/LLM-722) of *L. infantum* generously supplied by Dr. J.M. Requena was used to calculate the detection limit of the PCR protocols employed. The isolate was grown in RPMI containing 15% fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 10 µg/mL of hemin (Acros Organics, Geel, Belgium). In the exponential phase of the culture (day 3 post-inoculation), promastigotes were counted in a Neubauer chamber using 1:1 Trypan blue (4%) in 10% formaldehyde. One million promastigotes were employed for DNA isolation. The parasites were recovered by centrifugation at 800× *g* for 5 min. The sediment was washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) solution, followed by centrifugation in the same manner. We isolated DNA from the pellets obtained using a commercial DNA extraction kit (NZY Tissue gDNA Isolation kit; NZY Tech, Lisbon, Portugal), following the manufacturer's protocol. Bound DNA was eluted in 50 µL of elution buffer and stored at −20 °C until use.

The limit of detection was evaluated by conventional PCR, using four different targets (Repeat region, kDNA, ITS1, and SSUrRNA) by 1/10 serial dilutions, up to 10^{-7}-fold dilutions, using DNA from the *L. infantum* culture. The initial DNA concentration was quantified by spectrophotometry (260/280 nm ratio) using a basic Eppendorf BioSpectrometer® (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), and 20 µg/mL was obtained.

To evaluate the detection limit of each PCR protocol, and also as a positive control of each PCR reaction, DNA from the bone marrow of a dog infected with *L. infantum,* kindly supplied by Prof. Luis Cardoso (UTAD, Vila Real, Portugal), was used. Again, 1/10 serial dilutions, up to 10^{-7}-fold dilutions, were employed to compared the five PCR protocols.

2.3. DNA Isolation of Spleen Samples and PCR

DNA was isolated from 15 mg of spleen tissue, employing the NZY Tissue gDNA Isolation kit, according to the tissue protocol instructions, and later eluted in 50 µL of elution buffer. Positive and negative controls (*L. infantum* culture and water, respectively) were included in each batch.

Each DNA sample was subjected to five protocols of PCR to detect the parasite: Two protocols targeting kinetoplast DNA (kDNA) [28,29], one protocol targeting the ITS region [30], a nested PCR targeting the small subunit of the ribosomal RNA (LnPCR SSU) [31,32], and a protocol amplifying a Repeat region of the parasite [33]. In all cases, the reaction was carried out in 25 µL, employing 12.5 µL of the HotStart Supreme NZY Taq II (NZY Tech, Lisbon, Portugal) and 1 µL of each primer at 10 µM. For all of the protocols,

2.5 µL of DNA was employed, except for the SSU, which used 5 µL of DNA in the first PCR and 5 µL of 1/40 dilution of PCR product in the second PCR. The specific information of each target, including the temperature profiles following adaptation suggested by manufacturer, and primers sequences is available in Table 1. An initial step of 95 °C for 5 min was used to activate the enzyme and a final step of 72 °C for 10 min for elongation was used in all of the protocols. As a positive control for the amplifications, DNA from the abovementioned bone marrow was employed, whilst water was used as a negative control. Electrophoresis was carried out in 1.5% agarose gel stained with GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., San Francisco, CA, USA) and later visualized under UV light. After each PCR protocol, the samples were considered positive if a band of the expected size was observed in the gel.

Table 1. PCR targets and primer pairs and conditions employed in each PCR protocol.

Target	Oligonucleotides (5^t-3^t)	Expected Size of the Amplicon	PCR Conditions	N° Cycles	Reference
Repeat region	T2 (CGGCTTCGCACCATGCGGTG) B4 (ACATCCCTGCCCACATACGC)	250 bp	94 °C—30″ 61 °C—30″ 72 °C—15″	35	[33]
kDNA	RV1 (CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG) RV2 (CCACCTGGCCTATTTTACACCA)	140 bp	94 °C—30″ 62 °C—30″ 72 °C—20″	35	[28]
kDNA	13A (GTGGGGGAGGGGCGTTCT) 13B (ATTTTACACCAACCCCCAGTT)	120 bp	94 °C—30″ 60 °C—30″ 72 °C—20″	30	[29]
ITS1	LITSR (CTGGATCATTTTCCGATG) L5.8S (TGATACCACTTATCGCACTT)	320 bp	94 °C—30″ 53 °C—30″ 72 °C—15″	35	[30]
SSU	Ext R221 (GGTTCCTTTCCTGATTTACG) Ext R332 (GGCCGGTAAAGGCCGAATAG)	603 bp	94 °C—30″ 60 °C—30″ 72 °C—30″	35	[31]
	Int R223 (TCCATCGCAACCTCGGTT) Int R333 (AAAGCGGGCGCGGTGCTG)	358 bp	94 °C—30″ 65 °C—30″ 72 °C—30″	32	[32]

Ext, external primers; Int, internal primers.

2.4. Sequencing

Positive samples were cleaned using an ExoSAP-IT commercial kit (Exonuclease I/Shrimp Alkaline Phosphatase, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Amplicons were sequenced in both directions at the Genomic Unit of Complutense University of Madrid with a 3730 × L DNA analyzer (Applied Biosystems), using a BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems). The obtained sequences were aligned employing Lasergen SeqMan software version 7.0.0 (DNASTAR, Madison, WI, USA) and manually checked. The consensus sequences were compared with available sequences using the BLAST algorithm of NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (accessed on 16 April 2021). Sequences of more than 200 bp were submitted to GenBank for accession number identification.

3. Results

3.1. Samples

In total, samples from 22 captured animals were obtained during the eradication program of invasive species in 2016, in the context of a LIFE project to protect the European mink. Data were recorded from each animal, including date of capture, age, sex, weight, length, and pregnancy in the case of females (Table 2). With the exception of one juvenile male, the rest of the individuals were adults—nine males and 10 females, two of them pregnant. The animals did not show any clinical signs of disease.

Table 2. Data from the animals captured.

Animal ID	Date	Sex	Age	Weight (g)	Length (cm)	River
68/16	8 March 2016	F	Ad	680	57	Mijares
26/16	10 February 2016	F	Ad	689	58	Mijares
192/16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
56/16	1 March 2016	M	Ad	1180	62	Mijares
23/16	10 February 2016	F	Ad	793	58.9	Mijares
197/16	20 October 2016	M	Ad	950	63	Palancia
66/16	6 March 2016	F	Ad	600	51	Mijares
201/16	22 October 2016	F	Ad	660	55.5	Palancia
55/16	1 March 2016	M	Ad	980	56	Mijares
41/16	18 February 2016	M	Ad	901	59	Mijares
62/16	4 March 2016	F	Ad	640	48	Mijares
1023/16	22 May 2016	M	Juv	878	62	Turia
77/16	14 March 2016	M	Ad	1180	64	Mijares
212/16	26 October 2016	F	Ad	650	58	Palancia
213/16	27 October 2016	M	Ad	810	58	Palancia
35/16	16 February 2016	M	Ad	1109	63.5	Mijares
29/16	14 February 2016	F *	Ad	721	57	Mijares
37/16	17 February 2016	M	Ad	1604	69	Mijares
30/16	14 February 2016	F *	Ad	583	52	Mijares
28/16	14 February 2016	F	Ad	637	56	Mijares
331/16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1001/16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d., no data recorded; F, female; Juv, juvenile; M, male; * pregnant.

3.2. PCR Detection Limit

The amount of DNA amplified with each protocol varied among the tested procedures. The most sensitive protocols were PCR of the Repeat region and PCR of kDNA following the protocol of Lachaud et al. [28], while the other three protocols varied between the culture and the bone marrow samples from a positive dog.

3.2.1. PCR Detection Limit Using a Reference Strain

PCRs of the Repeat region and kDNA (RV1/RV2 primers) were able to detect 0.5 promastigotes of *L. infantum* (equivalent to 0.05 pg DNA) (Table 3), while LnPCR of the SSU amplified a minimum of one promastigotes of the parasite (0.1 pg DNA), since a doubled amount of DNA was employed in LnPCR SSU. PCRs of the ITS region and kDNA (13A/13B primers) were able to detect a minimum of five promastigotes (0.5 pg DNA).

Table 3. PCR amplification from the DNA obtained from the *L. infantum* strain using the protocols employed for the detection and identification of *L. infantum*.

		Ten-Fold Dilutions from the Original DNA Sample						
PCR Protocol	**DNA from Culture (20 µg/mL)**	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
PCR Repeat region	+	+	+	+	+	+	−	−
PCR kDNA(RV1/RV2)	+	+	+	+	+	+	−	−
LnPCR SSU	+	+	+	+	+	+	−	−
PCR kDNA(13A/13B)	+	+	+	+	+	−	−	−
PCR ITS1	+	+	+	+	+	−	−	−

PCR of the kDNA region includes primers in parentheses to differentiate the two protocols applied. The first column includes the results with DNA without dilution, and each column adds 1/10 dilution from the original DNA. +, positive; −, negative.

3.2.2. PCR Detection Limit Using DNA from the Bone Marrow of an Infected Dog

When DNA from the bone marrow of a positive dog was employed, PCR of the Repeat region and of kDNA (RV1/RV2 primers) were again the most sensitive protocols, displaying positive results even at a 10^{-4}-fold dilution from the original DNA (Table 4). PCR of the ITS region showed positive results up to 10^{-3} dilution from the original DNA, while PCR of kDNA (13A/13B primers) and LnPCR SSU appeared less sensitive, amplifying only at a maximum of a 10^{-2}-fold dilution from the original DNA sample.

Table 4. PCR amplification from bone marrow DNA of a positive dog using the five PCR protocols employed for detection and identification of *L. infantum*.

		Ten-Fold Dilutions from the Original DNA Sample						
PCR Protocol	**Bone Marrow DNA**	**10^{-1}**	**10^{-2}**	**10^{-3}**	**10^{-4}**	**10^{-5}**	**10^{-6}**	**10^{-7}**
PCR Repeat region	+	+	+	+	+	−	−	−
PCR kDNA(RV1/RV2)	+	+	+	+	+	−	−	−
LnPCR SSU	+	+	+	−	−	−	−	−
PCR kDNA(13A/13B)	+	+	+	−	−	−	−	−
PCR ITS1	+	+	+	+	−	−	−	−

PCR of kDNA region includes primers in parentheses to differentiate the two protocols applied. The first column includes results with DNA without dilution, and each column adds 1/10 dilution from the original DNA. +, positive; −, negative.

3.3. PCR Results from Mink Spleen Samples

In total, 22 samples were analyzed by the five PCR protocols. Only PCR of the Repeat region and LnPCR of SSU rendered positive results, while the other three techniques amplified only the positive controls included in each reaction set. Nineteen samples were positive to PCR of the Repeat region, while only two samples were positive to LnPCR SSU (Table 5).

Table 5. PCR amplification from spleen samples using the five PCR protocols used for the detection and identification of *L. infantum*. PCR of the kDNA region includes primers in parentheses to differentiate the two protocols employed.

Animal ID	**PCR Repeat Region**	**LnPCR SSU**	**PCR kDNA (RV1/RV2)**	**PCR kDNA (13A/13B)**	**PCR ITS**
68/16	+	−	−	−	−
26/16	+	−	−	−	−
192/16	+	−	−	−	−
56/16	+ *	−	−	−	−
23/16	+	−	−	−	−
197/16	+	−	−	−	−
66/16	+	−	−	−	−
201/16	+	−	−	−	−
55/16	+	−	−	−	−
41/16	+	−	−	−	−
62/16	+	−	−	−	−
1023/16	+	−	−	−	−
77/16	+ *	−	−	−	−
212/16	−	−	−	−	−
213/16	+ *	−	−	−	−
35/16	−	−	−	−	−
29/16	+	+	−	−	−
37/16	+	−	−	−	−
30/16	+ *	+	−	−	−
28/16	+	−	−	−	−
331/16	+	−	−	−	−
1001/16	+ *	−	−	−	−

* Weak PCR band and short sequence; +, positive; −, negative.

3.4. Sequences Obtained

The sequences obtained in this study were deposited to GenBank under accession numbers MW972061–MW972074, MW945401, and MW945402. Fourteen 217 bp sequences from the Repeat region were obtained, while four samples displayed shorter sequences and could not be sent to GenBank. The obtained sequences from the Repeat region shared 100% identity with *L. infantum* sequence L42479. The two 322 bp sequences from the SSU region shared 100% identity with *L. infantum* sequence MN757921 from an isolate obtained from a dog.

4. Discussion

Herein, we reported a high percentage of animals infected with the *L. infantum*, but according to the results obtained employing the different PCR targets, and considering the detection limit obtained, it is probable that the animals carried a low amount of parasites in their bodies. All positive animals, except one, were adults, and they had exposure to at least one full season of sandfly activity. An explanation for the low parasite load could be that the context in which minks interact with sandfly populations in the wild limits the amount of bites they are exposed to and, consequently, the dose of promastigotes that each animal received. Alternatively, a transient infection with the parasite could be the cause of the low parasitic load. American minks have a lifespan of 10–12 years in the wild and they live in colonies, which facilitates host–sandfly contact. These characteristics, together with the high percentage of infection, the presence of *Phlebotomus perniciosus* in the area [34], and the identity of *L. infantum* DNA sequence from a dog, support their role as a host of the parasite and they should be considered for future studies.

There are a large number of domestic and wild animals in Europe, besides dogs, in which *L. infantum* has been described [35]. Among them, wild carnivores are the most studied and are considered suitable reservoirs for the parasite, since specific DNA has been detected in many of them, including canids and felids [35]. In addition, several species of mustelids have been reported with *L. infantum* DNA: European mink (*Mustela lutreola*), Eurasian otter (*Lutra lutra*), Beech marten (*Martes foina*), European pine marten (*Martes martes*), domesticated ferrets (*Mustela putorius furo*), European badger (*Meles meles*), and European polecat (*Mustela putorius*) [13,15,21,36–38].

A high rate of infection has been reported in farmed American minks (21.4% of analyzed animals), even at a young age [20]. In another study, 20% of older farmed minks were positive by serology [21], although lower values were found employing PCR of the ITS region (2.1%). Stress and conditions of the farms (temperature and humidity) may favor the development and expansion of sandflies. Whereas the presence of *L. infantum* seems to be frequent in farmed animals, only one study detected a wild American mink infected with the parasite by qPCR in Spain, but the authors only tested one animal [17]. In all cases, parasites were detected in samples from the spleen, and from the liver of one of them. Apart from this single report of DNA in one exemplar, the role of American minks as incidental host of the parasite in wild communities has not been investigated until the present article.

In this study, we employed different targets to detect the parasite as a multi-locus approach to assess the identity of the obtained sequences in comparison to other *L. infantum* sequences from humans and animals. Unfortunately, only two of them displayed positive results. Under our conditions, PCR using the Repeat region and kDNA (RV1 and RV2 primers) were the most sensitive techniques for detecting DNA from parasite cultures and from the bone marrow of a positive dog. Using DNA samples from cultures, in which the amount of parasites is easier to quantify, LnPCR of SSU showed the same limit of sensitivity. When employing PCR from the ITS region, a lower percentage of positivity has also been reported by other authors, including lower values of PCR detection in farmed American minks compared to serology [21]. Lower sensitivity employing the ITS target was also found in samples from hedgehogs, while PCR using kDNA and the Repeat region as the target displayed better results, with 6/24 samples positives by PCR kDNA and 13/26

positives by nested PCR of the Repeat region [39]. In agreement with the results obtained by Chemkhi et al. [39], PCR amplifying the Repeat region was the best approach to detect positivity in the samples employed in the present study.

Other authors have also compared different protocols of amplification, with the results varying between studies, although most of them agreed in pointing out that kDNA is a high-sensitivity target due to its multicopy nature, with thousands of maxicircles and several dozen of minicircles [40]. Lachaud et al. [28] compared six different primer pairs to detect the parasite in the blood of infected animals, three of them targeting nuclear DNA, and three more targeting mitochondrial DNA (kinetoplast minicircles). The authors found a limit of detection of 0.2 parasites per reaction tube employing the primers targeting the Repeat region, the same value reported in the present study using the same primer pairs. However, primers 13A and 13B were more sensitive, according to the authors, while in the present study, they were the less sensitive. A strong inhibition was reported by Lachaud et al. [28] when employing PCR of the Repeat region, but in the present study, no signs of inhibition were found, a fact that could be due to differences between the polymerases or DNA extraction protocols applied in each study. When tissues are employed to isolate DNA, results may vary from one individual to another, or even between animal species [28]. Indeed, spleen samples are full of inhibitors or competitors, and manufacturers recommend in many protocols to reduce the amount of tissue processed.

Albuquerque et al. [41] compared four PCR methods, two targeting kinetoplast DNA and two targeting nuclear DNA. According to the authors, LnPCR SSU was able to detect a higher number of samples from the bone marrow of clinically and sub-clinically infected animals, while ITS1 showed the lowest level of detection. The two mentioned PCR protocols were also employed in the present study, and the obtained results agree with those reported by the authors. None of the primer pairs targeting kDNA were employed in the present study and no comparison between results could be done.

Concerning the negative results obtained with both kDNA PCR protocols, they might be due to negligible changes in DNA sequences being enough to avoid amplification from the samples, since they represent a more variable target than the Repeat region or the SSU region [40]. Indeed, several approaches using kDNA as targets can be found in the literature and the results varied with the primers employed. De Oliveira et al. [42] reported that primers 13A and 13B had the worst performance among four primers derived from kDNA sequences, and employing DNA from parasite strains, a fact that is in agreement with the results obtained in the present study.

Taking into account our results, we believe that the employment of more than one target to detect *L. infantum* is necessary. Different sensitivities of the protocols, or minimal differences in the DNA sequences of more variable targets, could interfere with the results.

This is the first report of the detection of *L. infantum* in communities of wild American minks. The American mink is an invasive species that menaces the European mink, but it also harbors several zoonotic infections [4–7,17,20,21]. For these reasons, they could be used as sentinel species to monitor the epidemiological status of zoonotic pathogens in the regions where they inhabit, and this approach could be included in European mink conservation programs.

Author Contributions: Conceptualization, M.T.G.-M., I.A.-C., J.S.-M., and R.A.M.-D.; methodology, I.A.-C. and M.T.G.-M.; software, I.A.-C.; validation, M.T.G.-M., J.S.-M., R.A.M.-D., and I.A.-C.; formal analysis, I.A.-C. and J.S.-M.; investigation, J.S.-M. and M.T.G.-M.; resources, J.S.-M. and M.T.G.-M.; data curation, I.A.-C. and M.T.G.-M.; writing—original draft preparation, M.T.G.-M., J.S.-M., and I.A.-C.; writing—review and editing M.T.G.-M. and R.A.M.-D.; visualization, M.T.G.-M. and R.A.M.-D.; supervision, M.T.G.-M. and R.A.M.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by grants from University Complutense of Madrid to established research groups (GR29/20 UCM).

Data Availability Statement: Sequence data are available from GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) under accession numbers MW972061–MW972074, MW945401 and MW945402.

Acknowledgments: Cooperation in sample recovery of the staff of the wildlife recovery center "La Granja de El Saler" (Valencia) is acknowledged.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ruíz-Olmo, J.; Palazón, S.; Bueno, F.; Bravo, C.; Munilla, I.; Romero, R. Distribution, status and colonization of the American mink (*Mustela vison*) in Spain. *J. Wildl. Res.* **1997**, *2*, 30–36.
2. Sidorovich, V.; Kruuk, H.; Macdonald, D.W. Body size, and interactions between European and American mink (*Mustela lutreola* and *M. vison*) in Eastern Europe. *J. Zool.* **1999**, *248*, 521–527. [CrossRef]
3. Bonesi, L.; Palazón, S. The American mink in Europe: Status, impacts, and control. *Biol. Conserv.* **2007**, *134*, 470–483. [CrossRef]
4. Martínez-Rondán, F.J.; Ruiz de Ybáñez, M.R.; Tizzani, P.; López-Beceiro, A.M.; Fidalgo, L.E.; Martínez-Carrasco, C. The American mink (*Neovison vison*) is a competent host for native European parasites. *Vet. Parasitol.* **2017**, *247*, 93–99. [CrossRef] [PubMed]
5. Ribas, M.P.; Almería, S.; Fernández-Aguilar, X.; De Pedro, G.; Lizarraga, P.; Alarcia-Alejos, O.; Molina-López, R.; Obón, E.; Gholipour, H.; Temiño, C.; et al. Tracking *Toxoplasma gondii* in freshwater ecosystems: Interaction with the invasive American mink (*Neovison vison*) in Spain. *Parasitol. Res.* **2018**, *117*, 2275–2281. [CrossRef]
6. Gholipour, H.; Busquets, N.; Fernández-Aguilar, X.; Sánchez, A.; Ribas, M.P.; De Pedro, G.; Lizarraga, P.; Alarcia-Alejos, O.; Temiño, C.; Cabezón, O. Influenza A Virus surveillance in the invasive American Mink (*Neovison vison*) from freshwater ecosystems, Northern Spain. *Zoonoses Public Health* **2017**, *64*, 363–369. [CrossRef]
7. Mahdy, M.A.A.; Younis, W.; Ewaida, Z. An overview of SARS-CoV-2 and animal infection. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 596391. [CrossRef]
8. Molina, R.; Jiménez, M.; García-Martínez, J.; San Martín, J.V.; Carrillo, E.; Sánchez, C.; Moreno, J.; Alves, F.; Alvar, J. Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniasis in a Mediterranean context. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008253. [CrossRef] [PubMed]
9. Naucke, T.J.; Lorentz, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit. Vectors* **2012**, *5*, 1–5. [CrossRef]
10. WHO. Health Topics: Leishmaniasis. Available online: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis (accessed on 4 April 2021).
11. Millán, J.; Ferroglio, E.; Solano-Gallego, L. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 2005–2014. [CrossRef]
12. Molina, R.; Jiménez, M.I.; Cruz, I.; Iriso, A.; Martín- Martín, I.; Sevillano, O.; Melero, S.; Bernal, J. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol.* **2012**, *190*, 268–271. [CrossRef] [PubMed]
13. Muñoz-Madrid, R.; Belinchón-Lorenzo, S.; Iniesta, V.; Fernández-Cotrina, J.; Parejo, J.C.; Serrano, F.J.; Monroy, I.; Baz, V.; Gómez-Luque, A.; Gómez-Nieto, L.C. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: Application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop.* **2013**, *128*, 706–709. [CrossRef] [PubMed]
14. Risueño, J.; Ortuño, M.; Pérez-cutillas, P.; Goyena, E.; Maia, C.; Cortes, S.; Campino, L.; Bernal, L.J.; Muñoz, C.; Arcenillas, I.; et al. Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain. *Vet. Parasitol.* **2018**, *259*, 61–67. [CrossRef] [PubMed]
15. Oleaga, A.; Zanet, S.; Espí, A.; Pegoraro de Macedo, M.R.; Gortázar, C.; Ferroglio, E. *Leishmania* in wolves in northern Spain: A spreading zoonosis evidenced by wildlife sanitary surveillance. *Vet. Parasitol.* **2018**, *255*, 26–31. [CrossRef]
16. Azami-Conesa, I.; Martínez-Díaz, R.A.; González, F.; Gómez-Muñoz, M.T. First detection of *Leishmania infantum* in common urban bats *Pipistrellus pipistrellus* in Europe. *Res. Vet. Sci.* **2020**, *132*, 172–176. [CrossRef]
17. Alcover, M.M.; Ribas, A.; Guillén, M.C.; Berenguer, D.; Tomás-Pérez, M.; Riera, C.; Fisa, R. Wild mammals as potential silent reservoirs of *Leishmania infantum* in a Mediterranean area. *Prev. Vet. Med.* **2020**, *175*, 104874. [CrossRef]
18. Navea-Pérez, H.M.; Díaz- Sáez, V.; Corpas-López, V.; Merino-Espinosa, G.; Morillas-Márquez, F.; Martín- Sánchez, J. *Leishmania infantum* in wild rodents: Reservoirs or just irrelevant incidental hosts? *Parasitol. Res.* **2015**, *114*, 2363–2370. [CrossRef]
19. Otranto, D.; Iatta, R.; Baneth, G.; Cavalera, M.A.; Bianco, A.; Parisi, A.; Dantas-Torres, F.; Colella, V.; McMillan-Cole, A.C.; Chomel, B. High prevalence of vector-borne pathogens in domestic and wild carnivores in Iraq. *Acta Trop.* **2019**, *197*, 105058. [CrossRef] [PubMed]
20. Filioussis, G.; Petridou, E.; Papadopoulos, D.; Karavanis, E.; Morgan, E.; Billinis, C.; Papadopoulos, E. Hemorrhagic pneumonia in neonatal minks in Greece concomitant with *Leismania infantum* detection. *Pol. J. Vet. Sci.* **2018**, *21*, 405–408. [CrossRef] [PubMed]
21. Tsakmakidis, I.; Pavlou, C.; Tamvakis, A.; Papadopoulos, T.; Christodoulou, V.; Angelopoulou, K.; Dovas, C.I.; Antoniou, M.; Anastasakis, C.; Diakou, A. *Leishmania* infection in lagomorphs and minks in Greece. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* **2019**, *16*, 100279. [CrossRef]
22. Regulation (EU) 2016/1141 of 13 July 2016 Adopting a List of Invasive Alien Species of Union Concern Pursuant to Regulation (EU) No 1143/2014 of the European Parliament and of the Council. Available online: http://data.europa.eu/eli/reg/2014/1143/oj (accessed on 25 June 2021).

23. Regulation (EU) No 1143/2014 of the European Parliament and of the Council of 22 October 2014 on the Prevention and Management of the Introduction and Spread of Invasive Alien Species. Available online: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2016/1141/oj (accessed on 25 June 2021).
24. Real Decreto 630/2013, de 2 de Agosto, por el que se Regula el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras. Available online: https://www.boe.es/eli/es/rd/2013/08/02/630 (accessed on 25 June 2021).
25. Decreto 213/2009, de 20 de Noviembre, del Consell, por el que se Aprueban Medidas Para el Control de Especies Exóticas Invasoras en la Comunitat Valenciana. [2009/13396]. Available online: https://dogv.gva.es/es/eli/es-vc/d/2009/11/20/213/ (accessed on 25 June 2021).
26. Melero, Y.; Santulli, G.; Gómez, A.; Gosàlbez, J.; Rodríguez-Refojos, C.; Palazón, S. Morphological variation of introduced species: The case of American mink (*Neovison vison*) in Spain. *Mamm. Biol.* **2012**, *77*, 345–350. [CrossRef]
27. Leary, S.; Underwood, W.; Anthony, R.; Cartner, S.; Grandin, T.; Greenacre, C.; Gwaltney-Brant, S.; McCrackin, M.A.; Meyer, R.; Miller, D.; et al. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition*; AVMA: Schaumburg, IL, USA, 2020; pp. 97–99.
28. Lachaud, L.; Marchergui-Hammami, S.; Chabbert, E.; Dereure, J.; Dedet, J.P.; Bastien, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 210–215. [CrossRef]
29. Souguir-Omrani, H.; Chemkhi, J.; Fathallah-Mili, A.; Saadi-BenAoun, Y.; BelHadjAli, I.; Guizani, I.; Guerbouj, S. *Paraechinus aethiopicus* (Ehrenberg 1832) and *Atelerix algirus* (Lereboullet 1842) hedgehogs: Possible reservoirs of endemic leishmaniases in Tunisia. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *63*, 219–230. [CrossRef] [PubMed]
30. El Tai, N.O.; Osman, O.F.; El Fari, M.; Presber, W.; Schönian, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (sscp) and sequencing. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *94*, 1–5. [CrossRef]
31. Van Eys, G.J.; Schoone, G.J.; Kroon, N.C.; Ebeling, S.B. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1992**, *51*, 133–142. [CrossRef] [PubMed]
32. Cruz, I.; Cañavate, C.; Rubio, J.M.; Morales, M.A.; Chicharro, C.; Laguna, F.; Jiménez- Mejías, M.; Sirera, G.; Videla, S.; Alvar, J. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in coinfected patients with human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96*, 185–189. [CrossRef]
33. Piarroux, R.; Fontes, M.; Perasso, R.; Gambarelli, F.; Joblet, C.; Dumon, H.; Quilici, M. Phylogenetic relationships between Old World *Leishmania* strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1995**, *73*, 249–252. [CrossRef]
34. European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Mosquito Maps. Stockholm: ECDC. 2018. Available online: https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/phlebotomine-maps (accessed on 5 July 2021).
35. Cardoso, L.; Schallig, H.; Persichetti, M.F.; Pennisi, M.G. New Epidemiological Aspects of Animal Leishmaniosis in Europe: The Role of Vertebrate Hosts Other than Dogs. *Pathogens* **2021**, *10*, 307. [CrossRef] [PubMed]
36. Battisti, E.; Zanet, S.; Khalili, S.; Trisciuoglio, A.; Hertel, B.; Ferroglio, E. Molecular Survey on Vector-Borne Pathogens in Alpine Wild Carnivorans. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 1–9. [CrossRef]
37. Del Río, L.; Chitimia, L.; Cubas, A.; Victoriano, I.; De la Rúa, P.; Gerrikagoitia, X.; Barral, M.; Muñoz-García, C.I.; Goyena, E.; García- Martínez, D.; et al. Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. *Prev. Vet. Med.* **2014**, *113*, 430–435. [CrossRef]
38. Giner, J.; Villanueva-Saz, S.; Alcover, M.M.; Riera, C.; Fisa, R.; Basurco, A.; Yzuel, A.; Trotta, M.; Fani, C.; Verde, M.T.; et al. Treatment and follow-up of a domestic ferret (*Mustela putorius furo*) with clinical leishmaniosis caused by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* **2020**, *21*, 100423. [CrossRef]
39. Chemkhi, J.; Souguir, H.; BelHadjAli, I.; Driss, M.; Guizani, I.; Guerbouj, S. Natural infection of Algerian hedgehog, *Atelerix algirus* (Lereboullet 1842) with *Leishmania* parasites in Tunisia. *Acta Trop.* **2015**, *150*, 42–51. [CrossRef] [PubMed]
40. Akhoundi, M.; Downing, T.; Votýpka, J.; Kuhls, K.; Lukeš, J.; Cannet, A.; Ravel, C.; Marty, P.; Delaunay, P.; Kasbari, M.; et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol. Aspects Med.* **2017**, *57*, 1–29. [CrossRef] [PubMed]
41. Albuquerque, A.; Campino, L.; Cardoso, L.; Cortes, S. Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 57. [CrossRef] [PubMed]
42. De Oliveira, D.M.; Lonardoni, M.V.C.; Theodoro, U.; Silveira, T.G.V. Comparison of different primes for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Infect. Dis.* **2011**, *15*, 204–210. [CrossRef]

4.3. OBJETIVOS 3

Análisis del posible papel como reservorios o especies centinela de varias especies de mamíferos en los que se ha detectado previamente la presencia de *Leishmania*. Estimación de la prevalencia empleando un mayor número de ejemplares de cada especie.

4.3.1. RESUMEN

El carácter zoonótico y la forma de transmisión a través de los flebotomos de *L. infantum* hace que podamos encontrar al parásito en el organismo de un gran número de especies. Los animales más estudiados tradicionalmente han sido los domésticos, en especial el perro, en el que son ampliamente conocidos los efectos que tiene esta parasitosis sobre su organismo. Sin embargo, el papel que pueden desarrollar los animales silvestres como centinelas respecto a la presencia de *Leishmania* spp. en diferentes ambientes no es tan claro, aunque a día de hoy, son cada vez más numerosos los estudios que centran sus esfuerzos en ampliar ese conocimiento.

En Europa, varias especies de carnívoros, como los zorros (*Vulpes vulpes*), los chacales (*Canis aureus*) o los lobos (*Canis lupus*), han sido ampliamente estudiados debido a su similitud con los perros o a que han sido señalados como potenciales reservorios, pero existen numerosas especies de las que aún se desconoce el papel que puedan jugar en el mantenimiento y dispersión de este parásito (Cardoso et al., 2021; Roque & Jansen, 2014).

Además, la elección de las muestras a analizar, así como la metodología a usar, son de extrema importancia, ya que se detecta en la bibliografía una amplia variación de resultados debido, probablemente, a diferencias en la metodología de análisis y toma de muestras. Esto se suma a la baja parasitemia que podrían presentar los animales silvestres, lo que dificulta más todavía la detección del parásito. Por tanto, en este estudio, se pretende hacer un análisis amplio, donde se estudian un total de 123 animales mamíferos, de 9 especies diferentes muy comunes en la península ibérica, como son el erizo europeo (*Erinaceus europaeus*), el erizo moruno (*Atelerix algirus*), la ardilla roja (*Sciurus vulgaris*), el tejón europeo (*Meles meles*), el meloncillo (*Herpestes ichneumon*), la garduña (*Martes foina*), la comadreja común (*Mustela nivalis*), el lirón careto (*Elyomis quercinus*) y el turón europeo (*Mustela putorius*) de donde se obtuvieron muestras de bazo y piel de oreja, y se analizaron tres dianas diferentes de ADN: *Repeat region, SSUrRNA* e *ITS1*, siguiendo protocolos de PCR anidada en los dos últimos casos, con el fin de incrementar la sensibilidad. Las muestras se seleccionaron debido a la capacidad que tiene *L. infantum* de acantonarse en el bazo y a que la oreja es una zona muy accesible para el flebotomo. Asimismo, las dianas elegidas, presentaron elevada sensibilidad a la hora de detectar el parásito en fauna silvestre, tanto en la bibliografía consultada

(Azami-Conesa et al., 2021a; Cardoso et al., 2021) como en los trabajos realizados anteriormente, y que se incluyen en esta Tesis Doctoral. Se excluyó la diana *kDNA* por dos razones, en primer lugar, por amplificar un fragmento muy pequeño que resulta difícil de secuenciar y no puede enviarse para su publicación en GenBank, y en segundo lugar porque en ensayos previos, a pesar de mostrar elevada sensibilidad en muestras de perro y cultivos de promastigotes, no resultó igual de sensible en tejidos de animales silvestres (bazo).

Además, se ha analizado la utilidad de determinadas muestras que no requieran la muerte del individuo, y que sean poco invasivas, como son la conjuntiva ocular (tomando la muestra con un hisopo) y la mucosa oral (hisopo), ya que uno de los principales problemas a la hora de analizar a la fauna silvestre es que la mayoría de los estudios toman las muestras *post morten*, pero pocos emplean muestras *ante mortem*. Estas técnicas fueron usadas con anterioridad por otros autores, donde se obtuvieron resultados esperanzadores (Aschar et al., 2016; Souguir-Omrani et al., 2018). Sin embargo, en el presente estudio no se obtuvieron resultados positivos en ninguno de los ocho erizos europeos analizados. Esto podría deberse al manejo a la hora de tomar las muestras, a las diferencias propias de las especies de animales o a la baja parasitemia que pudieran presentar los animales analizados.

En conjunto, el 14,84% de los animales analizados resultaron positivos a *L. infantum* en al menos una muestra (bazo o piel) y en una o más dianas del ADN. Los animales positivos pertenecían a las especies de erizo europeo, ardilla roja y tejón europeo exclusivamente. En cuanto al tipo de muestra, en esta ocasión el bazo presentó un mayor número de positivos (12/124) que la piel (9/113), lo cual concuerda con resultados obtenidos en otros estudios previos (Azami-Conesa et al., 2020; Gomes et al., 2020; Ramos et al., 2013; Sobrino et al., 2008). En relación a las dianas del ADN analizadas, la *Repeat Region* y la *SSUrRNA* resultaron más sensibles que la *ITS1*, acorde con la bibliografía y estudios previos de nuestro grupo incluidos en la presente Tesis Doctoral (Azami-Conesa et al., 2020, 2021b; Chemkhi et al., 2015; Lachaud et al., 2002a).

Este estudio pone el foco en los animales silvestres, una vez más, como posibles centinelas de la situación epidemiológica de la leishmaniosis, así como en la importancia de hacer estudios amplios con respecto a las muestras y dianas a utilizar.

4.3.2. PONENCIAS

- **Azami- Conesa, I.,** Sansano- Maestre, J., González, F., Gómez- Muñoz, M.T. "Occurrence of *Leishmania infantum* in unusual wild mammals from Spain". 15th International Congress of Parasitology. Copenhague (Dinamarca), del 21 al 26 de agosto de 2022. Comunicación en formato póster.

4.3.3. ARTÍCULO

- **Azami- Conesa, I.,** Pérez-Moreno, P., Matas- Méndez, P., Sansano- Maestre, J., González, F., Mateo- Barrientos, M., Gómez- Muñoz, M. T. (2023). Occurrence of *Leishmania infantum* in Wild Mammals Admitted to Recovery Centers in Spain. *Pathogens*, 22 (1048). DOI: doi.org/10.3390/pathogens12081048.
    - Índice de impacto en 2023 (según el Journal Citation Reports- JCR): 3,3
    - Clasificación en 2023 en el área "Microbiology": 70/161 (Q2)

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

pathogens

Article

Occurrence of *Leishmania infantum* in Wild Mammals Admitted to Recovery Centers in Spain

Iris Azami-Conesa [1,2], Paula Pérez-Moreno [1], Pablo Matas Méndez [3], Jose Sansano-Maestre [4], Fernando González [5,6], Marta Mateo Barrientos [7,*] and María Teresa Gómez-Muñoz [1,*]

1 Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain; irisazami@ucm.es (I.A.-C.); pauper21@ucm.es (P.P.-M.)
2 Department of Health Sciences, Faculty of Biomedical and Health Sciences, Universidad Europea de Madrid, Villaviciosa de Odón, 28670 Madrid, Spain
3 Facultad de Veterinaria, Universidad Alfonso X el Sabio, Villanueva de la Cañada, 28691 Madrid, Spain; pmatamen@uax.es
4 Department of Animal Health and Public Health, Catholic University of Valencia, 46002 Valencia, Spain; jose.sansano@ucv.es
5 GREFA (Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat), Monte del Pilar, 28220 Madrid, Spain; fgonzalez@grefa.org
6 Departmental Section of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Science, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain
7 Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain
* Correspondence: mmateo14@ucm.es (M.M.B.); mariateg@ucm.es (M.T.G.-M.)

Abstract: Zoonotic leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is distributed worldwide and affects humans and domestic and wild mammals. In Europe, specifically in the Mediterranean basin, leishmaniasis is endemic due to the concurrence of the phlebotomine vectors and reservoir mammals, including carnivorous wildlife species and other less studied wild species. In this article, spleen, skin, and eye or oral swabs taken from 134 wild mammals admitted to five wildlife recovery centers in Spain were used. PCR employing fragments of the Repeat region, ITS1, and SSUrRNA were used for detection, and positive samples were processed for sequencing. *L. infantum* was detected in three out of the nine species analyzed, including European hedgehog, European badger, and red squirrel, with percentages ranging from 11.53 to 35.71%, depending on the species. Most of the species showed higher percentages of positivity in spleen samples than in skin samples. A small number of animals from the remaining six species tested negative, including Algerian hedgehog, stone marten, least weasel, garden dormouse, western polecat, and Egyptian mongoose. Hedgehogs and badgers are good candidates for consideration as epidemiological sentinels and pose a higher risk as potential reservoirs of leishmaniasis based on their percentage of infection and wide distribution.

Keywords: *L. infantum*; wild mammals; PCR; European hedgehog; red squirrel; European badger

check for updates

Citation: Azami-Conesa, I.; Pérez-Moreno, P.; Matas Méndez, P.; Sansano-Maestre, J.; González, F.; Mateo Barrientos, M.; Gómez-Muñoz, M.T. Occurrence of *Leishmania infantum* in Wild Mammals Admitted to Recovery Centers in Spain. *Pathogens* **2023**, *12*, 1048. https://doi.org/10.3390/pathogens12081048

Academic Editors: Ana Cláudia Coelho and Luís Cardoso

Received: 7 July 2023
Revised: 11 August 2023
Accepted: 14 August 2023
Published: 16 August 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Leishmaniasis is a zoonotic disease caused by a protozoan parasite of the genus *Leishmania*. The Genus includes more than 20 zoonotic species with a worldwide distribution. *Leishmania infantum* is the most frequently reported species in the Mediterranean basin, causing a life threatening disease in humans and animals [1–3]. Cutaneous and visceral leishmaniosis (CL and VL, respectively) can occur [4]. In the first case, the promastigote stage of the parasite infects phagocytic cells from the skin and, eventually, the infected cell bursts, liberating amastigote forms to infect surrounding cells, while systemic disease (VL) occurs when infected cells and amastigotes spread via the blood to infect phagocytic cells in the bone marrow, liver, spleen, and lymph nodes [1]. The main route of transmission is the bite of a phlebotomine sandfly (order Diptera, family Psychodidae), though they are minor

routes of infection, such as venereal or vertical transmission, which is proven in canids, or the oral route, which is described in hamsters and suggested in insectivorous bats [2,5,6]. About ten species of the genus *Phlebotomus* have been described as capable of transmitting *L. infantum* in southern Europe, with the most common being *P. perniciosus* and *P. ariasi*, which have a wide distribution in countries such as Italy, Portugal, France, and Spain [7,8]. Humans and domestic animals, such as dogs, have been the most widely studied reservoirs due to their high prevalence and relevance, but in the last few decades, several domestic and wildlife species have been analyzed to investigate their ability to maintain the biological cycle of the parasite [2,3,9]. The role of each host species in the spread of leishmaniosis in urban, peri-urban, and rural environments needs to be clarified. The first step should be the identification of potential hosts and, eventually, their ability to play a relevant role in outbreaks of this parasitosis, which can be proven through xenodiagnoses experiments. This approach was employed during the large outbreak of leishmaniosis in Madrid, when hares were proven to play a role in the maintenance of the cycle [10].

In Europe, wild carnivores, like foxes (*Vulpes vulpes*), jackals (*Canis aureus*), and wolves (*Canis lupus*), have been extensively studied due to their similarity to dogs, but other species, such as European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), European badger (*Meles meles*), common bat (*Pipistrellus pipistrellus*), rodents (*Mus musculus*, *Rattus rattus*, etc.), red squirrel (*Sciurus vulgaris*), European and American minks [11,12] and martens (*Martes martes*), among others, have tested positive for *L. infantum* via both molecular and/or serological methods [2,3], although most of these studies employed few animals of each species. The growing interest in these species' roles as potential pathogen reservoirs is caused by the increasing interaction between wildlife and urban and peri-urban environments due to the fragmentation of their habitats, the extension of peri-urban areas into typically wild territories, and the increase in eco-tourism activities. These situations led to increased interactions between wildlife, humans, domestic hosts, and vectors [9].

Regarding the diagnostic techniques employed for the detection of the parasite, serology is mainly used in humans and dogs, as it requires blood and is a minimally invasive procedure. However, in some of the wildlife species studied, serology was complemented with molecular techniques, with the most employed methods being PCR and qPCR [2]. Numerous targets of DNA have been described for use in the detection of *L. infantum*, with kDNA and SSUrRNA being the most commonly used due to their high sensitivity, but other targets, such as the Repeat region, also displayed high sensitivity, and the ITS1 target is preferred due to its higher specificity [10,11,13]. Blood, liver, and spleen are common samples used in DNA extraction and PCR, while in recent years, samples obtained via less invasive methods, such as hair and oral or ocular swabs, have been used [2].

Considering that Spain is a country with high levels of prevalence of *L. infantum* in Europe and the Mediterranean area [14], the aim of this work was to analyze the occurrence of the parasite in wild mammals that are potential reservoirs of leishmaniosis in wild, urban, and peri-urban areas. For this purpose, different samples from the animals and several DNA targets were employed. The usefulness of less invasive techniques in testing wild species is evaluated in this work.

2. Materials and Methods

2.1. Origin of Animals and Samples

Samples were obtained, at convenience, from wildlife recovery centers in Spain. In total, 123 animals from 3 different mammal species were studied, including 83 European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*), 26 red squirrels (*Sciurus vulgaris*), and 14 European badgers (*Meles meles*). The minimum number of animals included in each sample to detect the disease in these three species was calculated by employing previously described percentages of infection for each species: $n = 11$ for European badger (26% of infections) [15], $n = 11$ for red squirrel (25% of infections) [13], and $n = 8$ for European hedgehog (34.4% of infections) [13]. The online resource Working in Epidemiology (WinEpi) was employed to complete the calculation [16].

In addition, a small number (n = 11) of other six species were included in the study: Egyptian mongoose (*Herpestes ichneumon*), Algerian hedgehog (*Atelerix algirus),* stone marten (*Martes foina*), least weasel (*Mustela nivalis*), garden dormouse (*Elyomis quercinus*), and western polecat (*Mustela putorius*).

The animals were admitted between November 2015 and February 2023 to five wildlife recovery centers: GREFA (Group of Rehabilitation of the Autochthonous Fauna and their Habitat; Madrid, Spain), "La Granja de El Saler" (Valencia, Spain), Mini-zoo (Guadalajara, Spain), "El Chaparrillo" (Ciudad Real, Spain), and CERI "Iberian birds of prey Studies Center" (Toledo, Spain). The areas of origin of the animals were the regions of Madrid, Castilla–La Mancha, Castilla y León, and the Valencian Community, Spain (Table S1). All animals were admitted to the recovery centers due to illness or trauma, and most of them (128/134) were roadkill or humanely euthanized following veterinary criteria and the AVMA guidelines for the euthanasia of animals [17]. Samples from skin, spleen, and/or liver were obtained from the dead animals and kept frozen until analysis. Six of the European hedgehogs recovered from their injuries and were reintroduced into the wild, but before that stage and during veterinary examination, oral and ocular swab samples were taken and kept frozen. In addition, oral and ocular swab samples were taken at the time of admission from two of the dead hedgehogs (Table 1).

Table 1. Wild animal species analyzed for the presence of *L. infantum*. Numbers of animals and types of samples are included.

Scientific Name	Number of Animals (n)	Type and Number of Samples			
		Ear Skin	Spleen	Ocular Swab	Oral Swab
Erinaceus europaeus	83	64	75	8	8
Sciurus vulgaris	26	25	24 *	-	-
Meles meles	14	14	14 *	-	-
Atelerix algirus	3	3	3	-	-
Martes foina	2	2	2	-	-
Mustela nivalis	2	2	2	-	-
Eliomys quercinus	1	1	1	-	-
Mustela putorius	1	-	1	-	-
Herpestes ichneumon	2	2	2	-	-
TOTAL	134	113	124	8	8

* One animal analyzed using sample of liver tissue, instead of spleen, due to extensive damage caused to the spleen.

2.2. DNA Extraction

DNA was isolated from the samples using 10 (spleen) or 20 mg (ear skin or liver) of tissue sample based on the kit manufacturer's recommendations. The Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) was employed, and the manufacturer's protocol was followed, except for DNA elution, which was carried out in 60 µL of elution buffer, instead of 100 µL. Sample derived from *L. infantum* promastigotes in culture and DNase free water were employed as positive and negative controls, respectively, in each batch.

2.3. PCR of L. infantum and Sequencing

DNA isolated from each sample was used in the detection of *L. infantum* using three different targets of DNA: Repeat region, SSUrRNA, and ITS1 [18–20]. The latter was only performed in samples positive at the other two targets, as its sensitivity was lower [11]. In

the case of SSUrRNA and ITS1, a nested PCR (nPCR) was used. In all instances, the reaction was carried out in 25 µL, using 12.5 µL of the Supreme NZYTaq II (NZY Tech, Lisbon, Portugal) and 1 µL of each primer at 10 µM. For the Repeat Region and ITS1, 2.5 µL of DNA was used, and for the SSUrRNA, 5 µL of DNA was employed. The second reactions of both nPCRs were carried out using 5 µL of 1/40 dilution of the first PCR product or 1/20 dilution in case of faint positive reactions. For the Repeat region, primers T2 and B4 [20] were used; for SSUrRNA, primers R221 and R332 were employed for the outer section, and primers R223 and R333 were employed for the inner section [18]. Finally, for ITS1, outer primers LITSR and L5.8S and inner primers SAC and VAN2 were selected [19]. Moreover, positive (*L. infantum* promastigotes DNA) and negative (DNase free water) controls were employed in each reaction. For all PCR reactions, an initial step at 95 °C for 5 min was used to activate the enzyme, and a last step at 72 °C for 10 min was added for the elongation step. The intermediate steps, as well as other features, are described elsewhere [11]. Electrophoresis was carried out on 1.5% agarose gel stained with SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and visualized under UV light. Positive samples displayed a band on the gel related to the expected size of each target, including positive controls.

2.4. DNA Sequencing and Alignments

All positive samples were cleaned and sequenced by a commercial company (Macrogen Spain, Madrid) using DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD) and ABI BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's protocol. The obtained sequences were manually checked and aligned with Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) software and FinchTV 1.4.0 software (Geospiza, Inc.; Seattle, WA, USA). The consensus sequences of each positive sample were then compared with other available sequences using the BLAST tool (National Library of Medicine, Rockville, MD, USA) [21]. All obtained sequences of more than 200 base pairs were submitted to GenBank for accession number identification.

2.5. Phylogenetic Trees

Phylogenetic trees were constructed using sequences available from GenBank, together with sequences obtained in this study that were of sufficient quality and length. Only trees for SSUrRNA and ITS1 regions are shown, since there were enough sequences from other *Leishmania* species obtained from different authors available at GenBank. The Repeat region was only employed for detection and estimation of the percentage of homology.

Sequences of the ITS1 region had a minimum length of 290 nucleotides, and a sequence of *Trypanosoma cruzi* was included as an out-group reference. Sequences of the SSUrRNA region with a minimum length of 320 nucleotides were included, and a sequence of *Trypanosoma cruzi* was included as an out-group reference. In addition, sequences of *L. infantum* and other species of *Leishmania* derived from different sources were included to verify similarity. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method based on the Tamura–Nei model [22]. The tree with the highest log likelihood was shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together was shown next to the branches. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying the Neighbor-Joining and BioNJ algorithms to a pairwise distance matrix estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach and selecting the topology with superior log likelihood value. The tree was drawn to scale, with branch lengths measured based on the number of substitutions per site. The analysis involved 26 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. Evolutionary analyses were conducted via MEGAX [23]. Bootstrap of 2000 replicates was employed to estimate the reliability of the trees.

2.6. Maps

The maps were created by taking as reference the map of prevalence of *Leishmania* spp. reported in wild animals [14] and the distribution of each animal species in Spain based on the atlas and red book of terrestrial mammals of Spain [24]. The AutoCAD program (Autodesk® Inc., the Landmark, San Francisco, CA, USA) was employed to observe the overlaps between the two maps.

2.7. Statistical Analysis

A descriptive statistical analysis with absolute (n) and relative frequency of infection (%) was carried out, and a confidence level of 95% was estimated by employing the free online tool WinEpi (Working in Epidemiology) [16].

3. Results

3.1. Ocurrence of Leishmania spp. in Different Animal Species

In total, 19 of the 128 necropsied animals (14.84%, CI 8.68–21%) tested positive for *L. infantum* in at least one sample (spleen or skin) and one PCR target (Table 2 and Table S2). Positives were found in spleen or ear skin, while oral and ocular swabs (n = 8) were all negative. Only two animals tested positive in both spleen and skin: a breeding European hedgehog and an adult European badger (Table S2). The highest percentage of infection was found in European badgers (35.71%, CI 10.63–60.8%), followed by European hedgehogs (14.29%, CI 6.5–22.07%) and red squirrels (11.53%, CI 0.0–23.8%).

Table 2. Animal species and samples evaluated for *L. infantum* by employing different PCR targets. Number of positive samples and percentage of positivity is shown.

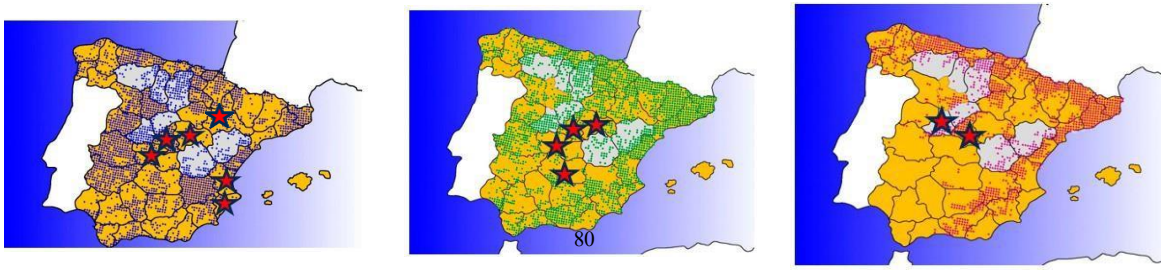
Species	Spleen (+/*n*)			Ear Skin (+/n)			TOTAL (% Value, 95% CI)
	Repeat Region	SSUrRNA	ITS1	Repeat Region	SSUrRNA	ITS1	
Erinaceus europaeus	2/75	3/75	1/5	6/64	1/64	1/7	11/77 (14.29%, CI 6.5–22.07%)
Sciurus vulgaris	3/24	1/24	0/3	0/25	0/25	N.A.	3/26 (11.53%, CI 0–23.8%)
Meles meles	0/14	4/14	3/4	2/14	0/14	0/2	5/14 (35.71%, CI 10.63–60.8%)
Atelerix algirus	0/3	0/3	N.A.	0/3	0/3	N.A.	0/3 (0%, CI 0–63.16%)
Mustela nivalis	0/2	0/2	N.A.	0/2	0/2	N.A.	0/2 (0%, CI 0–77.64%)
Martes foina	0/2	0/2	N.A.	0/2	0/2	N.A.	0/2 (0%, CI 0–77.64%)
Eliomys quercinus	0/1	0/1	N.A.	0/1	0/1	N.A.	0/1 (0%, CI 0.0–95%)
Mustela putorius	0/1	0/1	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0/1 (0%, CI 0.0–95%)
Herpestes ichneumon	0/2	0/2	N.A.	0/2	0/2	N.A.	0/2 (0%, CI 0.0–77.64%)
TOTAL	5/124	8/124	4/12	8/113	1/113	1/9	19/128 (14.84%, CI 8.68–21%)

n: number of animals. N.A.: not analyzed. Eight oral and ocular swabs from European hedgehog were negative for *L. infantum* PCRs and are not included in the table.

3.2. Geographic Origin of the Samples and Risk of Infection

The area of leishmaniosis reported in humans and animals includes most of the Iberian Peninsula, which is in coincidence with the distribution of some of the species that tested positive in this study, namely European badger and European hedgehog, while red squirrel displayed a smaller area of distribution (Figure 1). The provinces in which animals were

found belong to Madrid, Comunidad Valenciana (Valencia and Alicante), Castilla–La Mancha (Guadalajara, Toledo, Ciudad Real), and Castilla y León (Ávila), and their locations are marked with a star in the figure. Most of the animals were found in peri-urban areas, since many of them were roadkill, although some red squirrels and hedgehogs were also recovered from streets and urban gardens (Table S1).



(**a**) (**b**) (**c**)

Figure 1. Map showing the distribution of species that tested positive for *L. infantum* in Spain (dotted areas). Areas colored in orange are recognized as having endemic leishmaniasis, according to ECDC, 2022. (**a**) Distribution areas of European hedgehog; (**b**) distribution areas of European badger; (**c**) distribution areas of red squirrel. Red stars indicate the origin of the samples used in the present study.

3.3. Sensitivity of PCRs

A total of 253 samples were first analyzed at the Repeat region and the SSUrRNA fragment, and only positive samples obtained via these previous PCR protocols were tested at the ITS1 region (n = 20) (Table S2).

Considering all samples, the Repeat Region and the SSUrRNA PCRs displayed similar sensitivity, since 13 and 9 samples were positive, respectively. In total, 4.03% (5/124) and 7.08% (8/113) of positive samples were obtained in spleen and skin, respectively, when employing the Repeat region compared to 6.45% (8/124) and 0.89% (1/113) of positive samples rendered via the SSUrRNA PCR. The European badger displayed a higher number of positive samples when employing the SSUrRNA PCR of the spleen, while higher number of positives were obtained via the Repeat region PCR using the skin in European hedgehogs. The ITS1 tested positive in 4/12 and 1/9 samples in spleen and skin, respectively.

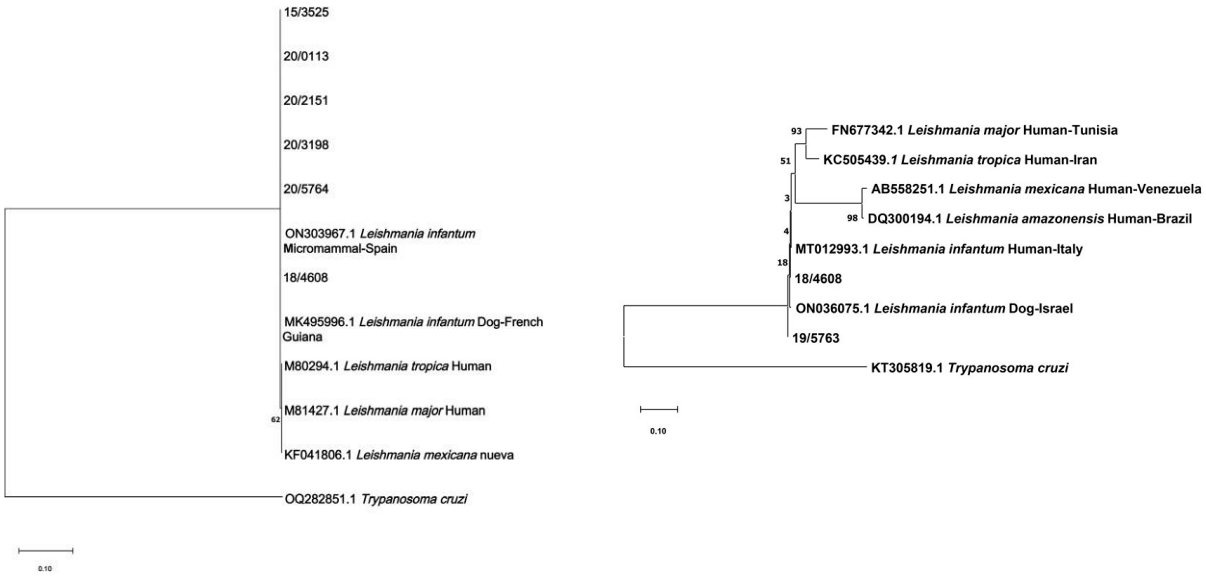
3.4. Sequences

All samples positive to PCRs were sequenced and submitted to GenBank, although faint reactions did not render a legible sequence. The accession numbers are as follows: OP594494–OP594504 for sequences of the Repeat region; OP588913–OP588918 for sequences of the SSUrRNA; OP588937 and OP588938 for samples positive at ITS1 PCR.

A total of 6 sequences of the SSU target, 11 of the Repeat region, and 2 of the ITS1 target were successfully aligned in both directions and subjected to BLAST analysis. The rest of PCR positive samples rendered short sequences, since the signal was low. All of the samples corresponded to *L. infantum*, with percentages of homology being 99–100%.

3.5. Phylogenetic Trees

Phylogenetic trees were constructed by employing sequences from the two selected targets after cutting the sequences of the primers employed via the PCRs (Figure 2). The Repeat region was excluded since it had very short sequences. All sequences obtained for SSUrRNA had 320 bp and were identical, since it is a conserved region. These sequences were also identical to reference sequences from GenBank, a sequence from a dog derived in French Guiana (acc. number MK495996), and a sequence from a micromammal derived in Spain (acc. number ON303967).



(**a**) (**b**)

Figure 2. Phylogenetic trees of SSUrRNA (**a**) and ITS1 (**b**) fragments. The trees were constructed by applying Neighbor-Joining and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Tamura–Nei model and selecting the superior log likelihood value. The trees are drawn to scale, with branch lengths measured based on the number of substitutions per site. A bootstrap of 2000 replicates was employed.

The two sequences of the ITS region were employed to construct the phylogenetic tree with 290 bp. Although ITS1 sequences were grouped very close together in the phylogenetic tree, a slight difference was found between both sequences in this study. One sequence obtained from the spleen of a European hedgehog (18/4608) was closer to a *L. infantum* sequence derived from a human in Italy, while the other sequence obtained from the skin of a European hedgehog (19/5763) was aligned in a slightly more distant position.

4. Discussion

In this study, a high number of samples derived from wild animals were analyzed to determine the presence of *L. infantum*. Most of them had already been studied previously for the presence of *L. infantum*, but either a different target (kDNA) was employed in some of the studies [25] or a small number of samples or animals were included. In the present study, the most relevant studied species are the red squirrel, the European badger, and the European hedgehog, given the number of animals from each species that tested positive and their wide distribution in Spain and other Mediterranean countries.

The results obtained for the European badger, with 35.71% of animals testing positive, are in line with other studies conducted in endemic or peri-endemic areas of Spain and Italy, where results ranged from 26 to 53.3%. In both cases, spleen samples were analyzed (and, in some cases, liver), with different DNA targets, ITS2, and kDNA [15,25]. This diversity of targets may influence the results, as not all targets are equally sensitive. In our case, positive results were obtained via SSUrRNA nPCR, as a target had high sensitivity when a nested PCR was employed, as was demonstrated in other articles with other wildlife species [11,18,19,26]. In the present study, a substantial percentage of the animals were found to be infected, all of which were roadkill animals from peri-urban environments. Badgers are long-living animals, and for that reason, their role as potential reservoirs of the disease is relevant [24].

In the case of hedgehogs, most studies focused on species of the genera *Atelerix* and *Paraechinus* [27–29], with only two studies working with samples from *Erinaceus europaeus* [13,30]. In our case, the latter species is the one that tested positive for *L. infantum*,

with 14.29% of samples being positive at the spleen or ear skin. These results are slightly lower than those obtained in the studies carried out by Muñoz-Madrid et al. [30] (100% positive results in hedgehog hair, albeit using only one specimen) or Alcover et al. [13] (34.4% positive spleen and skin samples). In both cases, the target used for *L. infantum* detection was kDNA, which could have influenced this difference in results. kDNA is one of the most widely used targets in the detection of *L. infantum*, albeit with highly variable results, ranging from studies with no positive samples to studies with remarkably high percentages of positivity [11,13,31]. The animals analyzed in the present study came from peri-urban areas, and it is common to see them near human settlements. They inhabit nests, and these habitats could be protected places in which phlebotomine sandflies live, as is often the case in other small mammals' nests [24].

Red squirrels have scarcely been investigated for the presence of *L. infantum*, except for one study conducted in Catalonia, in which the authors found 25% of the animals to be infected [13]. In our study, 11.53% of red squirrels were positive, i.e., a slightly lower result, but this result could also be attributed to the origin of the animals. The analyzed specimens in this study were from urban or peri-urban areas, and they inhabited gardens and parks with trees, which can be considered as potential risk areas in case leishmaniosis outbreaks occur, as they are suitable habitats for the reproduction and maintenance of sandflies [24].

In the present study, several targets were used for the detection of *L. infantum* infection: the Repeat region and a fragment of the SSUrRNA. SSUrRNA displayed high sensitivity, according to previous studies, but better results were observed in hedgehogs and red squirrels employing the Repeat region, and this latter finding agrees with previous studies that employed this last target and obtained high percentages of positivity in common urban bats and American minks [11,32]. Other authors who employed the Repeat region found higher numbers of positive results compared to other DNA targets, such as kDNA, Mini-exon or SSUrRNA [29,33]. Authors such as Lauchaud et al. [33] have described a high degree of inhibition when using the Repeat region as a target for the detection of *L. infantum* in humans, albeit with variable results in other animal species. It appears that the Repeat region works differently for distinct animal species, a fact also observed in the present study.

Regarding the results obtained via ITS1, we found a small number of positive results, given that we only used this target in those samples that were positive for other DNA sites. There are numerous scientific articles that discuss the detection of *L. infantum* with ITS1, and the authors always highlight the high specificity of this region, but it has a lower level of sensitivity [19,34,35]. Indeed, this was the case for a previous report of *Leishmania* in hedgehogs [29]. Therefore, it is particularly useful when sequencing and determining the species or genetic variants of *Leishmania* present in the infected animals, but it has the disadvantage of lower sensitivity. In our study, we only obtained five positive samples for this target, despite performing a nested PCR to increase the sensitivity.

The results obtained in this study showed a higher percentage of positives using spleen samples (n = 12/124) compared to other tissue samples, such as skin (n = 9/113) (9.52% vs. 7.96%) (Table S2). This result agrees with other studies, in which this organ was the preferred site (the most sensitive target) for the detection of *Leishmania* [32,34,36,37]. However, it is necessary to handle this type of sample with care, as it can have a high number of inhibitory enzymes and proteins, according to DNA extraction protocols, and this situation can lead to false negative results. In this study, DNA extractions of these samples were performed using a lower amount of tissue (10 mg) than other samples, as indicated in the manufacturer's instructions. In any case, the spleen, as well as other animal tissues, such as the lymph nodes or bone marrow, accumulate high numbers of parasites, which have a high tropism toward these areas, where they easily multiply [38].

Another tissue sample frequently used for the detection of *L. infantum* in this study and other studies is the skin, but the results are highly variable. This issue could be due to the difficulty of detecting these parasites in the absence of lesions. In the case of the animals studied here, none presented lesions compatible with *L. infantum*, which might be

one reason that *L. infantum* is detected in skin samples less frequently than in the spleen. However, this observation was not true in hedgehogs, which displayed a higher percentage of positivity in skin (10.93% vs. 6.67%). Another explanation is that the distribution of the parasite depends on the analyzed species. Our findings agree with other studies, in which hedgehogs show similar or even higher percentages of positivity in skin than in spleen samples [28,39].

It would be interesting to analyze a larger number of less invasive samples, such as eye and oral swabs, which, in this study, have not yielded positive results, but encouraging results can be found in the literature, mainly in dogs and hedgehogs [27,38]. The drawback would be that samples are difficult to obtain, as experienced handling is needed to obtain a good sample capable of yielding conclusive results. Another reason that explained the negative results of these samples is that the animals may not have a large number of parasites, and only one of the two animals analyzed using skin and spleen tested positive in spleen. Again, no lesions were observed in the oral or ocular mucosae, and many of the animals (6/8) were released in the wild.

Considering the overlapping distribution of wild species positive for *L. infantum* infection with the distribution of the parasite in the Iberian Peninsula, we considered that the species with the highest risk of being potential reservoirs are badgers and hedgehogs. Also, we would like to highlight that the information provided in this article is relevant to developing conservation strategies and management of wildlife populations. Finally, the research of zoonotic diseases in wildlife species make them sentinels that can be used to explore the epidemiological situation of endemic or emerging diseases.

5. Conclusions

The present study analyzed the occurrence of *L. infantum* in nine wild species of mammals, three of which tested positive for the parasite. The European badger was the species with the highest percentage of infection (35.71%). Lower percentages were found in red squirrel (11.53%) and European hedgehog (14.29%). Considering the distribution of the wild species analyzed and the parasite in the Iberian Peninsula, European hedgehogs and European badger could pose a higher risk of being potential reservoirs of leishmaniasis. Wild animals could act as sentinels to evaluate the epidemic status and predict emerging situations.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded via the following link: https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens12081048/s1, Table S1: Data of the animals employed in this study; Table S2: PCR results by animal sample and target.

Author Contributions: Conceptualization, M.T.G.-M. and M.M.B.; methodology, I.A.-C., P.P.-M., J.S.-M., F.G. and P.M.M.; software, I.A.-C.; validation, I.A.-C., P.P.-M., J.S.-M. and F.G.; formal analysis, I.A.-C. and M.T.G.-M.; investigation, I.A.-C., P.P.-M., J.S.-M., F.G., M.T.G.-M., M.M.B. and P.M.M.; resources, M.T.G.-M.; data curation, M.T.G.-M. and I.A.-C.; writing—original draft preparation, I.A.-C.; writing—review and editing, M.T.G.-M.; visualization, M.T.G.-M.; supervision, M.T.G.-M.; project administration, M.T.G.-M.; funding acquisition, M.T.G.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by grants from University Complutense of Madrid to established research groups (GR29/20 UCM).

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived for this study because the actions carried out were not experimental procedures; instead, they were part of the daily activities of a wildlife recovery center, such as performing necropsies on dead animals and taking samples for diagnosis, which occurred in accordance with the following local legislation and annual permits: DGPFEN/SEN/avp_21_103_bis, DECRETO 259/2004, and Ley 2/1991 Comunidad Autónoma de Madrid (annual permits).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Sequences obtained in this study were deposited at GenBank with the following accession numbers: OP594494–OP594504 for sequences of the Repeat region; OP588913–OP588918 for sequences of the SSUrRNA; OP588937 and OP588938 for samples positive at ITS1 PCR.

Acknowledgments: We acknowledge the help provided by the following wildlife recovery centers: GREFA (Research Group "GEMAS", Madrid), La Granja (El Saler, Valencia), Consejería de Desarrollo Sostenible, Dirección General de Medio Natural y Biodiversidad (Castilla–la Mancha), and Consejería de Fomento y Medio Ambiente.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Maxfield, L.; Corley, J.E.; Crane, J.S. *Leishmaniasis*; StatPearls Pulblishing: Treasure Island, FL, USA, 2022.
2. Azami-Conesa, I.; Gómez-Muñoz, M.T.; Martínez-Díaz, R.A. A Systematic Review (1990–2021) of Wild Animals Infected with Zoonotic *Leishmania*. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1101. [CrossRef]
3. Cardoso, L.; Schallig, H.; Persichetti, M.F.; Pennisi, M.G. New Epidemiological Aspects of Animal Leishmaniosis in Europe: The Role of Vertebrate Hosts Other than Dogs. *Pathogens* **2021**, *10*, 307. [CrossRef] [PubMed]
4. Steverding, D. The History of Leishmaniasis. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 82. [CrossRef] [PubMed]
5. Coutinho, M.T.Z.; Linardi, P.M. Can Fleas from Dogs Infected with Canine Visceral Leishmaniasis Transfer the Infection to Other Mammals? *Vet. Parasitol.* **2007**, *147*, 320–325. [CrossRef] [PubMed]
6. de Oliveira, V.V.G.; Alves, L.C.; da Silva, V.A. Vias de Transmissão Da Leishmaniose Visceral Em Mamíferos. *Cienc. Rural* **2015**, *45*, 1622–1628. [CrossRef]
7. Alten, B.; Maia, C.; Afonso, M.O.; Campino, L.; Jiménez, M.; González, E.; Molina, R.; Bañuls, A.L.; Prudhomme, J.; Vergnes, B.; et al. Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004458. [CrossRef]
8. Sáez, V.D.; Morillas-Márquez, F.; Merino-Espinosa, G.; Corpas-López, V.; Morales-Yuste, M.; Pesson, B.; Barón-López, S.; Lucientes-Curdi, J.; Martín-Sánchez, J. *Phlebotomus langeroni* Nitzulescu (Diptera, Psychodidae) a New Vector for *Leishmania infantum* in Europe. *Parasitol. Res.* **2018**, *117*, 1105–1113. [CrossRef]
9. Roque, A.L.R.; Jansen, A.M. Wild and Synanthropic Reservoirs of *Leishmania* Species in the Americas. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2014**, *3*, 251–262. [CrossRef]
10. Molina, R.; Jiménez, M.I.; Cruz, I.; Iriso, A.; Martín-Martín, I.; Sevillano, O.; Melero, S.; Bernal, J. The Hare (*Lepus granatensis*) as Potential Sylvatic Reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol.* **2012**, *190*, 268–271. [CrossRef]
11. Azami-Conesa, I.; Sansano-Maestre, J.; Martínez-Díaz, R.A.; Gómez-Muñoz, M.T. Invasive Species as Hosts of Zoonotic Infections: The Case of American Mink (*Neovison vison*) and *Leishmania infantum*. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1531. [CrossRef]
12. Giner, J.; Villanueva-Saz, S.; Fernández, A.; Gómez, M.A.; Podra, M.; Lizarraga, P.; Lacasta, D.; Ruiz, H.; Aranda, M.D.C.; Jimenez, M.; et al. Detection of Anti–*Leishmania infantum* Antibodies in Wild European and American Mink (*Mustela lutreola* and *Neovison vison*) from Northern Spain, 2014–2020. *J. Wildl. Dis.* **2022**, *58*, 198–204. [CrossRef] [PubMed]
13. Alcover, M.M.; Ribas, A.; Guillén, M.C.; Berenguer, D.; Tomás-Pérez, M.; Riera, C.; Fisa, R. Wild Mammals as Potential Silent Reservoirs of *Leishmania infantum* in a Mediterranean Area. *Prev. Vet. Med.* **2020**, *175*, 104874. [CrossRef]
14. Berriatua, E.; Jumakanova, Z.; Muñoz, C.; Ortuño, M.; Pérez-Cutillas, P. *Surveillance, Prevention and Control of Leishmaniases in the European Union and Its Neighbouring Countries*; ECDC: Stockholm, Sweden, 2022. [CrossRef]
15. Del Río, L.; Chitimia, L.; Cubas, A.; Victoriano, I.; De la Rúa, P.; Gerrikagoitia, X.; Barral, M.; Muñoz-García, C.I.; Goyena, E.; García-Martínez, D.; et al. Evidence for Widespread *Leishmania infantum* Infection among Wild Carnivores in Periendemic Northern Spain. *Prev. Vet. Med.* **2014**, *113*, 430–435. [CrossRef] [PubMed]
16. de Blas, I. *Win Epi: Working in Epidemiology*; Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza: Zaragoza, Spain, 2006; Available online: http://www.winepi.net/ (accessed on 30 July 2023).
17. Leary, S.; Underwood, W.; Anthony, R.; Cartner, S.; Grandin, T.; Greenacre, C.; Gwaltney-Brant, S.; McCrackin, M.A.; Meyer, R.; Miller, D.; et al. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition*; AVMA: Schaumburg, IL, USA, 2020; pp. 97–99.
18. Cruz, I.; Cañavate, C.; Rubio, J.M.; Morales, M.A.; Chicharro, C.; Laguna, F.; Jiménez-Mejías, M.; Sierra, G.; Videla, S.; Alvar, J. A Nested Polymerase Chain Reaction (Ln-PCR) for Diagnosing and Monitoring *Leishmania infantum* Infection in Patients Co-Infected with Human Immuno-Deficiency Virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96*, S185–S189. [CrossRef] [PubMed]
19. Echchakery, M.; Chicharro, C.; Boussaa, S.; Nieto, J.; Carrillo, E.; Sheila, O.; Moreno, J.; Boumezzough, A. Molecular Detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in Rodent Species from Endemic Cutaneous Leishmaniasis Areas in Morocco. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 454. [CrossRef] [PubMed]
20. Piarroux, R.; Fontes, M.; Perasso', R.; Gambarelli, F.; Joblet, C.; Dumon, H.; Quilici, M. Phylogenetic Relationships between Old World *Leishmania* Strains Revealed by Analysis of a Repetitive DNA Sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1995**, *73*, 249–252. [CrossRef] [PubMed]
21. Basic Local Alignment Search Tool. Available online: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (accessed on 20 May 2022).
22. Tamura, K.; Nei, M. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **1993**, *10*, 512–526.

23. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [CrossRef]
24. Palomo, L.J. The IUCN Red List of Threatened Species. 2022. Available online: https://www.iucnredlist.org/ (accessed on 16 July 2023).
25. Battisti, E.; Zanet, S.; Khalili, S.; Trisciuoglio, A.; Hertel, B.; Ferroglio, E. Molecular Survey on Vector-Borne Pathogens in Alpine Wild Carnivorans. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 1. [CrossRef]
26. Ortega, M.V.; Moreno, I.; Domínguez, M.; de la Cruz, M.L.; Martín, A.B.; Rodríguez-Bertos, A.; López, R.; Navarro, A.; González, S.; Mazariegos, M.; et al. Application of a Specific Quantitative Real-Time PCR (qPCR) to Identify *Leishmania infantum* DNA in Spleen, Skin and Hair Samples of Wild Leporidae. *Vet. Parasitol.* **2017**, *243*, 92–99. [CrossRef]
27. Souguir-Omrani, H.; Chemkhi, J.; Fathallah-Mili, A.; Saadi-BenAoun, Y.; BelHadjAli, I.; Guizani, I.; Guerbouj, S. *Paraechinus Aethiopicus* (Ehrenberg 1832) and *Atelerix Algirus* (Lereboullet 1842) Hedgehogs: Possible Reservoirs of Endemic Leishmaniases in Tunisia. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *63*, 219–230. [CrossRef] [PubMed]
28. Tomás-Pérez, M.; Khaldi, M.; Riera, C.; Mozo-León, D.; Ribas, A.; Hide, M.; Barech, G.; Benyettou, M.; Seghiri, K.; Doudou, S.; et al. First Report of Natural Infection in Hedgehogs with *Leishmania major*, a Possible Reservoir of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Algeria. *Acta Trop.* **2014**, *135*, 44–49. [CrossRef] [PubMed]
29. Chemkhi, J.; Souguir, H.; Bel, I.; Ali, H.; Driss, M.; Guizani, I.; Guerbouj, S. Natural Infection of Algerian Hedgehog, *Atelerix algirus* (Lereboullet 1842) with *Leishmania* Parasites in Tunisia. *Acta Trop.* **2015**, *150*, 42–51. [CrossRef] [PubMed]
30. Muñoz-Madrid, R.; Belinchón-Lorenzo, S.; Iniesta, V.; Fernández-Cotrina, J.; Parejo, J.C.; Serrano, F.J.; Monroy, I.; Baz, V.; Gómez-Luque, A.; Gómez-Nieto, L.C. First Detection of *Leishmania infantum* Kinetoplast DNA in Hair of Wild Mammals: Application of qPCR Method to Determine Potential Parasite Reservoirs. *Acta Trop.* **2013**, *128*, 706–709. [CrossRef]
31. Ruiz-Fons, F.; Ferroglio, E.; Gortázar, C. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004–2010. *Eurosurveillance* **2013**, *18*, 20541. [CrossRef] [PubMed]
32. Azami-Conesa, I.; Martínez-Díaz, R.A.; González, F.; Gómez-Muñoz, M.T. First Detection of *Leishmania infantum* in Common Urban Bats *Pipistrellus pipistrellus* in Europe. *Res. Vet. Sci.* **2020**, *132*, 172–176. [CrossRef] [PubMed]
33. Lachaud, L.; Marchergui-Hammami, S.; Chabbert, E.; Dereure, J.; Dedet, J.P.; Bastien, P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 210–215. [CrossRef]
34. Gomes, J.; Rocha, H.; Carvalho, C.; Bandeira, V.; Fonseca, C.; Rosalino, L.M.; Cunha, M.V. Molecular Detection and Characterization of *Leishmania infantum* in Free-Ranging Egyptian Mongoose (*Herpestes ichneumon*). *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2020**, *11*, 158–162. [CrossRef]
35. Kassahun, A.; Sadlova, J.; Benda, P.; Kostalova, T.; Warburg, A.; Hailu, A.; Baneth, G.; Volf, P.; Votypka, J. Natural Infection of Bats with *Leishmania* in Ethiopia. *Acta Trop.* **2015**, *150*, 166–170. [CrossRef]
36. Sobrino, R.; Ferroglio, E.; Oleaga, A.; Romano, A.; Millan, J.; Revilla, M.; Arnal, M.C.; Trisciuoglio, A.; Gortázar, C. Characterization of Widespread Canine Leishmaniasis among Wild Carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* **2008**, *155*, 198–203. [CrossRef]
37. Ramos, R.A.; Ramos, C.A.; Santos, E.M.; Araújo, F.R.; Carvalho, G.A.; Faustino, M.A.; Alves, L.C. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the Bone Marrow, Lymph Node and Spleen of Dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2013**, *22*, 346–350. [CrossRef]
38. Aschar, M.; de Oliveira, E.T.B.; Laurenti, M.D.; Marcondes, M.; Tolezano, J.E.; Hiramoto, R.M.; Corbett, C.E.P.; Da Matta, V.L.R. Value of the Oral Swab for the Molecular Diagnosis of Dogs in Different Stages of Infection with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* **2016**, *225*, 108–113. [CrossRef]
39. Pourmohammadi, B.; Mohammadi-Azni, S. Short Communication Molecular Detection of *Leishmania major* in *Hemiechinus auritus*: A Potential Reservoir of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Damghan, Iran. *J. Arthropod-Borne Dis.* **2019**, *13*, 334–343.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.4. OBJETIVO 4

Estudio sobre la utilidad de diversas dianas de PCR en relación con la sensibilidad y la especificad con el fin de confirmar la presencia de especies foráneas de *Leishmania* en la península ibérica.

4.4.1. RESUMEN

En las parasitosis transmitidas por artrópodos, la presencia de los vectores es el factor determinante para que el parásito esté presente y se transmita en una región geográfica determinada y, esto, en las últimas décadas, ha tomado una importancia mayor debido al cambio climático, que tiene como consecuencia el aumento del número de vectores, y a la globalización, que generan una dispersión de personas, animales, objetos y, por ende, de vectores. Esta situación, ha sido puesta de manifiesto por numerosos autores en el caso de los vectores de *Leishmania* spp. en la península ibérica, donde es ya habitual encontrar especies de flebotomos capaces de transmitir diferentes especies del parásito, como son *Phlebotomus sergenti* y *P. papatasi*, vectores de *L. tropica* y *L. major* respectivamente (Berriatua et al., 2023; Cunze et al., 2019). Sin embargo, hasta el momento solo se habían descrito unos pocos casos de leishmaniosis cutánea importada, causada por *L. tropica*, en personas que habían viajado a Marruecos (Knöpfel et al., 2018), pero en ningún caso existe evidencia de transmisión autóctona de una especie diferente a la endémica *L. infantum*. Cabe destacar que son varios los países vecinos donde otras especies de *Leishmania* son habituales y causan numerosas infecciones tanto en humanos como en otros animales. Así sucede en Marruecos, Turquía y, de forma eventual, Grecia (Ait Kbaich et al., 2017; Frank et al., 1993; Tunalı & Özbilgin, 2023), por lo que no sería extraño hallar su presencia en España. En el último estudio realizado en la presente Tesis doctoral se detectó *L. tropica* en fauna silvestre autóctona en España. Se ha descrito que animales silvestres próximos genéticamente a los animales domésticos son capaces de albergar los mismos patógenos que estos últimos, como es el caso del gato montés (*Felis silvestris*), analizado en este estudio. Asimismo, esta especie ha sido descrita como hospedadora de *L. infantum* en la península ibérica con anterioridad, aunque en todos los estudios los animales analizados eras escasos (3 o 4 individuos) (Del Río et al., 2014; Oleaga et al., 2018; Risueño et al., 2018). Con relación a las dianas utilizadas en este estudio, se seleccionaron la *SSUrRNA* por su elevada sensibilidad, como ya se ha mencionado, además de la *ITS1* y la *hsp70* (heat shock protein 70). Estas dos últimas son altamente específicas, a la hora de diferenciar entre especies del parásito. En todos los casos, las muestras analizadas fueron piel de oreja y bazo (con la excepción de dos animales, donde esta última muestra no se encontraba en condiciones adecuadas). En esta ocasión se analizaron un total de 18 gatos monteses, procedentes de diversas provincias de Castilla y León y Castilla-La Mancha, de los cuales siete

fueron positivos a *Leishmania* spp. en muestras de oreja, empleando la diana *SSUrDNA* y donde dos fueron positivos también en bazo. De estos siete, 2 individuos fueron positivos a *L. infantum* tanto en oreja como en bazo¸ un animal fue positivo a *L. tropica* empleando las dianas *ITS1* y *hsp70* y otro individuo presentaba secuencias compatibles con *L. tropica* y *L. infantum*. De los tres animales restantes solo se obtuvo resultado positivo a la diana *SSUrRNA*, la cual tiene alta sensibilidad, pero no es capaz de diferenciar a nivel de especie.

Al igual que ocurre en los gatos domésticos analizados por otros autores, la piel de oreja resultó más sensible que el bazo, especialmente en los individuos con *L. tropica*, debido probablemente al tipo de leishmaniosis cutánea, propia de *L. tropica* (Baneth et al., 2022; Can et al., 2016). Este hallazgo supone la primera descripción de *L. tropica* en animales silvestres en la península ibérica, donde la transmisión autóctona de esta especie del parásito podría ser hoy en día una realidad.

4.4.2. PONENCIAS

- **Azami- Conesa, I**., Matas- Méndez, P., Pérez- Moreno, P., Carrión, J., Alunda, J.M., Mateo-Barrientos, M., Gómez- Muñoz, M.T. Primera descripción de *Leishmania tropica* en gato montés en España. SOCEPA 2024 - XXIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. Sevilla (España), del 2 al 5 de septiembre de 2024. Comunicación oral.

4.4.3. ARTÍCULO

- **Azami- Conesa, I.,** Matas- Méndez, P., Pérez- Moreno, P., Carrión, J., Alunda, J.M., Mateo-Barrientos, M., Gómez- Muñoz, M.T. (2024). Wildlife as a sentinel for pathogen introduction in non-endemic areas: Is *Leishmania tropica* circulating in wildlife in Spain? bioRxiv 2024.03.16.585353; DOI: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353. Prepint. (Disponible en Anexos)
- **Azami- Conesa, I.,** Matas- Méndez, P., Pérez- Moreno, P., Carrión, J., Alunda, J.M., Mateo-Barrientos, M., Gómez- Muñoz, M.T. (2024). Wildlife as a sentinel for pathogen introduction in non-endemic areas: first detection of *Leishmania tropica* in wildlife in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2024 (8259712), 1-10; DOI: https://doi.org/10.1155/2024/8259712.
  - Índice de impacto en 2023 (según el Journal Citation Reports- JCR): 3,5
  - Clasificación en 2023 en el área “Veterinary Sciences”: 11/ 167 (Q1)

Check for updates

Wiley
Transboundary and Emerging Diseases
Volume 2024, Article ID 8259712, 10 pages
https://doi.org/10.1155/2024/8259712

WILEY

Research Article

Wildlife as a Sentinel for Pathogen Introduction in Nonendemic Areas: First Detection of *Leishmania tropica* in Wildlife in Spain

Iris Azami-Conesa,[1,2] **Pablo Matas Méndez**,[3] **Paula Pérez-Moreno**,[1] **Javier Carrión**,[1] **José María Alunda**,[1] **Marta Mateo Barrientos**,[4] **and María Teresa Gómez-Muñoz**[1]

[1]*Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Sciences, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain*
[2]*Department of Health Sciences, Faculty of Biomedical and Health Sciences, Universidad Europea de Madrid, Villaviciosa de Odón, Madrid, Spain*
[3]*Faculty of Veterinary Sciences, University Alfonso X el Sabio, Villanueva de la Cañada, Madrid, Spain*
[4]*Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain*

Correspondence should be addressed to Marta Mateo Barrientos; mmateo14@ucm.es and María Teresa Gómez-Muñoz; mariateg@ucm.es

Received 2 April 2024; Revised 5 July 2024; Accepted 1 August 2024

Academic Editor: Nan-hua Chen

Copyright © 2024 Iris Azami-Conesa et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Leishmaniasis is a chronic global arthropod-borne zoonotic disease produced by several species of *Leishmania* with cutaneous, mucocutaneous, and visceral clinical manifestations. In Spain, only *Leishmania infantum* has been reported so far, although other species of *Leishmania*, such as *L. tropica* and *L. major*, are present in surrounding countries. The aim of this work is to analyze the occurrence of *Leishmania* spp. infection in European wildcats (*Felis silvestris*) as sentinels, including their genotypic characterization. Necropsies of 18 road-killed wildcats were conducted. Samples of ear skin and spleen were taken for DNA isolation and PCR of the highly sensitive *SSU-rDNA* target. Subsequent PCR tests were performed using more specific targets for the determination of *Leishmania* species: *hsp70* and *ITS1*. Positive samples were sequenced, and phylogenetic trees were constructed. Seven wildcats were found positive for *Leishmania* spp. Based on the *hsp70* and *ITS1* sequences, an animal was found to be infected only with *L. tropica* in ear skin samples, while two cats were found to be infected with *L. infantum* in both the ear skin and the spleen. In one animal, a clear sequence of *L. infantum* ITS1 and a sequence of *L. tropica hsp70* were obtained from the ear skin. Since *hsp70* and *ITS1* sequencing was not possible in three cats, the species of *Leishmania* infecting them was not determined. This is the first report of autochthonous infection with *L. tropica* in the Iberian Peninsula. Health care professionals, including physicians, dermatologists, and veterinarians, must be aware of this for a correct diagnosis, treatment, and management of possible coinfections.

1. Introduction

Leishmaniasis is a global zoonotic disease transmitted by the bite of phlebotomine insects, with more than 1,000,000 new cases of the cutaneous form and 30,000 new cases of the visceral form estimated every year, in 92 endemic countries [1]. The clinical presentation in humans is variable and includes cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL), visceral (VL), and post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). The disease is caused by several species of *Leishmania*, with the *L. donovani* complex, the *L. major* complex, and the *L. tropica* complex being the most frequent in Africa, Asia, southern Europe, South America, and the Middle East, while the *L. mexicana* complex, the *L. guyanensis* complex, and the *L. braziliensis* complex are the most diagnosed in the America. The CL form of the disease is the most common and is responsible for the stigmatization and social isolation of thousands of people, particularly women, while VL is usually lethal without treatment and is caused by *L. donovani* in Africa and Europe, and *L. infantum* in southern Europe, west and central Asia, and the Americas. MCL is characterized by the destruction of mucous tissue of the nose,

palate, and pharynx and can severely affect the daily life of thousands of people [2, 3]. Human leishmaniasis is more prevalent in low-income countries with displaced populations due to war, social, or economic conflicts and is classified by the WHO as a neglected tropical disease (NTD). This scenario makes early diagnosis and treatment of the disease, as well as the introduction of preventive measures, difficult [3].

In Europe, VL is caused by *L. infantum*, with humans and dogs as the target species. The infection is more prevalent in southern countries such as Portugal, Spain, Italy, and Greece. Dogs are heavily affected by this zoonotic species [4] and are considered the main reservoir. Human infections mainly affect immunocompromised patients (such as HIV+ or recipients of solid organ transplants) as well as occasional reports in elderly and children [5]. Several studies have stressed the paramount importance of wildlife in maintaining *Leishmania* infection [6, 7]. Wildcats (*Felis silvestris*) are susceptible to the same pathogens as domestic cats and therefore could be potential reservoirs for the infection. However, the studies conducted have been scarce [8, 9, 10] with a limited number of animals analyzed in each study ($n = 4$, $n = 3$, $n = 4$, respectively). The three studies identified *L. infantum* using a small fragment of kDNA or qPCR from the internal transcribed spacers-5.8 ribosomal DNA 2 (ITS2) regions.

Despite suitable bioclimatic conditions and vectors available for anthroponotic *L. tropica* (*Phlebotomus sergenti*) and *L. major* (*P. papatasi*) [11, 12], only *L. infantum* has been reported in the Iberian Peninsula [6, 12, 13]. However, *L. major* has recently been reported in a cat from Lisbon, Portugal [14]. Moreover, it is worth noting that *L. tropica* has been previously reported in Greece [15] and the three species (*L. infantum*, *L. tropica*, and *L. major*) are present in Morocco [16] as well as in other countries bordering Europe [17]. The availability of a larger number of wildcats allowed us to identify the presence of *Leishmania* in various tissues and genetically characterize the samples. The aim of this work is to analyze the occurrence of *Leishmania* spp. infection in wildcats as sentinels, including their genotypic characterization.

2. Materials and Methods

2.1. Animals, Samples, and Geographic Area. In this study, samples of 18 European wildcats (*F. silvestris*) that were killed on the road during 2022 and 2023 in the Spanish provinces of Ávila, Burgos, Ciudad Real, Guadalajara, Soria, and Valladolid, were analyzed. Samples from the skin and spleen were selected, since they are the preferred sites for CL and/or VL *Leishmania* amastigotes. All road-killed wildcats were included in the study period. Animals were transported to the wildlife recovery centers of Castilla y León (Burgos, Valladolid) and Castilla-La Mancha (Ciudad Real, Guadalajara), systematic necropsies were performed, and the presence/absence of lesions annotated. A portion of the ear skin and spleen was taken and frozen at −20°C for further processing. The dates, age, sex, and location (geographic coordinates where the dead animals were found) were included in the database.

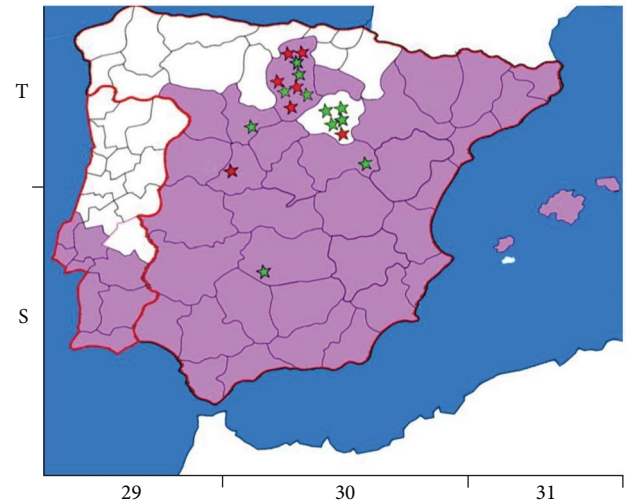


FIGURE 1: Map of the Iberian Peninsula with U.T.M. geographic coordinates. The purple area corresponds to the distribution of *P. sergenti* in 2022 and 2023 available at ECDC [18]. Red stars indicate the detection and identification of *Leishmania* spp. by *SSU-rDNA* sequences. Green stars indicate the absence of *Leishmania* spp. in the sampled cats.

2.2. Maps. The map shown in Figure 1 was created taking as reference the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) maps of distribution in Europe of *P. sergenti*, the main vector of *L. tropica*, in 2022 and 2023 [18] and the Universal Transverse Mercato (U.T.M.) geographic coordinates of the closest villages to where the wildcats analyzed in this study were found. The AutoCAD program (Autodesk® Inc., Landmark, San Francisco, CA, USA) was used to observe the overlaps between the two maps.

2.3. DNA Isolation. DNA was isolated from the spleen (10 mg) and the skin of the ears (20 mg) using the NZYTech Tissue gDNA isolation kit (NZYTech, Portugal) and following the manufacturer's instructions. DNA elution was performed in 60 μL of elution buffer instead of 100 μL to increase DNA concentration. The positive and negative controls were used in each batch of the experiment. The positive control consisted of samples derived from *L. major* (clone V1: MHOM/IL/80/Friedlin) or *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) promastigotes in culture (1×10^6 promastigotes), while the negative control consisted of water free of DNase. The DNA content was measured on a Multiskan GO microplate spectrophotometer with μDrop™ plates (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). DNA from cultures of *L. major* and *L. braziliensis* was used as internal controls for sequencing also. These two isolates were chosen because they were absent from Spain.

2.4. PCR of Small Subunit Ribosomal RNA (SSU-rDNA), Internal Transcribed Spacers-5.8 Ribosomal DNA 1 (ITS1), and Heat Shock Protein 70 (hsp70) Targets. DNA samples from the skin of the ear and spleen of the 18 cats were used for *Leishmania* DNA detection. DNA from different species of *Leishmania* was also used as an internal control for PCR and sequencing: *L. major* (clone V1: MHOM/IL/80/Friedlin)

tbed, 2024, 1, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2024/8259712 by Iris Azami-Conesa - SEA ORCHID (Thailand) , Wiley Online Library on [29/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

and *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904). Only samples with good DNA quality (absorbance ratio at 260/280 nm > 1.7) were used for all PCRs. All PCR conditions have been previously described and adapted to the working conditions recommended by the enzyme manufacturer (Supreme NZYTaq II 2x Master Mix, NZYTech, Lisbon, Portugal).

The SSU-rDNA target was chosen as the first PCR because of its higher sensitivity compared to other PCR targets. Nested PCRs (nPCR) to amplify a 358 bp fragment of the *SSU-rDNA* target were performed using primers R221 (5′-GGTTCCTTTCCTGATTTACG-3′) and R332 (5′-GGC CGGTAAAGGCCGAATAG-3′) for the outer section and primers R223 (5′-TCCATCGCAACCTCGGTT-3′) and R333 (5′-AAGCGGGCGCGGTGCTG-3′) for the inner section [19], following previously described conditions [20].

Primers L5.8S (5′-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3′) and LITSR (5′-CTGGATCATTTTCCGATG-3′) were used for the outer section of the nPCR for *ITS1* region and primers SAC (5′-CATTTTCCGATGATTACACC-3′) and VAN2 (5′-CGTTCTTCAACGAAATAGG-3′) were used for the inner section to amplify a fragment of 280–330 bp, which allows species determination, as previously described [20, 21].

The nPCR used for *hsp70* amplified a fragment of 741 bp and was based on the primers and methods previously described for phylogenetic purposes [14, 22]. Briefly, the external primers HSP70-F25 (5′-GGACGCCGGCACGAT TKCT-3′) and HSP70-R1310 (5′-CCTGGTTGTTGTTCAG CCACTC-3′) were used at 0.8 μM each, and the internal primers HSPF (5′-GACAACCGCCTCGTCACGTTC-3′) and HSPR (5′-GTCGAACGTCACCTCGATCTGC-3′) were used at 0.4 μM each. In the first PCR, 40 cycles of 94°C for 40 s, 61°C for 60 s, and 72°C for 120 s were used, while in the second PCR, 40 cycles of 94°C for 40 s, 61°C for 60 s, and 72°C for 60 s were used.

All PCR reactions were performed in 25 μL using 12.5 μL of Supreme NZYTaq II 2x Master Mix. An initial step of 95°C for 5 min to activate the enzyme and a final elongation step of 72°C for 10 min to allow the elongation of the PCR products were used in all PCR reactions. In the first PCR, 5 μL of DNA was used, while in the second PCR reactions, 5 μL of a 1 : 50 dilution of each first PCR product were used for *hsp70*, while a 1 : 40 dilution of the first PCR product was used for *SSU-rDNA* and *ITS1*. The results of nPCR were visualized on 1% agarose gels stained with SYBR™ safe DNA gel staining (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) under UV light.

2.5. Sequencing and Alignment. Samples containing the amplicons of the expected size were sent to the facilities of Macrogen Spain (Madrid, Spain) for Sanger sequencing in forward and reverse directions. The resulting sequences were aligned using Molecular Evolutionary Genetics Analysis v.11 software (MEGA XI) [23] and FinchTV 1.4.0 software (Geospiza, Inc.; Seattle, WA, USA), manually checked, and subjected to BLAST analysis using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; National Library of Medicine, Rockville, MD, USA). Only sequences with more than 150 bp that were clear in both directions were sent to GenBank for accession numbers. PCR and sequencing were repeated at least twice for each sample to ensure results.

2.6. Phylogenetic Trees. Phylogenetic trees were constructed using the sequences obtained in the present study and other sequences available from GenBank. Only the trees for *hsp70* and *ITS1* are shown because the *SSU-rDNA* target is a conserved region and only a difference of 1–2 bp was observed between the sequences obtained. In all trees, a sequence from *Trypanosoma cruzi* was included as an outgroup reference. Additionally, other sequences of *Leishmania* spp. from GenBank and sequences from *L. infantum* and the species of *Leishmania* mentioned above were included from cultures to verify similarity (*L. major* and *L. braziliensis*). The sequences had a minimum length of 292 nucleotides for the *ITS1* region and 635 nucleotides for *hsp70*. Evolutionary history was inferred using the maximum likelihood method based on the Tamura–Nei model [24]. The tree with the highest logarithmic likelihood was displayed. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together was shown next to the branches. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying the neighbor-joining and BioNJ algorithms to a pairwise distance matrix estimated using the maximum composite likelihood (MCL) approach and selecting the topology with the superior log-likelihood value. The trees were drawn to scale, and the lengths of the branches were measured on the basis of the number of substitutions per site. The analysis included 13–18 nucleotide sequences depending on the tree. The included codon positions were 1st + 2nd + 3rd + noncoding. All positions that contained gaps and missing data were eliminated. Evolutionary analyzes were conducted via MEGA XI [23]. A bootstrap of 2,000 replicates was used to assess the reliability of the trees.

2.7. Statistical Analysis. A descriptive statistical analysis with absolute (n) and relative frequency of infection (%) was carried out, with a confidence level of 95%, using the free online tool WinEpi (Working in Epidemiology) and considering that the diagnostic techniques used were perfect (nPCR of the *SSUrDNA*). Odds ratio analysis was used to analyze the risk factors "sex" and "*Leishmania* infection" [25].

3. Results

3.1. Detection and Identification of Leishmania spp. in Wildcats. In this study, samples of the ear skin and spleen of 18 wildcats were analyzed, except for the spleen of two animals that were in poor condition when the cats were found (Table 1). None of the animals showed lesions comparable to those produced by *Leishmania* infections. Taking into account all animals positive for *Leishmania* PCR, 38.89% (16.37%–61.41% and 95% confidence interval) were found to be infected. A nonsignificant higher proportion of infection was found in males (OR = 27.17, 95% CI: 0.33, 2213.63), since only males were found infected, but we must consider that we obtained a smaller number of samples from females ($n = 3/18$).

tbed, 2024, 1, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2024/8259712 by Iris Azami-Conesa - SEA ORCHID (Thailand) , Wiley Online Library on [29/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Table 1: Age, sex, U.T.M. geographic coordinates, date of collection, and *Leishmania* infection of the studied wildcats.

Sample	Age	Sex	Date	U.T.M. geographic coordinates	*Leishmania* infection
262	Adult	M	20-04-2022	30T 439302, 4683502	+
263	Adult	M	21-04-2022	30T 308223, 4488924	+
268	Adult	M	22-06-2022	30T 438633, 4729501	+
272	Adult	M	13-07-2022	30T 370885, 4584961	−
275	Adult	M	15-07-2022	30T 427252, 4615635	+
276	Adult	M	15-07-2022	30T 510221, 4613053	−
310	Adult	M	21-12-2022	30T 538981, 4592797	−
317	Adult	M	24-02-2023	30T 455150, 4702613	−
318*	Adult	M	13-03-2023	30T 397133, 4707688	+
319	Adult	F	13-03-2023	30T 464371, 4722997	−
320	Adult	M	23-03-2023	30T 548263, 4605806	−
323	Adult	M	28-04-2023	30T 544058, 4577807	+
365	Adult	M	08-09-2023	30T 480564, 4725184	+
366	Adult	M	08-09-2023	30T 553424, 4621448	−
367	Adult	F	08-09-2023	30T 457990, 4653201	−
375	Adult	M	05-10-2023	30S 386031, 4251590	−
376	Adult	F	05-10-2023	30T 401098, 4678137	−
378*	Adult	nd	05-10-2023	30T 592304, 4494125	−

*Spleen not analyzed. M, male; F, female; nd, not determined.

Table 2: Results of endpoint PCR using samples from the ear skin and spleen and three targets for the amplification of *Leishmania* DNA.

Sample	Ear skin			Spleen		
	SSU-rDNA	*ITS1*	*hsp70*	*SSU-rDNA*	*ITS1*	*hsp70*
262	+	−	−	−	−	−
263	+	$+^{2}$	$+^{4}$	+	$+^{2}$	$+^{4}$
268	+	$+^{2}$	$+^{3}$	−	−	−
275	+	$+^{1}$	$+^{3}$	−	−	−
318	+	−	−	nd	nd	nd
323	+	$+^{2}$	$+^{4}$	+	$+^{2}$	$+^{4}$
365	+	−	−	−	−	−

Sequence identities are identified with super index numbers (1–4). nd, not determined; 1, *ITS1* sequence 100% identity with *L. tropica*; 2, *ITS1* sequence 100% identity with *L. infantum*; 3, *hsp70* sequence 99.86%–100% identity with *L. tropica*; and 4, *hsp70* sequence 99.24%–100% identity with *L. infantum*.

All *Leishmania* spp. infected animals were found in areas where *P. sergenti*, the main vector of *L. tropica* was identified, except for one animal in which *L. infantum* was determined in both ear skin and spleen (Figure 1).

Seven of the 18 animals were found to be positive by *Leishmania* PCR for *SSU-rDNA*. All were positive on the skin of the ears, and only two were also positive in the spleen samples (Table 2).

3.2. Sequences and GenBank Accession Numbers. The nucleotide sequences obtained in this study were deposited in the GenBank database under accession numbers PP389513-PP389521 for *SSU-rDNA*, PP177368-PP177373 for *ITS1*, and PP397157-PP397162 for *hsp70*. Sequences from *L. major* and *L. braziliensis* isolates were deposited in the GenBank database with accession numbers PP389522, PP389523, and PP389533.

The sequences obtained from *SSU-rDNA* had 295–327 bp and differ by only one or two nucleotide positions. Nine sequences were obtained from the animals analyzed, seven from the skin of the ears, and two from the spleen. All of them displayed 100% query coverage and 99.69%–100% identity with other *Leishmania* spp. sequences available at GenBank, including *L. infantum* and *L. tropica*, among other species (accession numbers MN757921and KF302745).

ITS1 sequences of 236–247 bp were obtained from the ear skin of four animals (263, 268, 275, and 323), two of which (263 and 323) also gave sequences when DNA from the spleen was used (Table 2). Three sequences displayed 100% query coverage and 100% identity with sequences from *L. infantum* (accession number MT416168, samples from ear skin of animals 263, 268, and 323, and samples from spleen of animals 263 and 323), while one sequence (from wildcat 275 ear skin) displayed 100% query coverage and 100% identity with sequences from *L. tropica* (accession number MH595857, isolate R24, Iran).

Sequences obtained from *hsp70* amplification yielded four sequences from the ear skin and two sequences from

tbed, 2024, 1, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2024/8259712 by Iris Azami-Conesa - SEA ORCHID (Thailand) , Wiley Online Library on [29/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

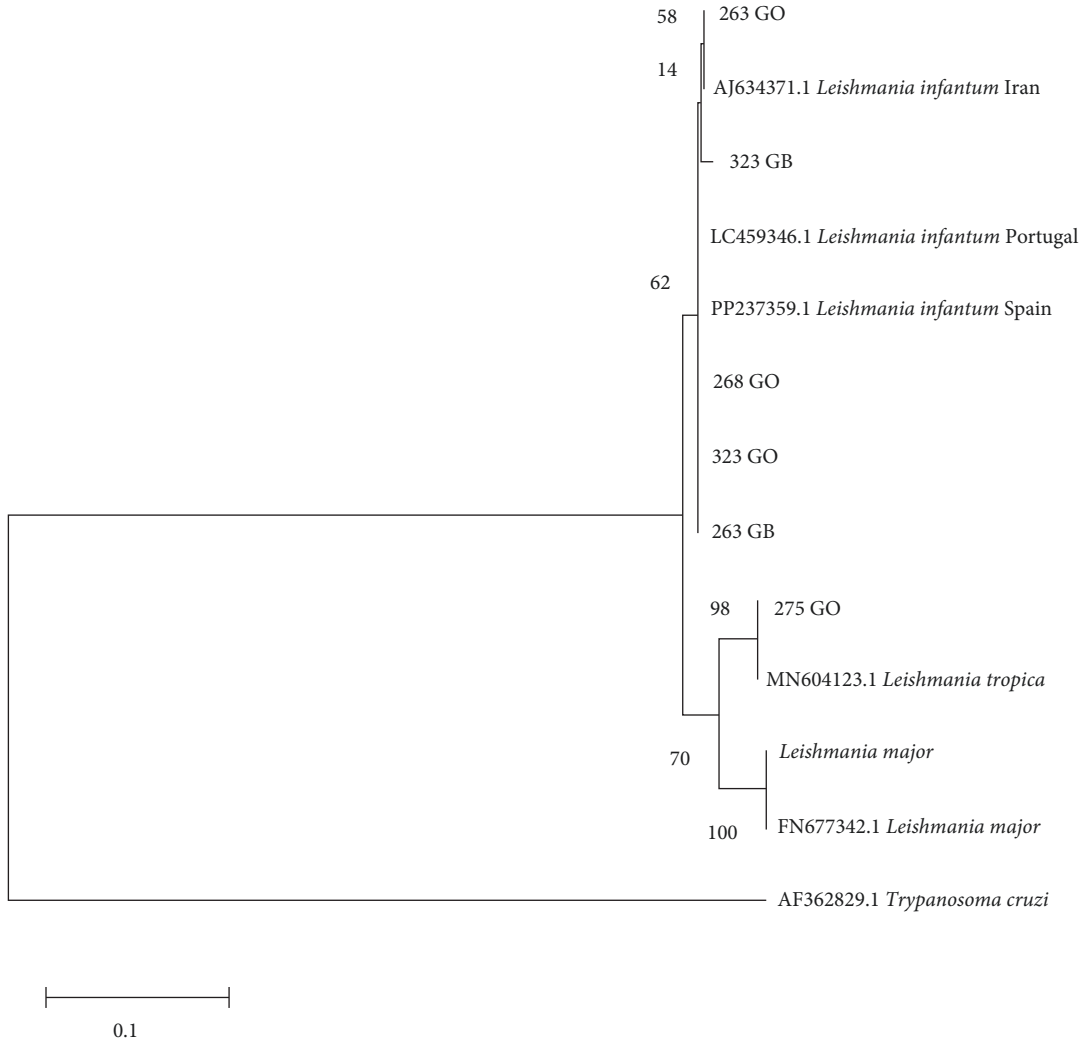


FIGURE 2: Phylogenetic tree of the *ITS1* region. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method and the Tamura–Nei model. The tree with the highest logarithmic likelihood (−828.31) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. This analysis involved 13 nucleotide sequences. There were a total of 293 positions in the final data set. GB, sample of the spleen; GO, sample from the skin of the ear.

the spleen with 635–711 bp. Of these, four sequences showed 100% coverage and 99.24%–100% identity with *L. infantum* (accession number OR136937, strain MHOM/IT/99/ISS1898). Sequences 275 from the ear skin showed 100% coverage and 100% identity with *L. tropica* (accession number MK335938, voucher ISS3183), while sequence obtained from the ear skin of 268 showed 100% coverage and 99.86 identity with *L. tropica* (acc. n LN907846, strain MHOM/IL/80/SINGER and others) and 99.72% identity with *L. donovani* (accession numbers MH202961 and JX021427; Table 2). Double peaks were observed at three and five positions of the sequences of the spleen of animal 323 and the skin of the ears of animal 263, respectively, indicating mixed sequences.

It is noteworthy to point out that *Leishmania* DNA was not detected by none of the three PCR methods in the spleens of cats with cutaneous infection with *L. tropica*. In one animal (275), the sequences from the *ITS1* and *hsp70* targets showed 100% identity with *L. tropica*. Two animals displayed sequences compatible with *L. infantum* on the skin of the ears and the spleen (263 and 323), and another wildcat was positive only on the skin of the ears with sequences compatible with *L. infantum* and *L. tropica* (268). Finally, in three animals (262, 318, and 365), the sequences could only be assigned to the *Leishmania* genus because they were only positive for *SSU-rDNA* (Table 2).

3.3. Phylogenetic Trees. Phylogenetic analysis of the sequences shows strong support for the clusters found with the two targets, in agreement with the percentage of identity of the sequences obtained. *ITS1* sequences from this study were grouped with *L. infantum* (samples 263, 268, and 323 from the skin of the ears and samples 263 and 323 from the spleen) or *L. tropica* (sample 275; Figure 2).

In the phylogenetic tree generated with the *hsp70* sequences obtained in the present study, two of them (samples 268 and 275 from the ear skin) clustered with *L. tropica*

tbed, 2024, 1, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2024/8259712 by Iris Azami-Conesa - SEA ORCHID (Thailand) , Wiley Online Library on [29/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

and three of them (samples 263 and 323 from the ear skin and 263 spleen) clustered with *L. infantum* sequences recovered from GenBank (Figure 3). One of the *L. tropica* sequences was obtained from the same animal (275) that rendered the *L. tropica ITS1* sequence, while the other *L. tropica hsp70* sequence was obtained from an animal (268) that rendered the *L. infantum ITS1* sequence.

4. Discussion

In the present study, seven out of 18 wildcats (38.89%) were found to be positive for *Leishmania* infection, a value consistent with those found in previous studies [8, 10] although lower than the infection prevalence reported by Oleaga et al. [9] with all three wildcats tested being positive for *Leishmania*. *L. infantum* is endemic in the Iberian Peninsula [12, 13], but no infections of *L. tropica* in autochthonous species have been reported. Even considering the limitations of the study, including the low parasitic loads commonly found in wildlife and the number of animals, the information is of value, taking into account that the population of wildcats in Spain is considered relict and they are animals difficult to see unless they are sick or death, which is the case [26].

The risk of introduction of *L. tropica* in the Iberian Peninsula has been highlighted several times, considering the presence and distribution of the main vector, *P. sergenti*, and the identification in Spain of one genetic line of *P. sergenti* commonly found in Morocco [27, 28] where CL by *L. tropica* is endemic [21, 29, 30]. Large areas in Europe are considered suitable for *L. tropica* [11], and hot spots for foci of *L. tropica* have been suggested [27]. In addition, the possibility of *L. tropica* transmission by *P. perniciosus* has been pointed out [31, 32].

The most common targets used for the detection of *Leishmania* spp. infection are *SSU-rDNA* and kDNA with similar values of sensitivity [6]. However, other targets are useful for phylogenetic studies and determination of *Leishmania* spp., such as *ITS1*, *cytB*, *g6pdh*, and *hsp70* [14, 20, 21, 22, 29, 33, 34]. In the present study, *ITS1* and *hsp70* have been used to confirm the finding of *L. tropica* in autochthonous fauna, and sequences of *L. tropica* with *ITS1* and *hsp70* targets are reported. *L. tropica sequences* were detected in at least two wildcats positive for PCR with targets *hsp70* and/or ITS1, widely used for phylogenetic studies. Our finding extends the reported presence of the species in Greece [15] and extends its distribution to the Iberian Peninsula for the first time.

The isolation of alive *Leishmania* was not feasible considering the source of material, but it is also noteworthy that in our study the skin samples of the ears showed more positive results than the spleen samples ($n = 7/18$ vs. $n = 2/16$). This finding is consistent with the fact that *L. tropica* infections are primarily associated with clinical forms of skin in humans, where the persistence of the parasite is close to the site of natural infections transmitted by the sandfly, although the parasite can also be found less frequently associated with VL, mainly in immune suppressed people [35]. Imported CL cases from *L. tropica* have been sporadically reported in Spain after travelling to Morocco [36], but no previous autochthonous cases have been reported in Spain or Portugal. Apparently, *L. tropica* is expanding its distribution, and the main risk factor for the appearance of the disease is the presence of the vector [37]. It should be noted that some of the wildcats came from latitudes over 42° N (e.g., animal 365, geographic coordinates U.T.M. 30T 480564, 4725184) and during the last decade, *P. sergenti* has expanded to the northern areas of the Iberian Peninsula, according to ECDC maps of distribution [18].

In endemic areas, such as Israel, domestic cats appear to be more susceptible to infection with *L. tropica* than dogs [38]. A study of stray cats in Turkey showed that all samples with *ITS1* amplification were infected with *L. tropica*, while only one was coinfected with *L. infantum* [39]. Similarly, in the present study, while one animal showed infection by *L. tropica* only, another wildcat showed *hsp70* and *ITS1* sequences consistent with coinfection by *L. infantum* and *L. tropica* or by a hybrid of *L. infantum* and *L. tropica*. Mixed infections with more than one *Leishmania* species have also been reported in other endemic areas, hosts, and *Leishmania* species, such as in Brazil (*L. infantum* and *L. braziliensis*) in one dog [40] and 8/30 dogs [41], rodents (10% of *L. infantum* and *L. braziliensis*) [42], hedgehogs (*L. major* and *L. infantum*) in 8/12 animals and another coinfected with *L. tropica* [43], and human clinical cases [44, 45] of the new world. The possibility of hybridization between *Leishmania* species cannot be ruled out, as *L. tropica* shows a higher rate of natural hybrid formation than other species [46]. Indeed, at least one natural hybrid of *L. donovani* and *L. aethiopica* has been described in Ethiopia employing *ITS1*, *hsp70*, and cysteine proteinase B (*cpb*) targets [47]. The authors suggested that hybridization could take place in a vector permissive to both species, as it has been described in *P. pernicious* for *L. infantum* and *L. tropica* [31, 32]. One hybrid of *L. infantum* and *L. major* was also described in a natural infection in Portugal [48]. However, to further investigate the existence of hybrids, isolates from infected animals are necessary [49, 50], and in our study, they could not be obtained [51].

5. Conclusions

This is the first report of *L. tropica* infection in autochthonous wildlife in the Iberian Peninsula, extending the presence of the species in continental Europe. The main vector of *L. tropica* has been identified in Spain during the last decade, and its distribution has increased northward each year. There are no conclusive data on the zoonotic transmission of *L. tropica*, and the actual spread of the infection to other species is not yet known and should be investigated. Our results support the sentinel value of wild species in the detection of previously unreported infections. In addition, the presence of *L. tropica* in Spain should be communicated to health professionals, including physicians, dermatologists, and veterinarians, considering that *L. tropica* can produce both CL and VL in humans and pets. Awareness of the

tbed, 2024, 1, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2024/8259712 by Iris Azami-Conesa - SEA ORCHID (Thailand) , Wiley Online Library on [29/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

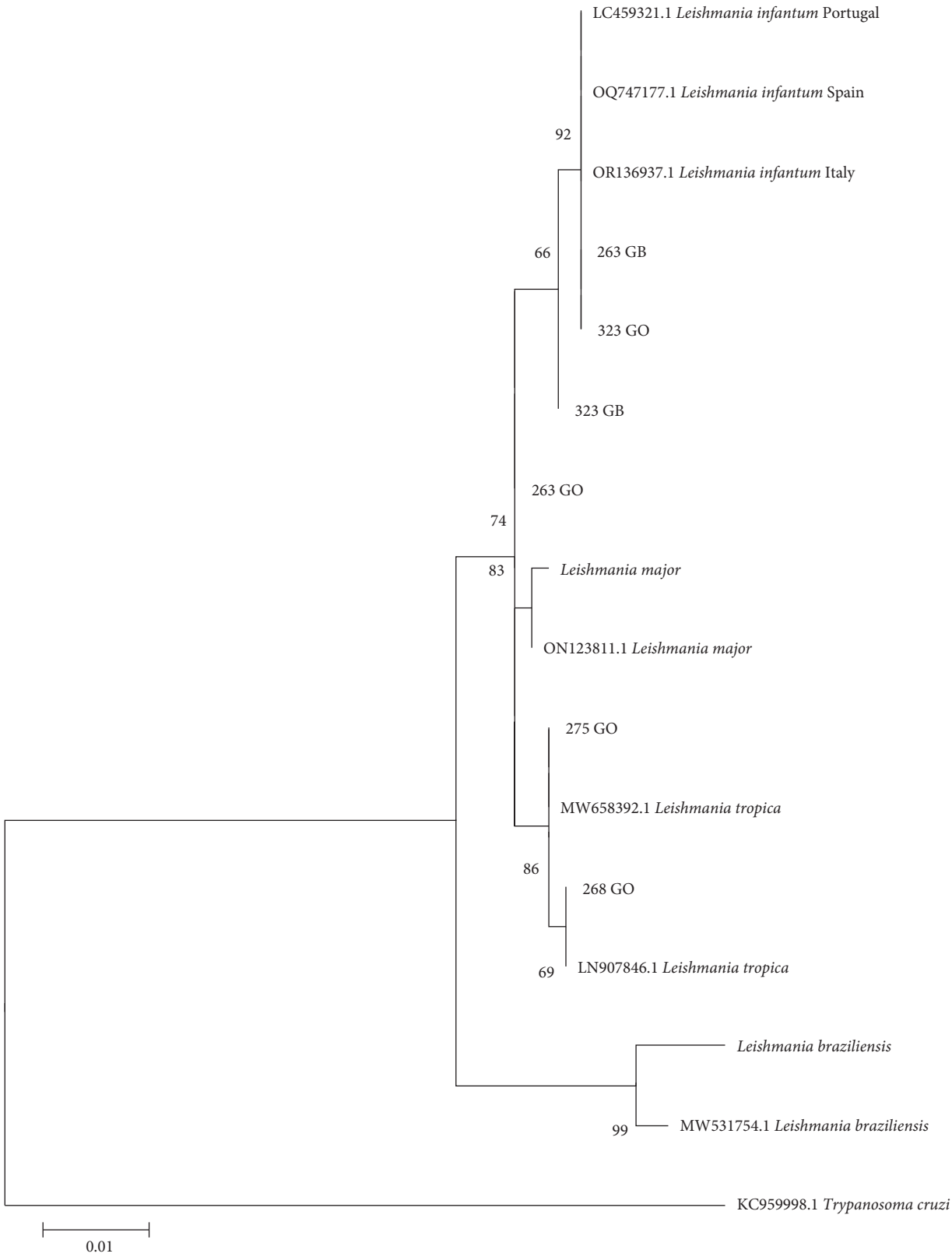


FIGURE 3: Phylogenetic tree of the *hsp70* region. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method and the Tamura–Nei model. The tree with the highest log-likelihood (−1,328.38) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. This analysis involved 16 nucleotide sequences. There were a total of 635 positions in the final dataset. Evolutionary analyzes were carried out in MEGA11. GB, sample of the spleen. GO, sample from the skin of the ear.

tbed, 2024, 1, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2024/8259712 by Iris Azami-Conesa - SEA ORCHID (Thailand) , Wiley Online Library on [29/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

possibility of *L. tropica* infections and *L. infantum*/*L. tropica* coinfections is necessary to ensure the appropriate diagnosis and management of clinical cases.

Data Availability

Sequences obtained in the present study have been deposited in the GenBank database under accession numbers: PP389513-PP389521 for *SSU-rDNA*, PP177368-PP177373 for *ITS1*, and PP397157-PP397162 for *hsp70*. The sequences of the isolates of *L. major* and *L. braziliensis* are PP389522, PP389523, and PP389533.

Ethical Approval

The use of samples for parasitological investigations was approved by regional authorisation of the Junta de Castilla y León, reference: "AB/is", File "AUES/CYL/001/2021," and of Castilla-La Mancha, reference: DGPFEN/SEN/avp_21_103_bis.

Disclosure

A preprint version of the manuscript with doi https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.03.16.585353v2 has been published on bioRxiv [51].

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflicts of interest with respect to the publication of this article.

Authors' Contributions

Marta Mateo Mateo Barrientos, Iris Azami-Conesa, and María Teresa Gómez-Muñoz contributed to conceptualization. Iris Azami-Conesa, Paula Pérez-Moreno, and María Teresa Gómez-Muñoz contributed to methodology and formal analysis. Marta Mateo Barrientos, Pablo Matas Méndez, and Javier Carrión contributed to collection of data and biological samples. Iris Azami-Conesa and María Teresa Gómez-Muñoz contributed to writing the original draft. Pablo Matas Méndez, Javier Carrión, Iris Azami-Conesa, Marta Mateo Barrientos, María Teresa Gómez-Muñoz, and José María Alunda contributed to interpretation of data. Marta Mateo Barrientos and María Teresa Gómez-Muñoz contributed to supervision. José María Alunda, Marta Mateo Barrientos, and María Teresa Gómez-Muñoz contributed to resources. All authors critically reviewed the manuscript, intellectually contributed to the content, and approved the final version. Marta Mateo Barrientos and María Teresa Gómez-Muñoz contributed equally to this work and share last authorship.

Acknowledgments

We deeply thank the cooperation of Junta de Castilla y León, Consejería de Fomento y Medio Ambiente, Dirección General de Patrimonio Natural y Política, and Castilla-La Mancha, Consejería de Desarrollo Sostenible, Dirección General de Medio Natural y Biodiversidad for permits to take samples of dead wildlife of the area. The research was partially funded by the ICPVet research group of UCM (grant GRFN17/21).

References

[1] WHO: health-topics/leishmaniasis, https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1[Internet].WHO:health-topics/leishmaniasis, 2024.

[2] M. Akhoundi, K. Kuhls, A. Cannet et al., "A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies," *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 10, no. 3, Article ID e0004349, 2016.

[3] "WHO: neglected diseases, leishmaniasis," 2023, https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html.

[4] A. Montoya, R. Gálvez, R. Checa et al., "Latest trends in *L. infantum* infection in dogs in Spain, Part II: current clinical management and control according to a national survey of veterinary practitioners," *Parasites & Vectors*, vol. 13, Article ID 205, 2020.

[5] D. A. Zacarias, N. Rolão, F. A. de Pinho et al., "Causes and consequences of higher *Leishmania infantum* burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients," *Tropical Medicine and International Health*, vol. 22, no. 6, pp. 679–687, 2017.

[6] I. Azami-Conesa, M. T. Gómez-Muñoz, and R. A. Martínez-Díaz, "A systematic review (1990-2021) of wild animals infected with zoonotic *Leishmania*," *Microorganisms*, vol. 9, no. 5, Article ID 1101, 2021.

[7] L. Cardoso, H. Schallig, M. F. Persichetti, and M. G. Pennisi, "New epidemiological aspects of animal leishmaniosis in europe: the role of vertebrate hosts other than dogs," *Pathogens*, vol. 10, no. 3, Article ID 307, 2021.

[8] L. Del Río, L. Chitimia, A. Cubas et al., "Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain," *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 113, no. 4, pp. 430–435, 2014.

[9] A. Oleaga, S. Zanet, A. Espí, M. R. Pegoraro de Macedo, C. Gortázar, and E. Ferroglio, "*Leishmania* in wolves in northern Spain: a spreading zoonosis evidenced by wildlife sanitary surveillance," *Veterinary Parasitology*, vol. 255, pp. 26–31, 2018.

[10] J. Risueño, M. Ortuño, P. Pérez-Cutillas et al., "Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain," *Veterinary Parasitology*, vol. 259, pp. 61–67, 2018.

[11] S. Cunze, J. Kochmann, L. K. Koch, K. J. Q. Hasselmann, and S. Klimpel, "Leishmaniasis in Eurasia and Africa: geographical distribution of vector species and pathogens," *Royal Society Open Science*, vol. 6, no. 5, Article ID 190334, 2019.

[12] E. Berriatua, P. Pérez-Cutillas, A. González Vidal, and O. Briët, "The spatial relationship between the presence and absence of *Leishmania* spp. and leishmaniasis, and phlebotomine sand fly vectors in Europe and neighbouring countries," 2023, European Centre for Disease Prevention and Control, https://www.ecdc.europa.eu.

[13] R. Gálvez, A. Montoya, I. Cruz et al., "Latest trends in *Leishmania infantum* infection in dogs in Spain, Part I: mapped seroprevalence and sand fly distributions," *Parasites & Vectors*, vol. 13, Article ID 204, 2020.

[14] A. Pereira, R. Parreira, J. M. Cristóvão et al., "Phylogenetic insights on *Leishmania* detected in cats as revealed by nucleotide sequence analysis of multiple genetic markers,"

tbed, 2024, 1, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2024/8259712 by Iris Azami-Conesa - SEA ORCHID (Thailand) , Wiley Online Library on [29/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Infection, Genetics and Evolution, vol. 77, Article ID 104069, 2020.

[15] C. Frank, M. Hadziandoniou, F. Pratlong, A. Garifallou, and J. A. Rioux, "*Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* responsible for cutaneous leishmaniasis in Greece: sixteen autochthonous cases," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 87, no. 2, pp. 184-185, 1993.

[16] A. M. Kbaich, I. Mhaidi, A. Ezzahidi et al., "New epidemiological pattern of cutaneous leishmaniasis in two pre-Saharan arid provinces, southern Morocco," *Acta Tropica*, vol. 173, pp. 11–16, 2017.

[17] V. Tunalı and A. Özbilgin, "Knock, knock, knocking on Europe's door: threat of leishmaniasis in Europe with a focus on Turkey," *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, vol. 4, no. 4, Article ID 100150, 2023.

[18] "European centre for disease prevention and control and European food safety authority," 2023, Phlebotomine sandflies maps [internet]. Stockholm: ECDC; 2022 https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/phlebotomine-maps [Internet].

[19] I. Cruz, C. Cañavate, J. M. Rubio et al., "A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immuno-deficiency virus," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 96, no. Supplement 1, pp. S185–S189, 2002.

[20] I. Azami-Conesa, J. Sansano-Maestre, R. A. Martínez-Díaz, and M. T. Gómez-Muñoz, "Invasive species as hosts of zoonotic infections: the case of American mink (*Neovison vison*) and *Leishmania infantum*," *Microorganisms*, vol. 9, no. 7, Article ID 1531, 2021.

[21] M. Echchakery, C. Chicharro, S. Boussaa et al., "Molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in rodent species from endemic cutaneous leishmaniasis areas in Morocco," *Parasites & Vectors*, vol. 10, no. 1, Article ID 454, 2017.

[22] G. Van der Auwera, I. Maes, S. De Doncker et al., "Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics," *Eurosurveillance*, vol. 18, no. 30, Article ID 20543, 2013.

[23] K. Tamura, G. Stecher, and S. Kumar, "MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis Version 11," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027, 2021.

[24] K. Tamura and M. Nei, "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 10, no. 3, pp. 512–526, 1993.

[25] Win Epi, "Working in epidemiology," 2024, Ignacio de Blas. [Internet] Accesed on January 9th http://www.winepi.net/.

[26] J. M. López-Martín, F. J. García, A. Such et al., "Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España," 2007, Dirección General para la Biodiversidad -SECEM-SECEMU, Madrid. [Internet]. [cited 2023 Dec 6]. Available from: https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario-especies-terrestres/inventario-nacional-de-biodiversidad/ieet_mamif_atlas.html.

[27] S. D. Barón, F. Morillas-Márquez, M. Morales-Yuste et al., "Predicting the risk of an endemic focus of *Leishmania tropica* becoming established in south-western Europe through the presence of its main vector, *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917," *Parasitology*, vol. 140, no. 11, pp. 1413–1421, 2013.

[28] G. Merino-Espinosa, V. Corpas-López, R. Callejón-Fernández et al., "Differential ecological traits of two *Phlebotomus sergenti* mitochondrial lineages in southwestern Europe and their epidemiological implications," *Tropical Medicine & International Health*, vol. 21, no. 5, pp. 630–641, 2016.

[29] S. El Kacem, M. Ait Kbaich, O. Daoui et al., "Multilocus sequence analysis provides new insight into population structure and genetic diversity of *Leishmania tropica* in Morocco," *Infection Genetics and Evolution*, vol. 93, Article ID 104932, 2021.

[30] I. El Idrissi Saik, C. Benlabsir, H. Fellah, M. Lemrani, and M. Riyad, "Transmission patterns of *Leishmania tropica* around the Mediterranean basin: could Morocco be impacted by a zoonotic spillover?" *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 16, no. 1, Article ID e0010009, 2022.

[31] G. Bongiorno, T. Di Muccio, R. Bianchi, M. Gramiccia, and L. Gradoni, "Laboratory transmission of an Asian strain of *Leishmania tropica* by the bite of the southern European sand fly *Phlebotomus perniciosus*," *International Journal for Parasitology*, vol. 49, no. 6, pp. 417–421, 2019.

[32] S. Vaselek and P. Volf, "Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus tobbi* with different *Leishmania tropica* strains," *International Journal for Parasitology*, vol. 49, no. 11, pp. 831–835, 2019.

[33] I. Mohammadpour, G. R. Hatam, F. Handjani, F. Bozorg-Ghalati, D. PourKamal, and M. H. Motazedian, "*Leishmania* cytochrome b gene sequence polymorphisms in southern Iran: Relationships with different cutaneous clinical manifestations," *BMC infectious diseases*, vol. 19, Article ID 98, 2019.

[34] A. Fernández-Arévalo, C. Ballart, J. Muñoz-Basagoiti et al., "Autochthonous and imported tegumentary leishmaniasis in Catalonia (Spain): Aetiological evolution in the last four decades and usefulness of different typing approaches based on biochemical, molecular and proteomic markers," *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 69, no. 3, pp. 1404–1418, 2022.

[35] M. Maroli, M. D. Feliciangeli, L. Bichaud, R. N. Charrel, and L. Gradoni, "Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern," *Medical and Veterinary Entomology*, vol. 27, no. 2, pp. 123–147, 2013.

[36] N. Knöpfel, L. Noguera-Morel, D. Azorin, F. Sanz, A. Torrelo, and A. Hernández-Martín, "Cutaneous *Leishmania tropica* in children: report of three imported cases successfully treated with liposomal amphotericin B," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 32, no. 1, pp. e8–10, 2018.

[37] P. Gijón-Robles, N. Abattouy, G. Merino-Espinosa et al., "Risk factors for the expansion of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania tropica*: Possible implications for control programmes," *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 65, no. 6, pp. 1615–1626, 2018.

[38] G. Baneth, Y. Nachum-Biala, O. Adamsky, and I. Gunther, "*Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* infection in dogs and cats in central Israel," *Parasites & Vectors*, vol. 15, Article ID 147, 2022.

[39] H. Can, M. Döşkaya, H. G. Özdemir et al., "Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey," *Experimental Parasitology*, vol. 167, pp. 109–114, 2016.

[40] M. F. Madeira, A. Schubach, T. M. P. Schubach et al., "Mixed infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania*

tbed. 2024, 1, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2024/8259712 by Iris Azami-Conesa - SEA ORCHID (Thailand) , Wiley Online Library on [29/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

(*Leishmania*) *chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil," *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 100, no. 5, pp. 442–445, 2006.

[41] N. Alves Souza, R. Souza Leite, S. de Oliveira Silva et al., "Detection of mixed *Leishmania* infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil," *Acta Tropica*, vol. 193, pp. 12–17, 2019.

[42] E. de Castro Ferreira, I. Cruz, C. Cañavate et al., "Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World," *BMC Veterinary Research*, vol. 11, Article ID 71, 2015.

[43] H. Souguir-Omrani, J. Chemkhi, A. Fathallah-Mili et al., "*Paraechinus aethiopicus* (Ehrenberg 1832) and *Atelerix algirus* (Lereboullet 1842) hedgehogs: possible reservoirs of endemic leishmaniases in Tunisia," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 63, pp. 219–230, 2018.

[44] S. Shirian, A. Oryan, G. R. Hatam, and Y. Daneshbod, "Mixed mucosal leishmaniasis infection caused by *Leishmania tropica* and *Leishmania major*," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, no. 11, pp. 3805–3808, 2012.

[45] A. Badirzadeh, M. Mohebali, S. Sabzevari et al., "Case report: first coinfection report of mixed *Leishmania infantum*/*Leishmania major* and human immunodeficiency virus-acquired immune deficiency syndrome: report of a case of disseminated cutaneous leishmaniasis in Iran," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 98, no. 1, pp. 122–125, 2018.

[46] I. Louradour, T. R. Ferreira, K. Ghosh, J. Shaik, and D. Sacks, "In vitro generation of *Leishmania* Hybrids," *Cell Report*, vol. 31, no. 2, Article ID 107507, 2020.

[47] S. Odiwuor, S. De Doncker, I. Maes, J. C. Dujardin, and G. Van der Auwera, "Natural *Leishmania donovani*/*Leishmania aethiopica* hybrids identified from Ethiopia," *Infection Genetics and Evolution*, vol. 11, no. 8, pp. 2113–2118, 2011.

[48] C. Ravel, S. Cortes, F. Pratlong, F. Morio, J.-P. Dedet, and L. Campino, "First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*," *International Journal for Parasitology*, vol. 36, no. 13, pp. 1383–1388, 2006.

[49] A. Ozbilgin, G. Culha, F. Y. Zeyrek et al., "Cutaneous and visceral tropisms of *Leishmania tropica*/*Leishmania infantum* hybrids in a murine model: First report of hybrid *Leishmania* strains isolated in Turkey," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 16, Article ID e165, 2012.

[50] F. Bruno, G. Castelli, B. Li et al., "Genomic and epidemiological evidence for the emergence of a putative *L. infantum* hybrid with unusual epidemiology in Northern Italy," *mBio*, vol. 15, no. 7, Article ID e0099524, 2024.

[51] I. Azami-Conesa, P. Matas Méndez, P. Pérez-Moreno et al., "Wildlife as a sentinel for pathogen introduction in nonendemic areas: first detection of *Leishmania tropic*a in wildlife in Spain," BiorXiv, 2024.

tbed, 2024, 1, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2024/8259712 by Iris Azami-Conesa - SEA ORCHID (Thailand) , Wiley Online Library on [29/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

CAPÍTULO 5:
DISCUSIÓN

5.1. DISCUSIÓN INTEGRADORA

El carácter zoonótico de la leishmaniosis, entre otros motivos, hace que sean muy numerosas las investigaciones llevadas a cabo sobre esta parasitosis, incluyendo estudios sobre el organismo, el ciclo biológico o los vectores. Sin embargo, es menos conocido el papel que la fauna silvestre, lo que genera un amplio campo de estudio poco explorado aún. Por ello, en esta Tesis Doctoral se han seleccionado animales silvestres residentes en España, cuyas áreas de distribución permiten la interacción con los humanos, los animales domésticos y los flebotomos. Además, se ha pretendido estudiar diferentes dianas de ADN para contribuir al análisis de las muestras de una manera más eficaz, seleccionando a su vez tejidos donde se cree más probable la detección del parásito. Asimismo, el análisis de varias regiones de ADN permite también detectar especies de *Leishmania* que no se han descrito anteriormente circulando en fauna autóctona en la península ibérica, más allá de los casos importados en humanos.

5.1.1. ANIMALES SILVESTRES COMO POTENCIALES RESERVORIOS DE *LEISHMANIA* SPP.

El enfoque One Health ha ganado un gran peso en los últimos años en la investigación sanitaria, poniendo de manifiesto la importancia de las interrelaciones existentes entre el humano, los animales y el ambiente, así como la necesidad de realizar estudios multidisciplinares para obtener resultados que abarquen todos estos campos. En el caso concreto de la leishmaniosis, esta aproximación incluye el análisis de los distintos factores que pueden influir en la epidemiología y dispersión de estos organismos, como los distintos vectores, el efecto del cambio climático y el papel que juega la fauna silvestre (Blake & Betson, 2016; Hong et al., 2020; Martín-Sánchez et al., 2020a).

Algunos estudios analizan el potencial papel de los animales silvestres en el ciclo de *Leishmania*, tanto en Europa como en otros continentes. Sin embargo, son muchos los aspectos que se desconocen y, sobre todo, muchas las técnicas y tipo de muestras analizadas, lo que dificulta aún más el trabajo con estos individuos (Roque & Jansen, 2014). A esto debemos sumar el escaso acceso a muestras en buenas condiciones de los animales silvestres, ya que solo una mínima parte ingresan en centros de recuperación de fauna o son recogidos por las autoridades competentes tras su muerte, por lo que, en general, estos estudios suelen contar con un número de muestras limitado o se deben alargar durante varios años para poder obtener un número significativo de animales. En el caso de la presente Tesis, se ha contado con la afortunada colaboración de varios centros de recuperación de fauna, lo que ha permitido tener acceso a diversas especies de animales, entre ellos el murciélago común urbano (*P. pipistrellus*). Otras especies de murciélago han sido analizadas en América del Sur y África

(Berzunza-Cruz et al., 2015; De Castro Ferreira et al., 2017; De Lima et al., 2008; Kassahun et al., 2015) pero en Europa no se había demostrado la presencia de *Leishmania* en estos animales, a pesar de la existencia de un estudio anterior, donde Millán et al. (2014b) analizaron varios ejemplares de *Miniopterus schreibersii* sin obtener resultados positivos a *L. infantum*. En nuestro caso, un 59,2% de los individuos analizados presentaron ADN de *L. infantum* al menos en una de las muestras analizadas (bazo, pelo abdominal y coágulo de sangre de corazón) (Azami- Conesa et al., 2020), siendo superior a lo obtenido en otros estudios sobre este parásito en murciélagos, donde se encontraron evidencias de la presencia de *L. braziliensis, L. major* y *L. mexicana* (Berzunza-Cruz et al., 2015; De Castro Ferreira et al., 2017; Kassahun et al., 2015). Parte de las diferencias halladas entre los resultados de los distintos estudios podría explicarse por las diferentes dianas de ADN utilizadas y las variadas especies de murciélago analizadas, así como la procedencia de éstos, ya que en nuestro caso se trata de animales procedentes de zonas urbanas y peri-urbanas, mientras que en otros casos se trata de animales selváticos. Sin embargo, nuestros resultados se asemejan a los obtenidos en otros de nuestros estudios, con animales de la misma zona (Comunidad de Madrid, Castilla y León y Castilla-La Mancha), como los tejones europeos (*M. meles*) con un 33% de animales positivos (Azami-Conesa et al., 2023). En este mismo artículo, obtuvimos un 12,76% de los erizos europeos (*E. europaeus*) y el 11,56% de las ardillas rojas (*S. vulgaris*) también positivos a *L. infantum*, donde incluimos individuos de las zonas anteriores, así como de la Comunidad Valenciana. Además, en la detección de *Leishmania* en gato montés (*F. silvestris*) obtuvimos un 38,89% de los animales positivos (Azami-Conesa et al., 2024) siguiendo los mismos protocolos, también con animales procedentes de Castilla y León y Castilla-La Macha. Previamente otros estudios obtuvieron resultados similares en los gatos monteses, del 25% en el caso de Del Río et al. (2014) y de Risueño et al. (2018), con 4 ejemplares analizados en cada estudio, o del 100% en el estudio de Oleaga et al. (2018) donde tan solo se analizaron 3 ejemplares procedentes de Asturias.

En el caso de los tejones, los resultados concuerdan con los obtenidos en otras publicaciones españolas e italianas, donde se encuentra entre el 26 y 53,3% de los animales positivos a *L. infantum* (Battisti et al., 2020; Del Río et al., 2014). Por su parte, los erizos europeos no han sido excesivamente estudiados, y solo encontramos dos artículos donde los analizan obteniendo entre el 34,4 y el 100% de los animales positivos a *L. infantum*, siendo superiores estos porcentajes a los nuestros (Alcover et al., 2020; Muñoz-Madrid et al., 2013). Esto mismo ocurre en el caso de la ardilla roja que, a pesar de ser un animal ampliamente distribuido en España (Purroy, 2007), solo encontramos una publicación en la que se analice la presencia del parásito, donde se obtuvo un resultado del 25% de los animales analizados positivos a *L. infantum* (Alcover et al., 2020). Esto es superior a lo obtenido en nuestra investigación, aunque podría deberse a la procedencia de los propios animales, ya que se lleva a cabo en Cataluña y con

ejemplares urbanos, mientras que en nuestro caso son animales procedentes de zonas rurales en su mayoría.

Uno de los grupos de silvestres menos estudiados es el de las especies consideradas como exóticas invasoras. Dentro de esta calificación encontramos al visón americano (*N. vison*), muy común en las riberas de ríos españoles, en especial en la Comunidad Valenciana, Galicia y Cantabria, y que suponen un problema relevante en los ecosistemas donde habitan por la competencia directa con otros animales autóctonos, como la nutria (*L. lutra*) o el visón europeo (*M. lutreola*) (Ruiz-olmo et al., 1997; Sidorovich et al., 1999). En el estudio incluido en esta Tesis se analizaron un total de 22 individuos, de los cuales 19 fueron positivos a *L. infantum* (90,1%). Alcover et al. (2020) obtuvieron también un resultado positivo en el único ejemplar analizado de esta especie en España, mientras que otros estudios realizados en granjas de cría de visón americano en Grecia se presentaron resultados algo menores, en torno al 20% (Filioussis et al., 2018; Tsakmakidis et al., 2019). Sin embargo, en estos últimos se utilizó como diana la *ITS*, de menor sensibilidad y con la que en nuestro caso obtuvimos un menor porcentaje de positivos, posiblemente porque no fue capaz de detectar las bajas concentraciones de ADN que suelen tener las muestras de fauna silvestre. Otros animales han sido estudiados en esta investigación, como el erizo moruno (*A. algirus*), la comadreja (*M. nivalis*), la garduña (*M. foina*), el lirón careto común (*E. quercinus*), el turón (*M. putorius*) y el meloncillo (*H. ichneumon*), con un número de individuos escaso, entre uno y tres de cada especie, y cuyos resultados fueron negativos en todos los individuos a la infección por *L. infantum* (Azami-Conesa et al., 2023), a pesar de que en la bibliografía existen evidencias de la presencia de este parásito en todos ellos (Chemkhi et al., 2015; Del Río et al., 2014; Oleaga et al., 2018; Ortuño et al., 2019; Risueño et al., 2018; Sobrino et al., 2008; Souguir-Omrani et al., 2018), excepto en la comadreja y el lirón careto. Cabe destacar que todas las muestras de los diversos animales analizados y que resultaron positivas, fueron secuenciadas y comparadas con secuencias depositadas en GenBank, obteniendo homologías del 100% con *L. infantum* y, en el caso del gato montés, con *L. tropica*. Los diversos estudios existentes acerca del posible papel como reservorios o, al menos, como especies centinela de la fauna silvestre, entre los que se incluyen los de esta Tesis Doctoral, no hacen más que evidenciar la necesidad de conocer el estado de la parasitosis en estos animales para poder manejar una información amplia y veraz, que nos permita dar una respuesta rápida y eficaz a posibles brotes de leishmaniosis humana, así como para conocer la distribución que este parásito podría tener en el medio natural.

5.1.2. UTILIDAD DE LA DETECCIÓN DE *LEISHMANIA* SPP. MEDIANTE PCR

Para la detección de la infección por *Leishmania* existen numerosas técnicas, como la serología, el xenodiagnóstico, la microscopía o el cultivo, pero, sin duda, la metodología más utilizada en los últimos años es la PCR debido a su elevada sensibilidad, su rapidez en la obtención de resultados y la variada información que se puede obtener a partir de esta técnica. Además, actualmente existen variantes de la PCR convencional que incrementan los beneficios, como la sensibilidad o la especificidad. Una de estas variantes es la PCR anidada, que permite una mayor sensibilidad de los resultados, aunque el riesgo de contaminación es mayor (Hong et al., 2020).

En el desarrollo de la PCR, sea cual sea la variante, es importante la selección de la diana a utilizar, es decir, el fragmento de ADN que se quiere amplificar, ya que esto determinará la sensibilidad y especificidad, la fiabilidad y el éxito de los resultados (Lachaud et al., 2002b). Es por esto que uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es el análisis de diferentes dianas del ADN utilizadas frecuentemente en la detección en fauna silvestre, para conocer la sensibilidad y especificidad de cada una, bajo las condiciones y protocolos usados en las muestras que manejamos. Algunas de las más utilizadas (Akhoundi et al., 2017; Azami-Conesa et al., 2021a; Lachaud et al., 2002b; Pereira et al., 2020) y seleccionadas para nuestros estudios fueron:

- *Repeat region*: codifica para la región repetitiva del ADN nuclear con elevada sensibilidad y con alta especificidad para *L. infantum*.
- *kDNA*: codifica para el ADN mitocondrial del kinetoplasto, exclusivo del orden Kinetoplastida, que otorga gran sensibilidad.
- *SSUrRNA*: codifica para la subunidad pequeña del ribosoma (SSU o 18S). Habitualmente utilizada en PCR anidada. De gran sensibilidad, pero con menor capacidad de diferenciar especies dentro del género.
- *ITS1*: codifica para los espaciadores internos de transcripción. Situado entre SSU y LSU (subunidad ribosomal grande, 28S). Empleada para genotipado por su especificidad.
- *Hsp70*: Heat- Shock Protein 70. Codifica para la proteína de choque térmico 70. Con alta especificidad.

Los resultados obtenidos varían en función de la muestra utilizada, seleccionando en nuestro caso cultivo de promastigotes de *L. infantum* o médula ósea de perro infectado con *L. infantum*, para analizar la capacidad de detección de las dianas (con la excepción de la *hsp70*), siendo en ambos casos mayor la sensibilidad de la *Repeat region* y el *kDNA*, seguido de cerca por la *SSUrRNA* y en último lugar la *ITS1* (Tablas 3 y 4 en Azami-Conesa et al., 2021b). En el caso de la *Repeat*

region, esta elevada sensibilidad la observamos también en otros artículos de esta investigación al utilizar muestras de murciélago y de visón americano (Azami-Conesa et al., 2020, 2021b), así como en otros animales como tejones, erizos y ardillas, donde esta diana resultó, en general, más sensible que la *SSUrRNA* (Azami-Conesa et al., 2023). La alta sensibilidad de la *Repeat region* concuerda con resultados obtenidos por otros autores al compararlo con diversas dianas (Chemkhi et al., 2015; Lachaud et al., 2002b) (Tabla 3). Sin embargo, la *Repeat region* tiene el inconveniente de que solo amplifica la especie *L. infantum*. El *kDNA* es una de las regiones más utilizadas en la detección de *Leishmania* y los resultados obtenidos en cultivo y médula ósea confirman una elevada sensibilidad. No obstante, al utilizar muestras de visón americano, no obtuvimos ningún resultado positivo, a pesar de la elevada prevalencia que nos indican otras dianas en los mismos individuos (Tabla 3). Algunos autores indican que pequeños cambios en la secuencia del parásito podrían modificar notablemente la sensibilidad con esta diana, lo cual se ve reforzado por la elevada variedad de resultados en los trabajos que utilizan estos protocolos (Azami-Conesa et al., 2021a; Cardoso et al., 2021). Cabe destacar otro aspecto relevante a la hora de trabajar con el *kDNA* y se trata de la elección de los primers. Existe una amplia selección de cebadores para amplificar esta región, por lo que la elección resulta a veces compleja y puede ser determinante a la hora de obtener resultados satisfactorios (Albuquerque et al., 2017; De Oliveira et al., 2011; Lachaud et al., 2002b). En el caso de la *SSUrRNA*, la mayor parte de los autores coinciden en que se trata de una diana altamente sensible, lo que encaja con los resultados obtenidos en nuestros estudios, como es el caso del estudio en gato montés, donde obtuvimos un 38,9% de los resultados positivos (Azami-Conesa et al., 2024), aunque con la excepción de los visones americanos, donde fueron escasos los positivos obtenidos (2 de 22) en comparación con los de la *Repeat región* (20 de 22) (Azami-Conesa et al., 2021b). En cuanto a la *ITS1*, los límites de detección fueron menores si los comparamos con la *Repeat region* y el *kDNA* al usar cultivo de promastigotes y médula ósea de animal infectado. Esto ocurre también al usar las muestras de visones americanos, donde no se obtuvieron resultados positivos. No obstante, en el caso de erizos, tejones, ardillas y gato montés, se obtuvieron resultados satisfactorios, teniendo en cuenta que se analizaron solo los ejemplares que resultaron positivos a otras dianas como la *Repeat Region* y la *SSUrRNA* (Tabla 3). Si lo comparamos con estudios previos, observamos que son numerosos los que indican bajas sensibilidades de la *ITS1*, incluido en visones americanos (Tsakmakidis et al., 2019) y en erizos (Chemkhi et al., 2015). Sin embargo, esta diana presenta una elevada especificidad por lo que resulta de gran utilidad en estudios filogenéticos y para identificar hasta el nivel de especie (Echchakery et al., 2017; Pereira et al., 2020).

Otra de las dianas ampliamente utilizadas a la hora de diferenciar entre especies de *Leishmania* es la *hsp70*, utilizada en nuestro caso, en aquellos gatos monteses positivos a *SSUrRNA* (Azami-Conesa et al., 2024), presentando una alta especificidad, aunque una menor sensibilidad según nuestros datos

(Tabla 3), lo que nos permite detectar especies foráneas del parásito y que ha sido muy utilizada en estudios filogenéticos por diversos autores (Fernández-Arévalo et al., 2022; Pereira et al., 2020; Van der Auwera et al., 2013).

Tabla 3. Porcentajes de animales positivos a *L. infantum* y/o *L. tropica* en relación con la diana de ADN utilizada en los diferentes estudios que se incluyen

	Murciélago urbano común	**Visón Americano**	**Tejón europeo**	**Erizo europeo**	**Ardilla roja**	**Gato montés**
Repeat region	59.2%	90.1%	14,29%	8,43%	11,54%	n.a.
kDNA	n.a.	0%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
SSUrRNA	n.a.	9,09%	28,57%	4,81%	3,85%	38,9%
ITS1*	n.a.	0%	21,43%	2,04%	0%	22,2%
hsp70*	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	22,2%

n.a.: no analizado. *: PCR realizada solo en animales positivos a otras dianas.

La elección del tipo de muestra a analizar resulta igual de importante que lo mencionado anteriormente respecto a los fragmentos de ADN a amplificar. En la bibliografía encontramos una elevada variedad de muestras capaces de poner de manifiesto la presencia de este parásito en los hospedadores mediante PCR, pero, dependiendo de la especie de *Leishmania* y del tipo de animal, algunas resultan de mayor utilidad.

Para la detección de *L. infantum* es habitual utilizar muestras de bazo, hígado, médula ósea, aspirado de ganglio linfático y sangre periférica, debido al desarrollo visceral que presenta esta parasitosis y, en el caso de la sangre, a la necesidad de estar disponible para el vector (Azami-Conesa et al., 2021a). En animales silvestres, es habitual que estas muestras procedan de individuos fallecidos por diversas causas, como atropellos, traumatismos severos o enfermedad, por lo que resulta sencillo obtener este tipo de muestras, la mayoría de ellas altamente invasivas. Si nos centramos en la sensibilidad que presentan las distintas muestras, se piensa que varía notablemente dependiendo de la especie animal, la procedencia del individuo, la fase de la infección, así como la respuesta inmunitaria del propio hospedador (Millán et al., 2014a; Risueño et al., 2018), lo cual hemos podido comprobar con nuestros propios resultados, donde los resultados positivos varían notablemente según el animal, desde el 90% de positivos en bazo en visón americano al 6,02% en bazo de los erizo europeos. Es escasa la información que encontramos sobre el desarrollo de la parasitosis en animales silvestres, pero si nos basamos en cómo y dónde se localizan los amastigotes en los perros (principal reservorio), podríamos comprender las altas sensibilidades en muestras como el bazo, donde *L. infantum* se acantona, provocando cambios en la microestructura del órgano

en sus fases más avanzadas. También es habitual emplear como órgano diana la piel, tejido involucrado en la transmisión al flebotomo, siendo el primero parasitado en las etapas iniciales de la infección. Y, por último, la sangre, donde se presupone que se encuentran los macrófagos parasitados a disposición del vector (Morales-Yuste et al., 2022). La elevada sensibilidad de las muestras de bazo la podemos observar también en los animales estudiados en los artículos que se presentan en este trabajo, ya que supone uno de los tejidos con mayores porcentajes de resultados positivos en murciélagos, visón americano, tejón europeo, erizo europeo y ardilla roja, como se puede observar en la tabla 4, siendo los porcentajes de parasitación en bazo bastante menores en el gato montés, aunque en este último caso quizás sea debido a la presencia de *L. tropica*, de mayor tropismo cutáneo (Azami-Conesa et al., 2020, 2021b, 2023, 2024). Estos resultados siguen la línea de otros estudios, donde también se ha detectado una elevada sensibilidad en bazo de murciélagos (a pesar de que las especies detectadas eran diferentes a *L. infantum* y con alto carácter cutáneo en humanos) (Berzunza- Cruz et al., 2015; De Oliveira et al., 2015), en visón americano (Alcover et al., 2020; Filioussis et al., 2018; Tsakmakidis et al., 2019), en el único estudio que analiza bazo de erizo europeo y ardilla roja (Alcover et al., 2020) y en tejón europeo (Battisti et al., 2020; Del Río et al., 2014). En el caso del gato montés, también es posible que la mayor sensibilidad de las muestras de piel de oreja sea debida a la propia respuesta inmunitaria del animal o por la similitud al gato doméstico, donde las lesiones cutáneas por *L. infantum* son habituales (Batista et al., 2023; Cardoso et al., 2021; Pennisi et al., 2013; Pennisi & Persichetti, 2018). De hecho, la piel de oreja ha resultado ser una muestra interesante en el caso del gato montés, con una mayor sensibilidad frente al bazo (7 animales positivos frente a 2, respectivamente), lo que podría deberse a la presencia de *L. tropica*, cuyo desarrollo cutáneo es más frecuente, así como en el caso de erizos y tejones, donde 9 de los 113 animales tuvieron resultados positivos en piel a *L. infantum*. Sin embargo, en las ardillas, este tejido no arrojó resultados positivos en nuestro estudio, a pesar de haber 3 individuos positivos a bazo, y de lo obtenido por Alcover et al. (2020), donde 2 de los 12 animales analizados fueron positivos en piel. En el caso de los murciélagos, se estudió la sensibilidad de la sangre procedente de coágulo de corazón, seleccionada por las publicaciones científicas donde se analizaba la sangre periférica de diferentes especies de estos animales (De Lima et al., 2008; De Rezende et al., 2017; Gómez-Hernández et al., 2017). Seis de los 27 animales fueron positivos (22.22%), lo que implica una menor sensibilidad que en el caso del bazo, pero similar a la del pelo (Azami-Conesa et al., 2020), y similar a lo obtenido en otros artículos llevados a cabo en América del Sur y Centroamérica, como en el caso de Gómez- Hernández et al. (2017) o del estudio de De Rezende et al. (2017) donde el 8% y el 30% de las muestras de sangre analizadas, respectivamente, fueron positivas a distintas especies de *Leishmania*, entre ellas *L. infantum,* a pesar de haberse realizado en otras especies de quirópteros y con dianas diferentes a las utilizadas en nuestro estudio.

No debemos olvidar que para la recolección de las muestras anteriores se usan técnicas altamente invasivas, requiriendo en la mayoría de las ocasiones la muerte del animal para poder obtenerlas, con la excepción de la sangre, la punción esplénica ecoguiada y el aspirado de ganglio linfático. Por ello, en los últimos años, encontramos autores como Muñoz-Madrid et al. (2013), Ortega et al. (2017) y una de las publicaciones de esta Tesis Doctoral (Azami-Conesa et al., 2020), donde se analiza la utilidad del pelo para la detección de *L. infantum*, obteniendo en todos los casos resultados remarcables como son el 20,6%, alrededor del 80% y del 44% de resultados positivos (Tabla 4), respectivamente. Estos datos son cuanto menos esperanzadores, ya que la obtención de muestras no invasivas puede resultar de gran utilidad a la hora de realizar estudios epidemiológicos relacionados con esta parasitosis y su situación en la fauna silvestre. No obstante, otras muestras no invasivas, como la conjuntiva oral y ocular en erizos, han sido analizados en nuestros estudios sin encontrar resultados positivos, a pesar de que uno de los individuos analizados fue positivo a *L. infantum* en bazo. Este tipo de muestras podría resultar interesante, pero acarrea algunos inconvenientes como la toma de la propia muestra que requiere experiencia previa o que la parasitación del individuo sea baja y esta muestra no resulte útil por tener menor sensibilidad, y quizás sea de más utilidad en el caso de animales con signos clínicos evidentes. En la literatura encontramos dos artículos que obtuvieron resultados positivos con estas muestras, en perro y erizo moruno (Aschar et al., 2016; Souguir-Omrani et al., 2018).

Tabla 4. Porcentaje de animales positivos según la muestra a analizar mediante PCR.

	Murciélago urbano común	**Visón americano**	**Tejón europeo**	**Erizo europeo**	**Ardilla roja**	**Gato montés**
Bazo	51,85%	90,1%	28,57%	6,02%	11,54%	11,11%
Piel de oreja	n.a.	n.a.	14,29%	6,02%	0%	38,9%
Pelo	25,93%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Coágulo de sangre	22,22%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a.: no analizado

Cabe destacar la ausencia de lesiones características en los animales analizados, a pesar de la evidencia que podemos encontrar en la bibliografía de lesiones cutáneas, especialmente en animales como chacales, lobos, zorros y roedores, alguno de ellos considerados reservorios (Echchakery et al., 2017; Helhazar et al., 2013; Karayiannis et al., 2015; Moemenbellah-Fard et al., 2003; Mohebali et al., 2016; Oleaga et al., 2015). Esto nos hace pensar que el nivel de parasitación en las especies estudiadas sea bajo. Aun así, las técnicas empleadas han resultado

de utilidad en esta Tesis, tanto para detectar animales positivos (*Repeat region*, *SSUrDNA*), como para determinar la especie de *Leishmania* (*ITS1, hsp70*).

5.1.3. EXPANSIÓN DE LAS ESPECIES DE *LEISHMANIA*

L. infantum ha sido, hasta el momento, la única especie de este género con transmisión autóctona en España. A pesar de ello, desde hace varios años se detectan habitualmente poblaciones de flebotomos que son vectores principales de otras especies de *Leishmania*, como *P. sergenti*, principal vector de *L. tropica*, una especie foránea (Barón et al., 2013; Berriatua et al., 2023; Gálvez et al., 2020; Merino-Espinosa et al., 2016). Además, en países cercanos, como Marruecos, Túnez o Turquía, esta especie del parásito está asentada y ampliamente distribuida (Echchakery et al., 2020; El Idrissi Saik et al., 2022; El Kacem et al., 2021). Por ello, no es de extrañar que, desde hace un tiempo, varios investigadores hayan puesto el foco en la posibilidad de que *L. tropica* y otras especies de *Leishmania* sean capaces de establecerse en la península ibérica, teniendo en cuenta, además, que la climatología cada vez es más similar a la que encontramos en nuestros vecinos del norte de África (Barón et al., 2013; Cunze et al., 2019; Gálvez et al., 2020; Merino-Espinosa et al., 2016).

Tanto la presencia del vector como la del parásito, son factores críticos para que ocurra una transmisión local de una especie foránea y esto mismo se establece en España (Barón et al., 2013). Por un lado, *P. sergenti* lleva varios años presente en el país, extendiéndose progresivamente, y se han reportado casos importados de *L. tropica* en personas que habían viajado a zonas endémicas, como los casos clínicos descritos por Knöpfel et al. (2018) en Madrid, con claros signos clínicos de leishmaniosis cutánea y diagnóstico molecular de *L. tropica*. Asimismo, es altamente probable que los movimientos globales de personas y animales entre los países vecinos faciliten la llegada de esta especie del parásito a la península ibérica y otros países del sur de Europa, como Italia, donde se sugiere el traslado de perros del norte de África como posible vía de entrada (Gramiccia & Gradoni, 2005).

La fauna silvestre puede jugar un papel crucial en la detección de la llegada de especies foráneas de *Leishmania*, ya que arrojan información sobre la situación epidemiológica en una región determinada, en especial en aquellas regiones poco pobladas, como es el caso de Castilla y León, donde la detección de *L. tropica* en nuestro estudio abre las puertas a la posibilidad de que este parásito se encuentre circulando más habitualmente de lo que se pensaba hasta el momento. De los 18 gatos monteses analizados, 7 fueron positivos a *Leishmania* spp. De ellos, un individuo presentaba infección por *L. tropica*, según los datos obtenidos con la *ITS1* y la *hsp70*, siendo ambas dianas muy específicas y permitiendo la diferenciación a nivel de especie. Otros dos ejemplares fueron claramente positivos a *L. infantum*, tanto en piel como en bazo. Y un tercer gato montés presentó resultados mixtos de *L. infantum* y *L. tropica*, lo que podría indicar una infección mixta o una

hibridación de ambas especies. Los tres animales restantes fueron positivos a *SSUrRNA* exclusivamente, diana que no es capaz de diferenciar correctamente entre especies de *Leishmania*. Además, cabe destacar que los individuos que presentaban *L. tropica* y la infección mixta, solo fueron positivos a las muestras de piel, lo que podría reforzar los resultados, teniendo en cuenta el carácter preferentemente cutáneo de la especie no autóctona, al menos en humanos (Maroli et al., 2013).
Para comprender estos resultados, podemos fijarnos en estudios anteriores donde se reportan casos de infecciones mixtas entre diversas especies, como es el caso de *L. infantum* y *L. braziliensis* en roedores y perros (Alves Souza et al., 2019; De Castro Ferreira et al., 2015), en erizos con *L. major* y *L. infantum* (Souguir-Omrani et al., 2018) o de *L. tropica* con *L. infantum* en gatos domésticos (Can et al., 2016), por lo que no resulta descabellado pensar que si las dos especies comparten espacio y tiempo, podrían provocar este tipo de infección en los gatos monteses.

Otra posibilidad es la hibridación, demostrada *in vitro* en *L. tropica*, y cuya tasa de hibridación natural es ampliamente superior a la de otras especies de este género (Louradour et al., 2020). Además, se ha demostrado que los flebotomos capaces de transmitir *L. infantum* son susceptibles de albergar y actuar como vectores de *L. tropica*, como es el caso de *P. perniciosus*, vector habitual de *L. infantum*, y que ha demostrado capacidad *in vitro* de albergar *L. tropica* (Bongiorno et al., 2019; Vaselek & Volf, 2019). Sin embargo, *P. sergenti* presenta una alta exclusividad con *L. tropica* y, hasta el momento, no se ha detectado otra especie del parásito en su interior (Barón et al., 2013; Berriatua et al., 2023; Gramiccia & Gradoni, 2005; Merino-Espinosa et al., 2016).

CAPÍTULO 6:

CONCLUSIONES

Como resultado de los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Se ha descrito por primera vez en Europa la presencia de *Leishmania infantum* en murciélago urbano común en áreas urbanas y periurbanas con una alta prevalencia. Se trata de la especie de quiróptero más abundante de la península ibérica, cuyos hábitos de vida permiten que cohabiten en el mismo nicho ecológico el vector, el parásito, el hombre y otros reservorios, como el perro.

2. El tejón europeo, el erizo europeo, la ardilla roja, el murciélago urbano común y el gato montés son capaces de albergar *Leishmania* spp. en diferentes órganos del cuerpo y con porcentajes de parasitación notables. Estos animales están ampliamente distribuidos por la península ibérica, pudiendo tener un papel relevante en el mantenimiento del ciclo rural del parásito.

3. El visón americano procedente de la Comunidad Valenciana ha presentado una elevada prevalencia de *Leishmania infantum*. Esto supone que las especies exóticas invasoras podrían jugar un papel importante en la permanencia y transmisión de este parásito en zonas de ribera, donde el vector se encuentra de manera habitual.

4. El bazo ha resultado ser el órgano más sensible para la detección de *Leishmania* spp. mediante PCR convencional, en relación a otras muestras invasivas frecuentemente utilizadas, con la excepción del gato montés, donde la piel resultó más sensible. La predisposición cutánea o visceral de cada especie de *Leishmania* debe tenerse en cuenta a la hora de analizar los resultados.

5. Las muestras no invasivas como el pelo resultaron positivas en los murciélagos urbanos comunes, reforzando la posibilidad de usar este tipo de muestras para la detección de *Leishmania infantum*.

6. A la vista de los resultados obtenidos, existen diferencias significativas a la hora de elegir la diana de ADN a utilizar. La *SSUrRNA* y la *Repeat region* resultan adecuadas para la detección de *Leishmania* spp. debido a su elevada sensibilidad. Sin embargo, si el objetivo es diferenciar especies del género, sería más efectivo utilizar la *hsp70* o la *ITS1*, ambas con gran especificidad.

7. Se ha detectado por primera vez en España la presencia de *Leishmania tropica* en fauna silvestre. Hasta la fecha, *Leishmania infantum* era la única especie del género con presencia en fauna autóctona en la península ibérica. El establecimiento de una especie foránea en nuestro territorio supone un nuevo reto epidemiológico, donde profesionales de la salud humana, animal y ambiental deben trabajar conjuntamente para la detección, prevención y control de esta nueva especie.

BIBLIOGRAFÍA

Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., … Zhang, Q. (2019). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *66*(1), 4–119. https://doi.org/10.1111/jeu.12691

Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., … Taylor, M. F. J. R. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *52*(5), 399–451. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x

Aguirre, A. A. (2009). Wild canids as sentinels of ecological health: A conservation medicine perspective. *Parasites and Vectors*, *2*(SUPPL.1), 1–8. https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S7

Aguirre, A. A., & Tabor, G. M. (2008). Global factors driving emerging infectious diseases: Impact on wildlife populations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1149*, 1–3. https://doi.org/10.1196/annals.1428.052

Ait Kbaich, M., Mhaidi, I., Ezzahidi, A., Dersi, N., El Hamouchi, A., Riyad, M., Akarid, K., & Lemrani, M. (2017). New epidemiological pattern of cutaneous leishmaniasis in two pre-Saharan arid provinces, southern Morocco. *Acta Tropica*, *173*(March), 11–16. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.016

Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., & Sereno, D. (2017). *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, *57*, 1–29. https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012

Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(3), 1–40. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349

Albuquerque, A., Campino, L., Cardoso, L., & Cortes, S. (2017). Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. *Parasites & Vectors*, *10:57*. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2002-2

Alcover, M. M., Ribas, A., Guillén, M. C., Berenguer, D., Tomás-Pérez, M., Riera, C., & Fisa, R. (2020). Wild mammals as potential silent reservoirs of *Leishmania infantum* in a Mediterranean area. *Preventive Veterinary Medicine*, *175*. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104874

Alcover, M. M., Riera, M. C., & Fisa, R. (2021). Leishmaniosis in Rodents Caused by *Leishmania infantum*: A Review of Studies in the Mediterranean Area. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*(August). https://doi.org/10.3389/fvets.2021.702687

Alexander, B., Lozano, C., Barker, D. C., McCann, S. H. E., & Adler, G. H. (1998). Detection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Tropica*, *69*(1), 41–50. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00114-9

Alonso Capitán, M., & Vázquez Torres, M. C. (2013). Impactos del Cambio Climático en la Salud. M. Alonso Capitán & M. C. Vázquez Torres (eds.). *Ministerio de Sanidad, Asuntos Sociales e Igualdad.*

Alten, B., Ozbel, Y., Ergunay, K., Kasap, O. E., Cull, B., Antoniou, M., Velo, E., Prudhomme, J., Molina, R., Banuls, A. L., Schaffner, F., Hendrickx, G., Van Bortel, W., & Medlock, J. M. (2015). Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. *Bulletin of Entomological Research*, *105*(6), 664–678. https://doi.org/10.1017/S0007485315000127

Alves Souza, N., Souza Leite, R., de Oliveira Silva, S., Groenner Penna, M., Figueiredo Felicori Vilela, L., Melo, M. N., & de Andrade, A. S. R. (2019). Detection of mixed *Leishmania* infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. *Acta Tropica*, *193*(February), 12–17. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.016

Amela, C., Suarez, B., Isidoro, B., Sierra, M. J., Santos, S., & Simón, F. (2012). Evaluación del Riesgo de Transmisión de Leishmania infantum en España (2012th ed.). *Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES). Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*.

Aransay, A. M., Scoulica, E., & Tselentis, Y. (2000). Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(5), 1933–1938. https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1933-1938.2000

Arce, A., Estirado, A., Ordobás, M., Moratilla, L., García, N., Pérez, A. M., Gil, E., Aranguez, E., García Puente, E., & Martínez, A. M. (2017). Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid: detección e investigación epidemiológica. In C. de S. Dirección General

de Salud Pública (Ed.), *Brote de Leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. El papel de las liebres y los conejos como reservorios* (2017th ed., pp. 105–112). http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM017962.pdf

Armúa-Fernández, M. T., & Venzal, J. M. (2019). Leishmaniosis: breve puesta al día. *Veterinaria (Montevideo)*, *55*(211), 29–36. https://doi.org/10.29155/vet.55.211.5

Aschar, M., de Oliveira, E. T. B., Laurenti, M. D., Marcondes, M., Tolezano, J. E., Hiramoto, R. M., Corbett, C. E. P., & Da Matta, V. L. R. (2016). Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, *225*, 108–113. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.005

Ashford, R. W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, *14*(5), 523–532. https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00041-7

Azami-Conesa, I., Gómez-Muñoz, M. T., & Martínez-Díaz, R. A. (2021a). A systematic review (1990–2021) of wild animals infected with zoonotic *Leishmania*. *Microorganisms*, *9*(5). https://doi.org/10.3390/microorganisms9051101

Azami-Conesa, I., Martínez-Díaz, R. A., González, F., & Gómez-Muñoz, M. T. (2020). First detection of *Leishmania infantum* in common urban bats *Pipistrellus pipistrellus* in Europe. *Research in Veterinary Science*, *132*, 172–176. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.06.019

Azami-Conesa, I., Matas- Méndez, P., Pérez- Moreno, P., Carrión, J., Alunda, J.M., Mateo-Barrientos, M., Gómez- Muñoz, M.T. (2024). Wildlife as a sentinel for pathogen introduction in non-endemic areas: first detection of *Leishmania tropica* in wildlife in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases,* 2024 (8259712), 1-10; https://doi.org/10.1155/2024/8259712.

Azami-Conesa, I., Pérez-Moreno, P., Matas Méndez, P., Sansano-Maestre, J., González, F., Mateo Barrientos, M., & Gómez-Muñoz, M. T. (2023). Occurrence of *Leishmania infantum* in Wild Mammals Admitted to Recovery Centers in Spain. *Pathogens*, *12*(1048), 1–11. https://doi.org/doi.org/10.3390/pathogens12081048

Azami-Conesa, I., Sansano-Maestre, J., Martínez-Díaz, R. A., & Gómez-Muñoz, M. T. (2021b). Invasive species as hosts of zoonotic infections: The case of american mink (*Neovison vison*) and *Leishmania infantum*. *Microorganisms*, *9*(7), 1–10. https://doi.org/10.3390/microorganisms9071531

Babuadze, G., Alvar, J., Argaw, D., de Koning, H. P., Iosava, M., Kekelidze, M., Tsertsvadze, N., Tsereteli, D., Chakhunashvili, G., Mamatsashvili, T., Beria, N., Kalandadze, I., Ejov, M., &

Imnadze, P. (2014). Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Georgia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(3), 1–8. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002725

Baghad, B., Razanapinaritra, R., Maksouri, H., El Bouri, H., Outlioua, A., Fellah, H., Lemrani, M., Akarid, K., Martin-Sanchez, J., Chiheb, S., & Riyad, M. (2020). Possible introduction of *Leishmania tropica* to urban areas determined by epidemiological and clinical profiles of patients with cutaneous leishmaniasis in Casablanca (Morocco). *Parasite Epidemiology and Control*, *9*, e00129. https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00129

Bakhshi, H., Oshaghi, M. A., Abai, M. R., Rassi, Y., Akhavan, A. A., Mohebali, M., Hajaran, H., Mohtarami, F., Mirzajani, H., & Maleki-Ravasan, N. (2013). MtDNA cytb structure of *Rhombomys opimus* (Rodentia: Gerbellidae), the main reservoir of cutaneous leishmaniasis in the borderline of Iran-Turkmenistan. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, *7*(2), 173–184. PMID: 24409443; PMCID: PMC3875884.

Baneth, G., Nachum-Biala, Y., Adamsky, O., & Gunther, I. (2022). *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* infection in dogs and cats in central Israel. *Parasites and Vectors*, *15*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s13071-022-05272-0

Baneth, G., & Solano-Gallego, L. (2022). Leishmaniasis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, *52*(6), 1359–1375. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.06.012

Barón, S. D., Morillas-Márquez, F., Morales-Yuste, M., Díaz-Sáez, V., Gállego, M., Molina, R., & Martín-Sánchez, J. (2013). Predicting the risk of an endemic focus of *Leishmania tropica* becoming established in south-western Europe through the presence of its main vector, *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917. *Parasitology*, *140*(11), 1413–1421. https://doi.org/10.1017/S0031182013000942

Barreto-de-Albuquerque, J., Silva-dos-Santos, D., Pérez, A. R., Berbert, L. R., de Santana-van-Vliet, E., Farias-de-Oliveira, D. A., Moreira, O. C., Roggero, E., de Carvalho-Pinto, C. E., Jurberg, J., Cotta-de-Almeida, V., Bottasso, O., Savino, W., & de Meis, J. (2015). *Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: New disease form from an old infection? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(6), 1–21. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003849

Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, *37*(10), 1097–1106. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003

Batista, J. F., Neto, F. das C. R. M., Lopes, K. S. P. do P., Sousa, C. M. G., Alcântara, D. S., Baêta, S. de A. F., Alves, M. M. de M., & de Mendonça, I. L. (2023). Clinical, hematological, biochemical, and histopathological evaluations in domestic cats (*Felis catus*) infected by

Leishmania infantum. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, *32*(3), 1–10. https://doi.org/10.1590/S1984-29612023037

Battisti, E., Zanet, S., Khalili, S., Trisciuoglio, A., Hertel, B., & Ferroglio, E. (2020). Molecular Survey on Vector-Borne Pathogens in Alpine Wild Carnivorans. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*(January), 1–9. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00001

Baxarias, M., Homedes, J., Mateu, C., Attipa, C., & Solano-Gallego, L. (2022). Use of preventive measures and serological screening tools for *Leishmania infantum* infection in dogs from Europe. *Parasites and Vectors*, *15*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s13071-022-05251-5

Berriatua, E., Pérez-Cutillas, P., González Vidal, A., & Briët, O. (2023). *European Centre for Disease Prevention and Control. The spatial relationship between the presence and absence of Leishmania spp. and leishmaniasis, and phlebotomine sand fly vectors in Europe and neighbouring countries.* www.ecdc.europa.eu

Berzunza-Cruz, M., Rodríguez-Moreno, Á., Gutiérrez-Granados, G., González-Salazar, C., Stephens, C. R., Hidalgo-Mihart, M., Marina, C. F., Rebollar-Téllez, E. A., Bailón-Martínez, D., Balcells, C. D., Ibarra-Cerdeña, C. N., Sánchez-Cordero, V., & Becker, I. (2015). *Leishmania* (L.) *mexicana* Infected Bats in Mexico: Novel Potential Reservoirs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003438

Blake, D. P., & Betson, M. (2016). One Health: parasites and beyond. *Parasitology*, *144*, 1–6. https://doi.org/10.1017/S0031182016001402

Boehme, C. C., Hain, U., Novosel, A., Eichenlaub, S., Fleischmann, E., & Löscher, T. (2006). Congenital visceral leishmaniasis. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(2), 359–360. https://doi.org/10.3201/eid1202.050449d

Boggiatto, P. M., Gibson-Corley, K. N., Metz, K., Gallup, J. M., Hostetter, J. M., Mullin, K., & Petersen, C. A. (2011). Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(4). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001019

Bonesi, L., & Palazon, S. (2007). The American mink in Europe: Status, impacts, and control. *Biological Conservation*, *134*(4), 470–483. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.09.006

Bongiorno, G., Di Muccio, T., Bianchi, R., Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2019). Laboratory transmission of an Asian strain of *Leishmania tropica* by the bite of the southern European sand fly *Phlebotomus perniciosus*. *International Journal for Parasitology*, *49*(6), 417–421. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.12.009

Bouabdallah, S., Cianfaglione, K., Azzouz, M., Batiha, G. E. S., Alkhuriji, A. F., Al-Megrin, W. A. I., Ben-Attia, M., & Eldahshan, O. A. (2022). Sustainable Extraction, Chemical Profile, Cytotoxic and Antileishmanial Activities In-Vitro of Some Citrus Species Leaves Essential Oils. *Pharmaceuticals*, *15*(9). https://doi.org/10.3390/ph15091163

Bravo-Barriga, D., Ruiz-Arrondo, I., Peña, R. E., Lucientes, J., & Delacour-Estrella, S. (2022). Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Spain: an updated checklist and extended distributions. *ZooKeys*, *1106*, 81–99. https://doi.org/10.3897/zookeys.1106.81432

Bray, D. P., & Hamilton, J. G. C. (2007). Host odor synergizes attraction of virgin female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, *44*(5), 779–787. https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[779:HOSAOV]2.0.CO;2

Caldart, E. T., Pinto-Ferreira, F., de Matos, A. M. R. N., Pascoal, A. T. P., Bertão-Santos, A., Mitsuka-Breganó, R., & Navarro, I. T. (2021). Evaluation of an active and early surveillance methodology for visceral leishmaniasis by molecular detection in road-killed wild fauna. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, *30*(2), 1–11. https://doi.org/10.1590/s1984-29612021026

Calvopina, M., Armijos, R. X., & Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: Current status of knowledge - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *99*(7), 663–672. https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000700001

Calzolari, M., Romeo, G., Bergamini, F., Dottori, M., Rugna, G., & Carra, E. (2022). Host preference and *Leishmania infantum* natural infection of the sand fly *Phlebotomus perfiliewi* in northern Italy. *Acta Tropica*, *226*(July 2021), 106246. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106246

Can, H., Döşkaya, M., Özdemir, H. G., Şahar, E. A., Karakavuk, M., Pektaş, B., Karakuş, M., Töz, S., Caner, A., Döşkaya, A. D., Iz, S. G., Özbel, Y., & Gürüz, Y. (2016). Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of I˙zmir, Turkey. *Experimental Parasitology*, *167*, 109–114. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.05.011

Cardoso, L., Schallig, H., Persichetti, M. F., & Pennisi, M. G. (2021). New epidemiological aspects of animal leishmaniosis in Europe: The role of vertebrate hosts other than dogs. *Pathogens*, *10*(3), 1–46. https://doi.org/10.3390/pathogens10030307

Cassan, C., Diagne, C. A., Tatard, C., Gauthier, P., Dalecky, A., Bâ, K., Kane, M., Niang, Y., Diallo, M., Sow, A., Brouat, C., & Bañuls, A. L. (2018). *Leishmania major* and *Trypanosoma lewisi* infection in invasive and native rodents in Senegal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(6), 1–21. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006615

Castro, L. S., Dorval, M. E. C., Matheus, L. M. D., Bednaski, A. V., Facco, G. G., Silveira, M., Santos, C. F., Gontijo, C. M. F., Oliveira, A. P. G., & Ferreira, E. C. (2020). *Leishmania* presence in bats in areas endemic for leishmaniasis in central-west Brazil. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *11*(February), 261–267. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.02.008

Centers for Disease Control and Prevention One Health office. (n.d.). *Zoonotic Diseases*. CDC. Disponible en: www.cdc.gov/one-health/about/about-zoonotic-diseases.html

Centro Nacional de Epidemiología. (2022). *Informe epidemiológico sobre la situación de la leishmaniasis en España. Año 2022*.

Chemkhi, J., Souguir, H., Ali, I. B. H., Driss, M., Guizani, I., & Guerbouj, S. (2015). Natural infection of Algerian hedgehog, *Atelerix algirus* (Lereboullet 1842) with *Leishmania* parasites in Tunisia. *Acta Tropica*, *150*, 42–51. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.009

Conselleria Medio Ambiente, Agua, U. y V. (2009). *Decreto 213/2009, de 20 de Noviembre, del Consell, por el que se Aprueban Medidas Para el Control de Especies Exóticas Invasoras en la Comunitat Valenciana*. DOGV Núm. 6151 de 24.11.2009. Disponible en: https:// dogv.gva.es/es/disposicio-consolidada?signatura=013210/2009&idioma=es&L=1&url_lista=

Costa, C. H. N., Chang, K. P., Costa, D. L., & Cunha, F. V. M. (2023). From Infection to Death: An Overview of the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. *Pathogens*, *12*(7). https://doi.org/10.3390/pathogens12070969

Coutinho, M. T. Z., & Linardi, P. M. (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology*, *147*(3–4), 320–325. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.008

Cruz, I., Cañavate, C., Rubio, J. M., Morales, M. A., Chicharro, C., Laguna, F., Jiménez-Mejías, M., Sirera, G., Videla, S., & Alvar, J. (2002). A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *96*, 185–189. https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90074-x

Cunze, S., Kochmann, J., Koch, L. K., Hasselmann, K. J. Q., & Klimpel, S. (2019). Leishmaniasis in Eurasia and Africa: Geographical distribution of vector species and pathogens. *Royal Society Open Science*, *6*(5). https://doi.org/10.1098/rsos.190334

Dahroug, M. A. A., Almeida, A. B. P. F., Sousa, V. R. F., Dutra, V., Turbino, N. C. M. R., Nakazato, L., & de Souza, R. L. (2010). *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in captive wild felids in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *104*(1), 73–74. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.08.003

De Almeida Curi, N. H., Miranda, I., & Talamoni, S. A. (2006). Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *101*(1), 99–101. https://doi.org/10.1590/s0074-02762006000100019

De Araújo, V. A. L., Boité, M. C., Cupolillo, E., Jansen, A. M., & Roque, A. L. R. (2013). Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. *Parasitology*, *140*(4), 455–460. https://doi.org/10.1017/S0031182012001886

De Blas, I. (2023). *Win Epi: Work in Epidemiology*. WinEpi. 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023

De Castro Ferreira, E., Cruz, I., Cañavate, C., de Melo, L. A., Pereira, A. A. S., Madeira, F. A. M., Nogueira Valério, S. A., Cunha, H. M., Paglia, A. P., & Ferreira Gontijo, C. M. (2015). Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. *BMC Veterinary Research*, *11*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s12917-015-0392-y

De Castro Ferreira, E., Pereira, A. A. S., Silveira, M., Margonari, C., Marcon, G. E. B., de Oliveira França, A., Castro, L. S., Bordignon, M. O., Fischer, E., Tomas, W. M., Dorval, M. E. C., & Gontijo, C. M. F. (2017). *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* infecting bats from Pantanal wetland, Brazil: First records for *Platyrrhinus lineatus* and *Artibeus planirostris*. *Acta Tropica*, *172*, 217–222. https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2017.05.012

De Lima, H., Rodríguez, N., Barrios, M. A., Ávila, Á., Cañizales, I., & Gutiérrez, S. (2008). Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *103*(4), 412–414. https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000400018

De Noya, B. A., & González, O. N. (2015). An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Tropica*, *151*(1), 94–102. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.004

De Oliveira, D. M., Lonardoni, M. V. C., Theodoro, U., & Silveira, T. G. V. (2011). Comparison of different primes for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *15*(3), 204–210. https://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70176-3

De Oliveira, F. M., Costa, L. H. C., de Barros, T. L., Rauschkolb Katsuda Ito, P. K., Colombo, F. A., de Carvalho, C., Pedro, W. A., Queiroz, L. H., & Nunes, C. M. (2015). First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. *Acta Tropica*, *150*, 176–181. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.010

De Paiva-Cavalcanti, M., de Morais, R. C. S., Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L. A. M., Gonçalves-de-Albuquerque, S. da C., Tavares, D. de H. C., Brelaz-de-Castro, M. C. A., Silva, R. de F. e., & Pereira, V. R. A. (2015). Leishmaniases diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. *Cell and Bioscience*, *5*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2

De Rezende, M. B., Herrera, H. M., Carvalho, C. M. E., Carvalho Anjos, E. A., Ramos, C. A. N., De Araújo, F. R., Torres, J. M., & De Oliveira, C. E. (2017). Detection of *Leishmania* spp. in Bats from an Area of Brazil Endemic for Visceral Leishmaniasis. *Transboundary and Emerging Diseases*, *64*, 36–42. https://doi.org/10.1111/tbed.12597

Dedet, J. P., Gay, F., & Chatenay, G. (1989). Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *83*(5), 613–615. https://doi.org/10.1016/0035-9203(89)90374-X

Del Río, L., Chitimia, L., Cubas, A., Victoriano, I., De la Rúa, P., Gerrikagoitia, X., Barral, M., Muñoz- García, C. I., Goyena, E., García- Martínez, D., Fisa, R., Riera, C., Murcia, L., Segovia, M., & Berriatua, E. (2014). Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, *113*, 430–435. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.12.001

Delibes, M., & Palomo, L. J. (2007). *Atlas y Libro Rojo de los mamíferos Terrestres de España*. J. Palomo, J. Gisbert, & J. M. Blanco (eds.). Dirección General para la Biodiversidad-SECEMU

Descoteaux, A., Matlashewski, G., & Turco, S. J. (1992). Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *The Journal of Immunology*, *149*(9), 3008–3015. https://doi.org/10.4049/jimmunol.149.9.3008

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *27*(5), 305–318. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004

Dujardin, J. C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbel, Y., & Boelaert, M. (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(7), 1013–1018. https://doi.org/10.3201/eid1407.071589

Echchakery, M., Chicharro, C., Boussaa, S., Nieto, J., Carrillo, E., Sheila, O., Moreno, J., & Boumezzough, A. (2017). Molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in rodent species from endemic cutaneous leishmaniasis areas in Morocco. *Parasites & Vectors*, *10:454*. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2398-8

Echchakery, M., Chicharro, C., Boussaa, S., Nieto, J., Ortega, S., Carrillo, E., Moreno, J., & Boumezzough, A. (2020). Molecular identification of *Leishmania tropica* and *L. infantum* isolated from cutaneous human leishmaniasis samples in central Morocco. *Journal of Vector Borne Diseases*, *57*(1), 71–77. https://doi.org/10.4103/0972-9062.308804

El Idrissi Saik, I., Benlabsir, C., Fellah, H., Lemrani, M., & Riyad, M. (2022). Transmission patterns of *Leishmania tropica* around the Mediterranean basin: Could Morocco be impacted by a zoonotic spillover? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *16*(1), 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010009

El Kacem, S., Kbaich, M. A., Daoui, O., Charoute, H., Mhaidi, I., Ejghal, R., Barhoumi, M., Guizani, I., Bennani, H., & Lemrani, M. (2021). Multilocus sequence analysis provides new insight into population structure and genetic diversity of *Leishmania tropica* in Morocco. *Infection, Genetics and Evolution*, *93*(February), 104932. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104932

Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., & Shaw, J. J. (2018). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, *145*(4), 430–442. https://doi.org/10.1017/S0031182016002092

Esseghir, S., Ready, P. D., & Ben-Ismail, R. (2000). Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larroussius* coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the mediterranean subregion. *Biological Journal of the Linnean Society*, *70*(2), 189–219. https://doi.org/10.1006/bijl.1999.0393

European Centre for Disease Prevention and Control. (2023). *Vector distribution status changes in terms of spatial units since the previous update*. ECDC. Disponible en: www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/phlebotomine-maps

European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. (2019). *Phlebotomine sandflies maps*. Stockholm: ECDC. Disponible en: www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/images/map-Phlebotomus_perniciosus distribution July 2019.png

European Parliament. (2014). *Regulation (EU) No 1143/2014*. Council of 22 October 2014 on the Prevention and Management of the Introduction and Spread of Invasive Alien Species.

Fernández-Arévalo, A., Ballart, C., Muñoz-Basagoiti, J., Basarte, L., Lobato, G., Arnau, A., Abras, A., Tebar, S., Llovet, T., Lami, P., Pratlong, F., Alsina, M., Roe, E., Puig, L., Muñoz, C., & Gállego, M. (2022). Autochthonous and imported tegumentary leishmaniasis in Catalonia (Spain): Aetiological evolution in the last four decades and usefulness of different typing approaches based on biochemical, molecular and proteomic markers. *Transboundary and Emerging Diseases*, *69*(3), 1404–1418. https://doi.org/10.1111/tbed.14107

Filioussis, G., Petridou, E., Papadopoulos, D., Karavanis, E., Morgan, E., Billinis, C., & Papadopoulos, E. (2018). Hemorrhagic pneumonia in neonatal minks in Greece concomitant with *Leismania infantum* detection. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *21*(2), 405–408. https://doi.org/10.24425/122608

Frank, C., Hadziandoniou, M., Pratlong, F., Garifallou, A., & Rioux, J. A. (1993). *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* responsible for cutaneous leishmaniasis in Greece: sixteen autochthonous cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *87*(2), 184–185. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90482-6

Franssen, S. U., Sanders, M. J., Berriman, M., Petersen, C. A., & Cotton, J. A. (2022). Geographic Origin and Vertical Transmission of *Leishmania infantum* Parasites in Hunting Hounds, United States. *Emerging Infectious Diseases*, *28*(6), 1211–1223. https://doi.org/10.3201/eid2806.211746

Galán-Puchades M.T., Gómez-Samblás M., Suárez-Morán J.M., Osuna A., Sanxis-Furió J., Pascual J., Bueno-Marí R., Franco S., Peracho V., Montalvo T., Fuentes M.V. (2019). Leishmaniasis in Norway Rats in Sewers, Barcelona, Spain. *Emerg Infect Dis.,* 25(6), 1222-1224. https://doi.org/10.3201/eid2506.181027

Gálvez, R., Montoya, A., Cruz, I., Fernández, C., Martín, O., Checa, R., Chicharro, C., Migueláñez, S., Marino, V., & Miró, G. (2020). Latest trends in *Leishmania infantum* infection in dogs in Spain, Part I: Mapped seroprevalence and sand fly distributions. *Parasites and Vectors*, *13*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04081-7

Ghawar, W., Toumi, A., Snoussi, M.-A., Chlif, S., Zâatour, A., Boukthir, A., Bel Haj Hamida, N., Chemkhi, J., Diouani, M. F., & Ben-Salah, A. (2011). *Leishmania major* Infection Among *Psammomys Obesus* and *Meriones Shawi*: Reservoirs of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Sidi Bouzid (Central Tunisia). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *11*(12), 1561–1568. https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0712

Gholipour, H., Busquets, N., Fernández-Aguilar, X., Sánchez, A., Ribas, M. P., De Pedro, G., Lizarraga, P., Alarcia-Alejos, O., Temiño, C., & Cabezón, O. (2017). Influenza A Virus Surveillance in the Invasive American Mink (*Neovison vison*) from Freshwater Ecosystems, Northern Spain. *Zoonoses and Public Health*, *64*(5), 363–369. https://doi.org/10.1111/zph.12316

Gicheru, M. M., Jeneby, M. M., Macharia, J. C., Carlsson, H. E., & Suleman, M. A. (2009). Prevalence of antibodies and cell mediated immune response against *Leishmania major* in feral nonhuman primates from Kenya. *Acta Tropica*, *109*(2), 136–140. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.020

Gijón-Robles, P., Abattouy, N., Merino-Espinosa, G., El Khalfaoui, N., Morillas-Márquez, F., Corpas-López, V., Porcel-Rodríguez, L., Jaaouani, N., Díaz-Sáez, V., Riyad, M., & Martín-Sánchez, J. (2018). Risk factors for the expansion of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania tropica*: Possible implications for control programmes. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*(6), 1615–1626. https://doi.org/10.1111/tbed.12914

Gomes, J., Rocha, H., Carvalho, C., Bandeira, V., Fonseca, C., Rosalino, L. M., & Cunha, M. V. (2020). Molecular detection and characterization of *Leishmania infantum* in free-ranging Egyptian mongoose (*Herpestes ichneumon*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *11*(February), 158–162. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.02.001

Gómez-Hernández, C., Bento, E. C., Rezende-Oliveira, K., Nascentes, G. A. N., Barbosa, C. G., Batista, L. R., Tiburcio, M. G. S., Pedrosa, A. L., Lages-Silva, E., Ramírez, J. D., & Ramirez, L. E. (2017). *Leishmania* infection in bats from a non-endemic region of leishmaniasis in Brazil. *Parasitology*, *144*(14), 1980–1985. https://doi.org/10.1017/S0031182017001500

González M. A., Ruiz-Arrondo I., Gutiérrez-López R., Barceló C., Miranda M. Á. (2023) First Record of *Phlebotomus* (*Larroussius*) *perfiliewi* (Diptera: Psychodidae), Vector of *Leishmania infantum* and Phleboviruses, in Spain. *Diversity*, 15(3), 400. https://doi.org/10.3390/d15030400

Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, *35*(11–12), 1169–1180. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.001

Halliday, C., Yanase, R., Catta-Preta, C. M. C., Moreira-Leite, F., Myskova, J., Pruzinova, K., Volf, P., Mottram, J. C., & Sunter, J. D. (2020). Role for the flagellum attachment zone in *Leishmania* anterior cell tip morphogenesis. *PLoS Pathogens*, *16*(10), 1–26. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008494

Helhazar, M., Leitão, J., Duarte, A., Tavares, L., & Pereira da Fonseca, I. (2013). Natural infection of synathropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra-Portugal. *Parasites & Vectors*, *8*(88). https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-88

Hong, A., Zampieri, R. A., Shaw, J. J., Floeter-Winter, L. M., & Laranjeira-Silva, M. F. (2020). One health approach to leishmaniases: Understanding the disease dynamics through diagnostic tools. *Pathogens*, *9*(10), 1–24. https://doi.org/10.3390/pathogens9100809

Iatta, R., Mendoza-Roldan, J. A., Latrofa, M. S., Cascio, A., Brianti, E., Pombi, M., Gabrielli, S., & Otranto, D. (2021). *Leishmania tarentolae* and *Leishmania infantum* in humans, dogs and cats in the Pelagie archipelago, southern Italy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *15*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009817

Jaskowska, E., Butler, C., Preston, G., & Kelly, S. (2015). *Phytomonas*: Trypanosomatids Adapted to Plant Environments. *PLoS Pathogens*, *11*(1), 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004484

Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., & Molina, R. (2014). Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Veterinary Parasitology*, *202*, 296–300. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.027

Karayiannis, S., Ntais, P., Messaritakis, I., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., & Antoniou, M. (2015). Detection of *Leishmania Infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes)* in Central Greece. *Parasitology*, *142*, 1574–1578. https://doi.org/10.1017/S0031182015001158

Karmaoui, A. (2020). Seasonal Distribution of *Phlebotomus papatasi*, Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. *Acta Parasitologica*, *65*(3), 585–598. https://doi.org/10.2478/s11686-020-00201-6

Kassahun, A., Sadlova, J., Benda, P., Kostalova, T., Warburg, A., Hailu, A., Baneth, G., Volf, P., & Votypka, J. (2015). Natural infection of bats with *Leishmania* in Ethiopia. *Acta Tropica*, *150*, 166–170. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.024

Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites and Vectors*, *10*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7

Klatt, S., Simpson, L., Maslov, D. A., & Konthur, Z. (2019). *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(7), 1–29. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007424

Knöpfel, N., Noguera-Morel, L., Azorin, D., Sanz, F., Torrelo, A., & Hernández-Martín, A. (2018). Cutaneous *Leishmania tropica* in children: report of three imported cases successfully treated with liposomal amphotericin B. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *32*(1), e8–e10. https://doi.org/10.1111/jdv.14434

Kostygov, A. Y., & Yurchenko, V. (2017). Revised classification of the subfamily Leishmaniinae (Trypanosomatidae). *Folia Parasitologica*, *64*, 1–5. https://doi.org/10.14411/fp.2017.020

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

Kushwaha, A. K., Scorza, B. M., Singh, O. P., Rowton, E., Lawyer, P., Sundar, S., & Petersen, C. A. (2022). Domestic mammals as reservoirs for *Leishmania donovani* on the Indian subcontinent: Possibility and consequences on elimination. *Transboundary and Emerging Diseases*, *69*(2), 268–277. https://doi.org/10.1111/tbed.14061

Labbé, F., Abdeladhim, M., Abrudan, J., Araki, A. S., Araujo, R. N., Arensburger, P., Benoit, J. B., Brazil, R. P., Bruno, R. V., Rivas, G. B. da S., de Abreu, V. C., Charamis, J., Coutinho-Abreu, I. V., da Costa-Latgé, S. G., Darby, A., Dillon, V. M., Emrich, S. J., Fernandez-Medina, D., Gontijo, N. F., … McDowell, M. A. (2023). Genomic analysis of two phlebotomine sand fly vectors of *Leishmania* from the New and Old World. In *PLoS Neglected Tropical Diseases,* 17 (4). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010862

Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Dereure, J., Lamothe, J., Dedet, J. P., & Bastien, P. (2002a). Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*, *125*(3), 197–207. doi: 10.1017/s0031182002002081.

Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. P., & Bastien, P. (2002b). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(1), 210–215. https://doi.org/10.1128/jcm.40.1.210-215.2002

Lainson, R., Braga, R. R., De Souza, A. A. A., Pôvoa, M. M., Ishikawa, E. A. Y., & Silveira, F. T. (1989). *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* sp. N., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, *3*, 200–207.

Le Rutte, E. A., van Straten, R., & Overgaauw, P. A. M. (2018). Awareness and control of canine leishmaniosis: A survey among Spanish and French veterinarians. *Veterinary Parasitology*, *253*(January), 87–93. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.013

Lemma, W., Erenso, G., Gadisa, E., Balkew, M., Gebre-michael, T., & Hailu, A. (2009). A zoonotic focus of cutaneous leishmaniasis in Addis Ababa, Ethiopia. *Parasites & Vectors*, *2*(60), 1–8. https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-60

Llanos-Cuenta, A. (2013). Leishmaniasis. In A. Werner (Ed.), *Parasitología Humana* (1st ed.). McGraw-Hill. ISBN: 978-607-15-0876-8

Louradour, I., Ferreira, T. R., Ghosh, K., Shaik, J., & Sacks, D. (2020). In Vitro Generation of *Leishmania* Hybrids. *Cell Reports*, *31*(2). https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.071

Luppi, M. M., Malta, M. C. C., Silva, T. M. A., Silva, F. L., Motta, R. O. C., Miranda, I., Ecco, R., & Santos, R. L. (2008). Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Veterinary Parasitology*, *155*(1–2), 146–151. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.024

MAGRAMA. (2013). Ministerio de Agricultura, Alimentación Y Medio Ambiente. Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras. *Boletín Oficial Del Estado*, *185*, 56764–56786.

Mahdy, M. A. A., Younis, W., & Ewaida, Z. (2020). An Overview of SARS-CoV-2 and Animal Infection. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*(December). https://doi.org/10.3389/fvets.2020.596391

Maia, C., Conceição, C., Pereira, A., Rocha, R., Ortuño, M., Muñozid, C., Jumakanova, Z., Pérez-Cutillas, P., Özbel, Y., Töz, S., Baneth, G., Monge-Maillo, B., Gasimov, E., Van der Stede, Y., Torres, G., Gossner, C. M., & Berriatua, E. (2023). The estimated distribution of autochthonous leishmaniasis by *Leishmania infantum* in Europe in 2005–2020. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *17*(7), 1–25. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011497

Malta, M. C. C., Tinoco, H. P., Xavier, M. N., Vieira, A. L. S., Costa, É. A., & Santos, R. L. (2010). Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Veterinary Parasitology*, *169*(1–2), 193–197. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.016

Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health. *Medical and Veterinary Entomology*, *27*, 123–147. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x

Martín-Sánchez, J., Rodríguez-Granger, J., Morillas-Márquez, F., Merino-Espinosa, G., Sampedro, A., Aliaga, L., Corpas-López, V., Tercedor-Sánchez, J., Aneiros-Fernández, J., Acedo-Sánchez, C., Porcel-Rodríguez, L., & Díaz-Sáez, V. (2020a). Leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Integration of human, animal and environmental data through a One Health approach. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(6), 2423–2434. https://doi.org/10.1111/tbed.13580

Martín-Sánchez, J., Torres-Medina, N., Corpas-López, V., Morillas-Márquez, F., & Díaz-Sáez, V. (2020b). Vertical transmission may play a greater role in the spread of *Leishmania infantum* in synanthropic *Mus musculus* rodents than previously believed. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(3), 1113–1118. https://doi.org/10.1111/tbed.13436

Martínez-Rondán, F. J., Ruiz de Ybáñez, M. R., Tizzani, P., López-Beceiro, A. M., Fidalgo, L. E., & Martínez-Carrasco, C. (2017). The American mink (*Neovison vison*) is a competent host for native European parasites. *Veterinary Parasitology*, *247*(October), 93–99. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.004

Martínez, M. F., Kowalewski, M. M., Giuliani, M. G., Acardi, S. A., & Salomón, O. D. (2020). Molecular identification of *Leishmania* in free-ranging black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) in northeastern Argentina. *Acta Tropica*, *210*(January), 105534. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105534

Mathison, B. A., & Bradley, B. T. (2023). Review of the Clinical Presentation, Pathology, Diagnosis, and Treatment of Leishmaniasis. *Lab Medicine*, *54*(4), 363–371. https://doi.org/10.1093/labmed/lmac134

Matlashewski, G. (2001). *Leishmania* infection and virulence. *Medical Microbiology and Immunology*, *190*(1–2), 37–42. https://doi.org/10.1007/s004300100076

Maxfield, L., & Crane, J. S. (2019). Leishmaniasis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30285351

Mendoza-Roldan, J. A., Latrofa, M. S., Iatta, R., R. S. Manoj, R., Panarese, R., Annoscia, G., Pombi, M., Zatelli, A., Beugnet, F., & Otranto, D. (2021). Detection of *Leishmania tarentolae* in lizards, sand flies and dogs in southern Italy, where *Leishmania infantum* is endemic: hindrances and opportunities. *Parasites and Vectors*, *14*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s13071-021-04973-2

Merino-Espinosa, G., Corpas-López, V., Callejón-Fernández, R., Porcel-Rodríguez, L., Díaz-Sáez, V., Gállego, M., Ballart, C., Molina, R., Jiménez, M., Morillas-Márquez, F., & Martín-Sánchez, J. (2016). Differential ecological traits of two *Phlebotomus sergenti* mitochondrial lineages in southwestern Europe and their epidemiological implications. *Tropical Medicine and International Health*, *21*(5), 630–641. https://doi.org/10.1111/tmi.12686

Mescouto-Borges, M. R. M., Maués, É., Costa, D. L., da Silva Pranchevicius, M. C., & Romero, G. A. S. (2013). Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: Report of two Brazilian human cases. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *17*(2), 263–266. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.017

Millán, J., Ferroglio, E., & Solano-Gallego, L. (2014a). Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitology Research*, *113*, 2005–2014. https://doi.org/10.1007/s00436-014-3929-2

Millán, J., López-Roig, M., Cabezón, O., & Serra-Cobo, J. (2014b). Absence of *Leishmania infantum* in cave bats in an endemic area in Spain. *Parasitology Research*, *113*(5), 1993–1995. https://doi.org/10.1007/s00436-014-3855-3

Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente. (2013). *Real Decreto 630/2013, de 2 de Agosto, por el que se Regula el Catálogo Español de Especies Exóticas*. «BOE» Núm. 185, de 3 de Agosto de 2013. Disponible en: www.boe.es/eli/es/rd/2013/08/02/630

Miró, G., Troyano, A., Montoya, A., Fariñas, F., Fermín, M. L., Flores, L., Rojo, C., Checa, R., Gálvez, R., Marino, V., Fragío, C., & Martínez-Nevado, E. (2018). First report of *Leishmania infantum* infection in the endangered orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in MadridSpain. *Parasites & Vectors*, *11*(185). https://doi.org/10.1186/s13071-018-2772-1

MITECO. (2024). *Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras- Mamíferos*. Ministerio Para La Transición Ecológica y El Reto Demográfico. Disponible en: www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/especies-exoticas-invasoras/ce_eei_mamiferos.html

Mitková, B., Hrazdilová, K., Amico, G. D., Duscher, G. G., Suchentrunk, F., Forejtek, P., Gherman, M., Matei, I. A., Monica, A., Daskalaki, A. A., Mihalca, A. D., Votýpka, J., Hulva, P., & Modrý, D. (2017). Eurasian golden jackal as host of canine vector-borne protists. *Parasites & Vectors*, *10*(183), 1–11. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2110-z

Moemenbellah-Fard, M. ., Kalantari, M., Rassi, Y., & Javadian, E. (2003). The PCR- based detection of *Leishmania major* infections in *Meriones libycus* (Rodentia: Muridae) from southern Iran. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, *97*(8), 865–873. https://doi.org/10.1179/000349803225002651

Mohebali, M., Arzamani, K., Zarei, Z., Akhoundi, B., Hajjaran, H., Raeghi, S., Heidari, Z., Motavalli-Haghi, S. M., Elikaee, S., Mousazadeh-Mojarrad, A., & Kakoei, Z. (2016). Canine Visceral Leishmaniasis in Wild Canines (Fox , Jackal , and Wolf) in Northeastern Iran Using Parasitological , Serological , and Molecular Methods. *Journal Arthropod-Borne Dis*, *10*(December), 538–545. PMID: 28032106; PMCID: PMC5186744.

Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., & Bernal, J. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, *190*, 268–271. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006

Montaner-Angoiti, E., & Llobat, L. (2023). Is leishmaniasis the new emerging zoonosis in the world? *Veterinary Research Communications*, *0123456789*. https://doi.org/10.1007/s11259-023-10171-5

Montoya, A., De Quadros, L. P., Mateo, M., Hernández, L., Gálvez, R., Alcántara, G., Checa, R., Jiménez, M. Á., Chicharro, C., Cruz, I., & Miró, G. (2016). *Leishmania infantum* infection in Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in a spanish wildlife park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *47*(2), 586–593. https://doi.org/10.1638/2014-0216.1

Morales-Yuste, M., Martín-Sánchez, J., & Corpas-López, V. (2022). Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Veterinary Sciences*, *9*(387). https://doi.org/10.3390/vetsci9080387

Müller, A., Montoya, A., Escacena, C., de la Cruz, M., Junco, A., Iriso, A., Marino, E., Fúster, F., & Miró, G. (2022). *Leishmania infantum* infection serosurveillance in stray dogs inhabiting the

Madrid community: 2007–2018. *Parasites and Vectors*, *15*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/s13071-022-05226-6

Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Parejo, J. C., Serrano, F. J., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., & Gómez-Nieto, L. C. (2013). First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: Application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Tropica*, *128*(3), 706–709. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.009

Naucke, T. J., Amelung, S., & Lorentz, S. (2016). First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasites & Vectors*, *9*(256), 1–4. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1551-0

Naucke, T. J., & Lorentz, S. (2012). First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites and Vectors*, *5*(1), 67. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-67

Navea- Pérez, H. M., Díaz- Sáez, V., Corpas- López, V., Merino- Espinosa, G., Morillas- Márquez, F., & Martín- Sánchez, J. (2015). *Leishmania infantum* in wild rodents : reservoirs or just irrelevant incidental hosts ? *Parasitology Research*, *114*, 2363–2370. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4434-y

Oerther, S., Jöst, H., Heitmann, A., Lühken, R., Krüger, A., Steinhausen, I., Brinker, C., Lorentz, S., Marx, M., Schmidt-Chanasit, J., Naucke, T., & Becker, N. (2020). Phlebotomine sand flies in Southwest Germany: An update with records in new locations. *Parasites and Vectors*, *13*(173). https://doi.org/10.1186/s13071-020-04058-6

Oleaga, A., Vicente, J., Ferroglio, E., Pegoraro de Macedo, M. R., Casais, R., Del Cerro, A., Espí, A., García, E. J., & Gortázar, C. (2015). Concomitance and interactions of pathogens in the Iberian wolf (*Canis lupus*). *Research in Veterinary Science*, *101*, 22–27. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.05.010

Oleaga, A., Zanet, S., Espí, A., Pegoraro de Macedo, M. R., Gortázar, C., & Ferroglio, E. (2018). *Leishmania* in wolves in northern Spain: A spreading zoonosis evidenced by wildlife sanitary surveillance. *Veterinary Parasitology*, *255*(January), 26–31. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.015

Ortega-García, M. V., Salguero, F. J., Rodríguez-Bertos, A., Moreno, I., García, N., García-Seco, T., Luz Torre, G., Domínguez, L., & Domínguez, M. (2019). A pathological study of *Leishmania infantum* natural infection in European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and Iberian

hares (*Lepus granatensis*). *Transboundary and Emerging Diseases*, *66*(6), 2474–2481. https://doi.org/10.1111/tbed.13305

Ortega, M. V., Moreno, I., Domínguez, M., de la Cruz, M. L., Martín, A. B., Rodríguez-Bertos, A., López, R., Navarro, A., González, S., Mazariegos, M., Goyache, J., Domínguez, L., & García, N. (2017). Application of a specific quantitative real-time PCR (qPCR) to identify *Leishmania infantum* DNA in spleen, skin and hair samples of wild Leporidae. *Veterinary Parasitology*, *243*(May), 92–99. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.015

Ortuño, M., Latrofa, M. S., Iborra, M. A., Pérez, P., Bernal, L. J., Risueño, J., Muñoz, C., Bernal, A., Sánchez, P. F., Manuel, L., Giada, S., Carla, A., Cortes, S., Campino, L., Otranto, D., & Berriatua, E. (2019). Genetic diversity and phylogenetic relationships between *Leishmania infantum* from dogs , humans and wildlife in south - east Spain. *Zoonoses Public Health*, *00*, 1–13. https://doi.org/10.1111/zph.12646

Panahi, E., Stanisic, D. I., Skinner, E. B., Faddy, H. M., Young, M. K., & Herrero, L. J. (2023). Detection of *Leishmania* (*Mundinia*) *macropodum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and heterologous *Leishmania* species antibodies among blood donors in a region of Australia with marsupial *Leishmania* endemicity. *International Journal of Infectious Diseases*, *130*, 42–47. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.10.006

Pareyn, M., Van Den Bosch, E., Girma, N., Van Houtte, N., Van Dongen, S., Van Der Auwera, G., Massebo, F., Shibru, S., & Leirs, H. (2019). Ecology and seasonality of sandflies and potential reservoirs of cutaneous leishmaniasis in Ochollo , a hotspot in southern Ethiopia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(8), 1–19. https://doi.org/10.1371/ journal.pntd.0007667

Pennisi, M. G., Hartmann, K., Lloret, A., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hosie, M. J., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., & Horzinek, M. C. (2013). Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *15*(7), 638–642. https://doi.org/10.1177/1098612X13489229

Pennisi, M. G., & Persichetti, M. F. (2018). Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? *Veterinary Parasitology*, *251*(January), 131–137. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.012

Pereira, A., Parreira, R., Cristóvão, J. M., Castelli, G., Bruno, F., Vitale, F., Campino, L., & Maia, C. (2020). Phylogenetic insights on *Leishmania* detected in cats as revealed by nucleotide sequence analysis of multiple genetic markers. *Infection, Genetics and Evolution*, *77*. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104069

Pérez-Ayala, A., Norman, F., Pérez-Molina, J. A., Herrero, J. M., Monge, B., & López-Vélez, R. (2009). Imported leishmaniasis: A heterogeneous group of diseases. *Journal of Travel Medicine*, *16*(6), 395–401. https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2009.00341.x

Piarroux, R., Fontes, M., Perasso, R., Gambarelli, F., Joblet, C., Dumon, H., & Quilici, M. (1995). Phylogenetic relationships between Old World *Leishmania* strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *73*, 249–252. https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00097-k.

Pombi, M., Giacomi, A., Barlozzari, G., Mendoza-Roldan, J., Macrì, G., Otranto, D., & Gabrielli, S. (2020). Molecular detection of *Leishmania* (*Sauroleishmania*) *tarentolae* in human blood and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in *Sergentomyia minuta*: unexpected host-parasite contacts. *Medical and Veterinary Entomology*, *34*(4), 470–475. https://doi.org/10.1111/mve.12464

Pourmohammadi, B., & Mohammadi-Azni, S. (2019). Molecular Detection of *Leishmania major* in *Hemiechinus auritus*, A Potential Reservoir of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Damghan, Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, *13*(3), 334–343. https://doi.org/10.18502/jad.v13i3.1542

Pradhan, S., Schwartz, R. A., Patil, A., Grabbe, S., & Goldust, M. (2022). Treatment options for leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, *47*(3), 516–521. https://doi.org/10.1111/ced.14919

Purroy, F. J. (2007). Sciurus vulgaris (Linnaeus, 1758). In L. J. Palomo, J. Gisbert, & J. C. Blanco (Eds.), *Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España* (pp. 378–380). Dirección General para la Biodiversidad-SECEM-SECEMU.

Quaresma, P. F., Rêgo, F. D., Botelho, H. A., da Silva, S. R., Moura, A. J., Neto, R. G. T., Madeira, F. M., Carvalho, M. B., Paglia, A. P., Melo, M. N., & Gontijo, C. M. F. F. (2011). Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *105*(10), 579–585. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.07.005

Ramos, R. A. N., Ramos, C. A. do N., Santos, E. M. de S., Araújo, F. R. de, Carvalho, G. A. de, Faustino, M. A. da G., & Alves, L. C. (2013). Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria, 22(3), 346–350.https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000300005*

Ratzlaff, F. R., Osmari, V., da Silva, D., de Paula Vasconcellos, J. S., Pötter, L., Fernandes, F. D., de Mello Filho, J. A., de Avila Botton, S., Vogel, F. S. F., & Sangioni, L. A. (2023).

Identification of infection by *Leishmania* spp. in wild and domestic animals in Brazil: a systematic review with meta-analysis (2001–2021). *Parasitology Research*, *122*(7), 1605–1619. https://doi.org/10.1007/s00436-023-07862-y

Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, *58*, 227–250. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557

Rebêlo, J. M., Rodrigues, B. L., Bandeira, M. D., Moraes, J. L., Fonteles, R. S., & Pereira, S. R. (2016). Detection of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in the Brazilian Amazonia. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology*, *41*(2), 303–308. https://doi.org/10.1111/jvec.12227

Ribas, M. P., Almería, S., Fernández-Aguilar, X., De Pedro, G., Lizarraga, P., Alarcia-Alejos, O., Molina-López, R., Obón, E., Gholipour, H., Temiño, C., Dubey, J. P., & Cabezón, O. (2018). Tracking T*oxoplasma gondii* in freshwater ecosystems: interaction with the invasive American mink (*Neovison vison*) in Spain. *Parasitology Research*, *117*(7), 2275–2281. https://doi.org/10.1007/s00436-018-5916-5

Richini-Pereira, V. B., Marson, P. M., Hayasaka, E. Y., Victoria, C., da Silva, R. C., & Langoni, H. (2014). Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *20*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-27

Risueño, J., Ortuño, M., Pérez-cutillas, P., Goyena, E., Maia, C., Cortes, S., Campino, L., Bernal, L. J., Muñoz, C., Arcenillas, I., Martínez-rondán, F. J., Gonzálvez, M., Collantes, F., Ortiz, J., Martínez- Carrasco, C., & Berriatua, E. (2018). Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife , dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain. *Veterinary Parasitology*, *259*(April), 61–67. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.05.012

Rodrigues, B. L., & Galati, E. A. B. (2023). Molecular taxonomy of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) with emphasis on DNA barcoding: A review. *Acta Tropica*, *238*. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106778

Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *3*(3), 251–262. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004

Rouhani, S., Mirzaei, A., Spotin, A., & Parvizi, P. (2014). Novel identification of *Leishmania*

major in *Hemiechinus auritus* and molecular detection of this parasite in *Meriones libycus* from an important foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Journal of Infection and Public Health, 7(3), 210–217. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2013.12.002*

Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D., & Kirk, P. M. (2015). A higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–60. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248

Ruiz-Olmo, J., Palazon, S., Bueno, F., Bravo, C., Munilla, I., & Romero, R. (1997). Distribution , Status and Colonization of the American Mink Mustela in Spain. *J. Wildl. Res.*, *2*(1), 30–36.

Saidi, N., Blaizot, R., Prévot, G., Aoun, K., Demar, M., Cazenave, P. A., Bouratbine, A., & Pied, S. (2023). Clinical and immunological spectra of human cutaneous leishmaniasis in North Africa and French Guiana. *Frontiers in Immunology*, *14*(July), 1–13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1134020

Santiago, M. E. B., Vasconcelos, R. O., Fattori, K. R., Munari, D. P., Michelin, A. de F., & Lima, V. M. F. (2007). An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). *Veterinary Parasitology*, *150*(4), 283–290. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.026

Sastre, N., Francino, O., Ramírez, O., Enseñat, C., Sánchez, A., & Altet, L. (2008). Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Veterinary Parasitology*, *158*(1–2), 117–120. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.08.008

Savani, E. S. M. M., de Almeida, M. F., de Oliveira Camargo, M. C. G., D'Auria, S. R. N., Silva, M. M. S., de Oliveira, M. L., & Sacramento, D. (2010). Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in Brazilian bats. *Veterinary Parasitology*, *168*(1–2), 5–10. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.019

Schönian, G., Mauricio, I., & Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology*, *26*(10), 466- 469469.https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.013

Shaw, J. (2007). The leishmaniases - survival and expansion in a changing world . A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *102*(August), 541–547. https://doi.org/10.1590/s0074-02762007000500001

Sidorovich, V., Kruuk, H., & Macdonald, D. W. (1999). Body size, and interactions between European and American mink (*Mustela lutreola* and *M. vison*) in Eastern Europe . *Journal of Zoology*, *248*(4), 521–527. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1999.tb01051.x

Silva, F. L., Oliveira, R. G., Silva, T. M. A., Xavier, M. N., Nascimento, E. F., & Santos, R. L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, *160*(1–2), 55–59. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.079

Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M. C., Trisciuoglio, A., & Gortázar, C. (2008). Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology*, *155*, 198–203. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.003

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, *165*(1–2), 1–18. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022

Souguir-Omrani, H., Chemkhi, J., Fathallah-Mili, A., Saadi-BenAoun, Y., BelHadjAli, I., Guizani, I., & Guerbouj, S. (2018). *Paraechinus aethiopicus* (Ehrenberg 1832) and *Atelerix algirus* (Lereboullet 1842) hedgehogs: Possible reservoirs of endemic leishmaniases in Tunisia. *Infection, Genetics and Evolution*, *63*(December 2017), 219–230. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.029

Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, *10*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5

Sunantaraporn, S., Thepparat, A., Phumee, A., Sor-Suwan, S., Boonserm, R., Bellis, G. & Siriyasatien, P. (2021) *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors for *Leishmania martiniquensis* and *Trypanosoma* sp. in northern Thailand. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 15(12): e0010014. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010014

Talmi-frank, D., Kedem-Vaanunu, N., King, R., Bar-Gal, G. K., Edery, N., Jaffe, C. L., & Baneth, G. (2010). *Leishmania tropica* infection in Golden Jackals and Red Foxes, Israel. *Emerging Infectious Diseases*, *16*(12), 1973–1975. https://doi.org/10.3201/eid1612.100953

Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpazees. *Molecular Biology and Evolution*, *10*(3),512–526. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023

Taylor, V. M., Muñoz, D. L., Cedeño, D. L., Vélez, I. D., Jones, M. A., & Robledo, S. M. (2010). *Leishmania tarentolae:* Utility as an in vitro model for screening of antileishmanial agents. *Experimental Parasitology*, *126*(4), 471–475. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.05.016

Telleria, J., Bosseno, M. F., Tarifa, T., Buitrago, R., Martinez, E., Torrez, M., Le Pont, F., & Brenière, S. F. (1999). Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean focus of Bolivia identified by kDNA-polymerase chain reaction. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *94*(1), 5–6. https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000100002

Toepp, A. J., Bennett, C., Scott, B., Senesac, R., Oleson, J. J., & Petersen, C. A. (2019). Maternal *Leishmania infantum* infection status has significant impact on leishmaniasis in offspring. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(2), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007058

Tomás-Pérez, M., Khaldi, M., Riera, C., Mozo-León, D., Ribas, A., Hide, M., Barech, G., Benyettou, M., Seghiri, K., Doudou, S., & Fisa, R. (2014). First report of natural infection in hedgehogs with *Leishmania major*, a possible reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Algeria. *Acta Tropica*, *135*(1), 44–49. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.03.018

Tsakmakidis, I., Pavlou, C., Tamvakis, A., Papadopoulos, T., Christodoulou, V., Angelopoulou, K., Dovas, C. I., Antoniou, M., Anastasakis, C., & Diakou, A. (2019). *Leishmania* infection in lagomorphs and minks in Greece. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *16*(100279). https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100279

Tsokana, C. N., Sokos, C., Giannakopoulos, A., Birtsas, P., Valiakos, G., Spyrou, V., Athanasiou, L. V., Rodi Burriel, A., & Billinis, C. (2020). European Brown hare (*Lepus europaeus*) as a source of emerging and re-emerging pathogens of Public Health importance: A review. *Veterinary Medicine and Science*, *6*(3), 550–564. https://doi.org/10.1002/vms3.248

Tsokana, C. N., Sokos, C., Giannakopoulos, A., Mamuris, Z., Birtsas, P., Papaspyropoulos, K., Valiakos, G., Spyrou, V., Lefkaditis, M., Chatzopoulos, D. C., Kantere, M., Manolakou, K., Touloudi, A., Rodi Burriel, A., Ferroglio, E., Hadjichristodoulou, C., & Billinis, C. (2016). First evidence of *Leishmania* infection in European brown hare (*Lepus europaeus*) in Greece : GIS analysis and phylogenetic position within the *Leishmania* spp. *Parasitology Research*, *115*, 313–321. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4749-8

Tunalı, V., & Özbilgin, A. (2023). Knock, knock, knocking on Europe's door: Threat of leishmaniasis in Europe with a focus on Turkey. *Current Research in Parasitology and Vector-Borne Diseases*, *4*(100150). https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2023.100150

U.S. Disease Control and Prevention. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. (2017). *Leishmaniasis*. Disponible en: www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html

Van der Auwera, G., Maes, I., De Doncker, S., Ravel, C., Cnops, L., Van Esbroeck, M., Van Gompel,

A., Clerinx, J., & Dujardin, J. C. (2013). Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in european tropical infectious disease clinics. *Eurosurveillance*, *18*(30), 20543. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20543

Vaselek, S., & Volf, P. (2019). Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus tobbi* with different *Leishmania tropica* strains. *International Journal for Parasitology*, *49*(11), 831–835. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.05.009

Voltarelli, E., Arraes, S., Perles, T., Lonardoni, M., Teodoro, U., & Silveira, T. (2009). Serological survey for *Leishmania* sp. infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná State, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *15*(4). https://doi.org/ISSN 1678-9199

Votýpka, J., Suková, E., Kraeva, N., Ishemgulova, A., Duží, I., Lukeš, J., & Yurchenko, V. (2013). Diversity of Trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) Parasitizing Fleas (Insecta: Siphonaptera) and Description of a New Genus *Blechomonas* gen. n. *Protist*, *164*(6), 763–781. https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.08.002

World Health Organization. (2010). Control of the leishmaniases. *World Health Organization Technical Report Series*, *949*, 22–26. WHO (eds.). ISBN: 978 92 4 120949 6

World Health Organization, & Control of neglected tropical diseases. (2023a). *World: Endemicity of cutaneous leishmaniasis (CL), 2022*. World Health Organization. Disponible en: www.who.int/data/gho/map-gallery-search-results?&maptopics=910b5dfc-ce2e-4440-8b43-8d83f4a85485&term=leishmaniasis

World Health Organization, & Control of neglected tropical diseases. (2023b). *World: Endemicity of visceral leishmaniasis (VL), 2022*. World Health Organization. Disponible en: www.who.int/data/gho/map-gallery-search-results?&maptopics=910b5dfc-ce2e-4440-8b43-8d83f4a85485&term=leishmaniasis

Wu, Y., Jiang, M., Li, S., Waterfield, N. R., & Yang, G. (2022). Establish an allele-specific real-time PCR for *Leishmania* species identification. *Infectious Diseases of Poverty*, *11*(1). https://doi.org/10.1186/s40249-022-00992-y

Yadav, P., Azam, M., Ramesh, V., & Singh, R. (2023). Unusual Observations in Leishmaniasis—An Overview. *Pathogens*, *12*(2). https://doi.org/10.3390/pathogens12020297

ANEXOS

OTRAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- **Azami-Conesa, I.**, Gómez-Muñoz, M. T., & Martínez-Díaz, R. A. (2021). A systematic review (1990–2021) of wild animals infected with zoonotic *Leishmania*. *Microorganisms*, *9*(5). DOI: https://doi.org/10.3390/microorganisms9051101

- **Azami- Conesa, I.,** Matas- Méndez, P., Pérez- Moreno, P., Carrión, J., Alunda, J.M., Mateo-Barrientos, M., Gómez- Muñoz, M.T. (2024). Wildlife as a sentinel for pathogen introduction in non-endemic areas: Is *Leishmania tropica* circulating in wildlife in Spain? bioRxiv 2024.03.16.585353; DOI: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353. Prepint.

microorganisms

MDPI

Review

A Systematic Review (1990–2021) of Wild Animals Infected with Zoonotic *Leishmania*

Iris Azami-Conesa [1], María Teresa Gómez-Muñoz [1,*] and Rafael Alberto Martínez-Díaz [2]

[1] Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Sciences, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain; irisazami@ucm.es
[2] Department of Preventive Medicine and Public Health, and Microbiology, Faculty of Medicine, University Autónoma of Madrid, 28029 Madrid, Spain; rafael.martinez@uam.es
* Correspondence: mariateg@ucm.es

Abstract: Leishmaniasis are neglected diseases caused by several species of *Leishmania* that affect humans and many domestic and wild animals with a worldwide distribution. The objectives of this review are to identify wild animals naturally infected with zoonotic *Leishmania* species as well as the organs infected, methods employed for detection and percentage of infection. A literature search starting from 1990 was performed following the PRISMA methodology and 161 reports were included. One hundred and eighty-nine species from ten orders (i.e., Carnivora, Chiroptera, Cingulata, Didelphimorphia, Diprotodontia, Lagomorpha, Eulipotyphla, Pilosa, Primates and Rodentia) were reported to be infected, and a few animals were classified only at the genus level. An exhaustive list of species; diagnostic techniques, including PCR targets; infected organs; number of animals explored and percentage of positives are presented. *L. infantum* infection was described in 98 wild species and *L.* (*Viania*) spp. in 52 wild animals, while *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. major* and *L. tropica* were described in fewer than 32 animals each. During the last decade, intense research revealed new hosts within Chiroptera and Lagomorpha. Carnivores and rodents were the most relevant hosts for *L. infantum* and *L.* (*Viannia*) spp., with some species showing lesions, although in most of the studies clinical signs were not reported.

Keywords: *Leishmania*; host; reservoir; wildlife; wild mammal; zoonoses; one health

Citation: Azami-Conesa, I.; Gómez-Muñoz, M.T.; Martínez-Díaz, R.A. A Systematic Review (1990–2021) of Wild Animals Infected with Zoonotic *Leishmania*. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1101. https://doi.org/10.3390/microorganisms9051101

Academic Editor: David S. Lindsay

Received: 9 April 2021
Accepted: 14 May 2021
Published: 20 May 2021

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Included in the group known as neglected tropical diseases, the leishmaniases are a group of diseases caused by flagellated protozoan parasites from more than 20 species belonging to the genus *Leishmania*. The disease can appear with a variety of clinical pictures, depending on the species involved, the geographic region and the response of the host. Most people and animals infected by the parasite do not develop symptoms but, if present, the disease can follow three basic clinical forms in humans: cutaneous, mucocutaneous and visceral, while in animals, only cutaneous and/or visceral forms are observed. Leishmaniasis is a vector-borne disease transmitted by phlebotomine sand flies (order Diptera, family Psychodidae) with a worldwide distribution (Europe, Africa, the Americas, Asia, and one species recently described in Australia) and an endemic presence in more than 90 countries [1]. There are an estimated 350 million people at risk of *Leishmania* infection. The World Health Organization (WHO) estimates more than one million new cases per year in people around the world, making it one of the most relevant yet neglected parasitic diseases (https://www.who.int/leishmaniasis/en/, accesed on 8 January 2021). Leishmaniasis is one of the leading causes of morbidity in the world among infectious diseases and one of the leading causes of death among tropical diseases [2]. The disease is present in 98 of the 200 countries that collaborate with the WHO, and information is regularly updated by the organisation [3]. At least 39 described species of

Leishmania can be found in the literature, in addition to a significant number of informal or incomplete citations [4,5]. Many authors consider that some of these species should be synonymous and that the *Leishmania* taxonomy should be revised and simplified [6]. A list with the zoonotic species of the genus *Leishmania* along with their main characteristics is shown in Table 1.

Table 1. Zoonotic species of the genus *Leishmania* and their main characteristics (adapted from Ahoundi et al., 2016 and 2017 [4,5]).

Section	Subgenus	Species	Clinical Disease in humans	Geographic Area
Euleishmania	*Leishmania*	***L. aethiopica***	CL, DCL	Ethiopia, Kenya
		L. amazonensis	CL, DCL, MCL	Bolivia, Brazil and Venezuela
		L. donovani	VL, PKDL	Central Africa, South Asia, Middle East, India and China
		L. infantum	VL, CL	North Africa, South Europe, Middle East, Central Asia and North, Central and South America
		L. major	CL	Central and North Africa, Middle East and Central Asia
		L. mexicana	CL, DCL	USA, Mexico, Ecuador, Peru and Venezuela
		L. tropica	CL, VL	Central and North Africa, Middle East, Central Asia and India
		L. venezuelensis	CL	Northern South America
	Viannia	***L. braziliensis***	CL, MCL	Brazil, Bolivia, Peru, Guatemala and Venezuela
		L. guyanensis	CL, MCL	Bolivia, Brazil, French Guyana and Suriname
		L. lainsoni	CL	Brazil, Bolivia and Peru
		L. lindenbergi	CL	Brazil
		L. naiffi	CL	Brazil, French Guyana
		L. panamensis	CL, MCL	Brazil, Panama, Venezuela and Colombia
		L. peruviana	CL, MCL	Peru, Bolivia
		L. shawi	CL	Brazil
Paraleishmania		***L. colombiensis***	CL, VL	Colombia

Zoonotic species included in the systematic review are in bold. Clinical forms in humans: CL: cutaneous leishmaniasis; DCL: Diffuse cutaneous leishmaniasis; VL: visceral leishmaniasis; MCL: muco-cutaneous leishmaniasis; PKDL: Post-kala-azar dermal leishmaniasis.

All species of the genus follow a biological cycle with the same pattern, alternating amastigote forms that replicate intracellularly in the vertebrate host, and promastigote forms that reproduce in the digestive system of the insect vector (Figure 1). Sand flies (mainly *Phlebotomus* and *Lutzomya* genera) become infected while feeding on a parasitised reservoir. Through the bite, they ingest macrophage-bearing blood and tissue with amastigotes. Natural vectors have been experimentally proven to be highly susceptible, and one or two parasites are sufficient to initiate an infection [7]. For a species of sand fly to be a vector of zoonotic *Leishmania,* it must meet five conditions: (1) be anthropophilic; (2) feed from reservoir hosts in cycles of zoonotic transmission; (3) be infected in nature with the same *Leishmania* species that infects humans; (4) harbour the complete development of the parasite until it becomes infective; (5) be capable of transmitting the parasite through the bite [8].

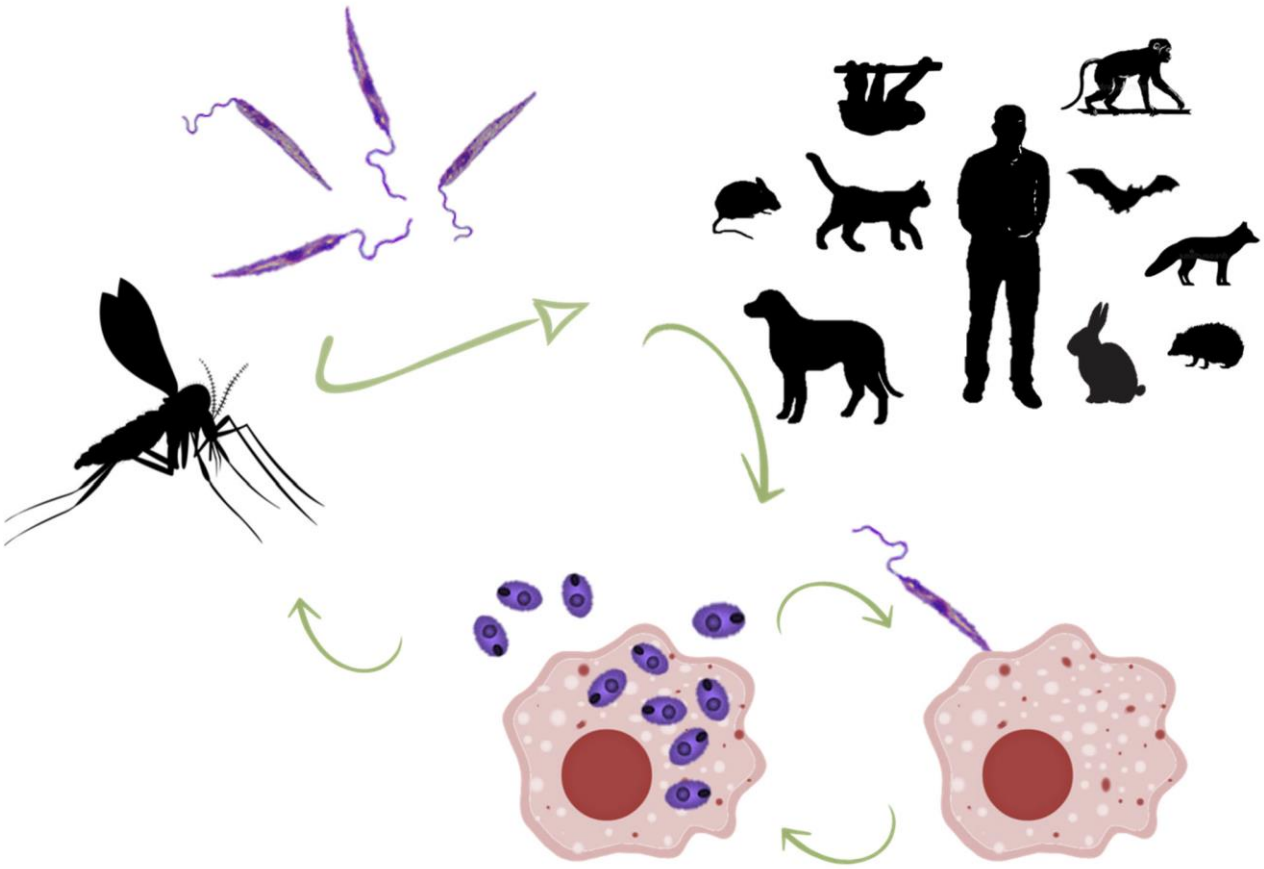


Figure 1. Life cycle of *Leishmania*: some of the wild animals found infected with the parasite are included.

Other infectious routes, such as venereal and vertical transmission, have been proved for *L. infantum* in a canine host [9], and it is seriously considered in humans [10]. Biting is a route suspected for canids [11], and the oral route has been confirmed in hamsters [12], which has been suggested to be associated with the ingestion of micromammals by common genets and servals [13], or the ingestion of phlebotomines by insectivorous bats [14]. In another study, the presence of *Leishmania* amastigotes and promastigotes in the faeces of gorillas have been reported [15]. Indeed, translocation of bacteria from the gut to distant locations helped by dendritic cells is a phenomenon widely studied in the human microbiome nowadays [16,17].

A combination of strategies is required for the prevention and control of the disease, including early diagnosis and prompt and effective treatment, vector control, effective disease surveillance, control of animal reservoir hosts and social mobilisation and strengthening partnerships [18]. Domestic animals have been widely studied and, traditionally, dogs are considered the main animal reservoir, and cats and equines have been found in several studies infected with the parasite [19]. However, dogs were found with similar or even lower prevalence than wildlife during some human outbreaks, probably due to preventive measures applied [20,21]. For these reasons, the investigation of the role of wildlife in the infectivity and potential transmission of the parasite is an important step in order to control future outbreaks, and to monitor the endemicity of certain areas. A change in the factors influencing the abundance of vectors (i.e., deforestation, climatic change, and new urbanised areas), or the presence of potential animal reservoirs in a spatial and temporal coincidence with humans, are essential factors in the appearance of outbreaks.

According to the WHO [22], the term "reservoir" should be used only for animals that are sufficiently abundant and long-lived to be a food source for sand flies and that maintain intense contact with the sand fly vector in its environment. Several characteristics are necessary: (1) more than 20% of the specimens should be infected; (2) the course of infection should be long; (3) parasites should be available in the skin or blood in sufficient numbers to be taken up by the sand flies; (4) the parasites in the reservoirs and humans should be the same [23]. Reservoir hosts usually represent a large proportion of the mammalian biomass [23]. Roque and Jansen [24] applied the terms "maintenance hosts" for mammals than can be infected and maintain the infection and "amplifier hosts" for mammals that, besides maintaining the infection, may favour the transmission (for example with more parasites in the blood and skin for longer periods). In this context, many of the wild animals mentioned in this review could be considered as maintenance hosts that may serve as secondary reservoirs, if adequate conditions for disease dissemination are present, while only a few could be considered as amplifier hosts (i.e., animals proved to infect the vector or with high prevalence values and close proximity with humans).

This paper presents updated information on wildlife as potential reservoir hosts for all zoonotic *Leishmania* species, following a systematic review from 1990 to nowadays. Previous reviews should be examined for partial and prior information [19,23–27].

2. Methods

This systematic review was carried out following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines [28]. The main objective of this review was the identification of potential reservoirs of zoonotic species of *Leishmania*. Specific objectives were to (1) identify wild animal species naturally infected with zoonotic species of *Leishmania*; (2) recover information on the organs infected; (3) recover information on the techniques employed for detection and identification; (4) report data on the prevalence obtained in each study. These wild species should be investigated when an outbreak of leishmaniasis is present, or to monitor the endemicity of the disease in certain areas.

2.1. Search Strategy and Databases

Three databases were employed: PubMed (Medline), Scopus and Web of Science (WoS). The terms of search were "*Leishmania*" AND "wild" AND "host" OR "mammal". The information was retrieved from 1990 to 27 February 2021 and included only articles in English and zoonotic species of *Leishmania* (Table 1). Each author revised one database and eliminated reports according to the exclusion criteria. Duplicates were removed from the list before the employment of Mendeley to upload the selected articles. After the screening, the articles selected for inclusion were deeply analysed according to the species of *Leishmania*: *Leishmania* (*Viannia*) spp. were analysed by MTGM, *Leishmania infantum* was analysed by IAC and the rest of the species were analysed by RAMD. When doubts arose, the three authors discussed them and reached a consensus.

2.2. Exclusion Criteria

Automatic tools were employed to exclude some of the articles, while others were screened by the authors. Keywords for exclusion in Scopus were: animal experiment, animal model, mice, inbred C57BL, protozoan proteins, Bagg albino mouse, insect vectors, signal transduction, gene expression regulation, drug effect, inducible nitric oxide synthase, protein function, upregulation, wild type, macrophages, enzyme activity, mice knockout, cytokine production, Interleukin 10, Interleukin 4, mutant, mice inbred BALB C, unclassified drug, C57BL mouse, gene deletion, mutation, Th1 cell, cytokine, chemistry, Interleukin 12, protein expression, gamma interferon, arginase and CD4+T lymphocyte. Areas excluded in WoS were: research experimental medicine, virology, genetics heredity,

biophysics, mycology, endocrinology metabolism, forestry, haematology, plant sciences, evolutionary biology, fisheries, oncology, physiology, polymer science and respiratory system.

Articles in Spanish, Portuguese, Turkish or French were excluded. Reviews, books and chapters of books, opinion articles, conference papers and letters were also excluded from the systematic review. Other criteria for exclusion were the following: experimental infections; clinical cases (except first citations); articles dealing with wild-type and genetically modified parasites; articles dealing only with human and/or domestic animals samples; articles dealing only with vectors or xenodiagnosis; articles dealing only with isolates obtained in previous studies; articles dealing only with phylogeny; studies with negative results to *Leishmania* infections; articles without enough information on the identification of *Leishmania* species; non-zoonotic species of *Leishmania*.

In total, 151 references were retrieved from the search of the databases, and ten more articles were found from other sources, and included (references from previous research articles and reviews) (Figure 2). All information contained in the tables was obtained from these articles, but additional references are included for the background. Recorded variables are included in the Supplementary Materials: host, number of animals sampled, organs analysed, method of detection, prevalence and geographic area.

Due to the variability found among the studies and taking into account that wild animals are not easy to sample, a meta-analysis was not conducted. The main objective of this review was to update the list of potential reservoirs of the parasite and, for that reason, even studies with only one animal of a certain species were included.

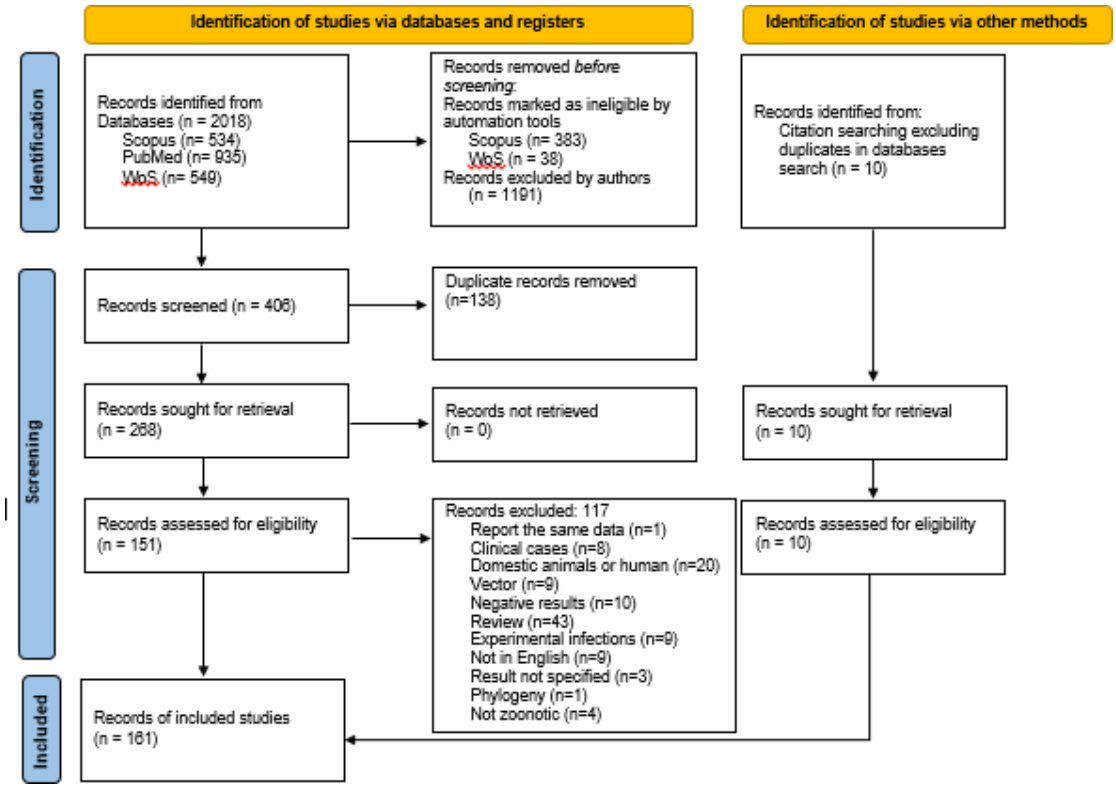


Figure 2. PRISMA 2020 flow diagram for the present systematic review.

3. Results

3.1. Result of the Search

The database search identified 2018 records, 534 from Scopus, 935 from PubMed and 549 from WoS. After removal of articles by automation tools and by authors using title and abstract, duplicates were removed. Exclusion criteria were further applied and an outcome of 161 articles was reached: 151 articles retrieved from databases and ten from other sources (Figure 2).

3.2. Wild Animals Infected with Zoonotic Leishmania (Viannia) spp.

Among the species of *Leishmania* described in the Americas, *L. braziliensis* is one of the most widely investigated. *L. (Viannia) braziliensis* is the species more extensively distributed, and it has been described in Latin American countries, from Mexico to more southern countries. Data from wildlife include not only Brazil but also Venezuela, Colombia, Honduras, Belize, Peru, Panama and Argentina (Supplementary Material File S1) [3,5]. Endemic leishmaniasis were present in several locations, such as the states of Sao Paulo and Minas Gerais in Brazil, especially where primary forest was substituted for human settlements [13]. Places such as coffee, banana or sugar cane plantations, ecotourism areas, or even chicken ruins and stables were known as breeding sites for the vector, and wild animals also became infected there [29–31]. Most of the studies were carried out in Brazil, especially in these endemic areas, whereas for other countries, such as Colombia, Peru, Bolivia, Venezuela or Argentina, infections were reported occasionally (Supplementary Material File S1).

Blood and skin were the sites of detection in many of the published epidemiological works, since they are the most accessible for the hematophagous vector (Supplementary Material File S1). However, when spleen, liver or bone marrow (BM) were included among the tissues analysed, prevalence rose, as the parasite tends to remain in these locations, even for species of *Leishmania* causing preferred cutaneous or mucocutaneous manifestations such as *L. (Viannia) braziliensis* or *L. mexicana*. Only one study employed oral swabs to successfully detect the DNA of the parasite [32].

Before the wide introduction of DNA amplification by PCR, fewer sensitive techniques were employed for the detection of *Leishmania*. Direct diagnosis of the parasite, such as examination of biopsies or imprints from skin or other organs, and culture in specific media were tested in rodents, marsupials and sloths in the past [24]. In fact, they are still being used in some studies today, although less frequently [30,31,33,34]. Serology has been extensively employed in domestic animals, but also in wildlife, as a sensitive and indirect evidence of *Leishmania* infection [30,35,36], and is the preferred method when studying the presence of *Leishmania* in wild carnivores [37] (Supplementary Material File S1). Xenodiagnosis by exploring transmission of the vector was rarely employed [29], although this approach could prove the reservoir character of the hosts. Finally, experimental infections of wild and synanthropic rodents and monkeys was an approach not frequently used and will not be treated here, because it is beyond the scope of this review [24].

Since PCR became a routine technique to detect *Leishmania* in tissues, the list of infected hosts has lengthened. Brandao-Filho et al. [30] compared three diagnostic tests with spleen samples from 203 animals (rodents and marsupials) and found kDNA PCR over three times more sensitive (17.6%) than traditional methods such as microscopy of imprints (5.7%) or culture (1.3%). Serology seems to be less sensitive than molecular techniques, as it was shown for the prevalence of *Leishmania* in *Didelphis marsupialis* (8.1% by serology vs. 20% by PCR) [38] and when small mammals were analysed (5% serology vs. 8.8–23.2% by PCR) [39].

A vast number of primers, methods and targets for PCR detection can be found in the literature [5], but a few of them are widely employed in epidemiological studies in wildlife by several authors. Some targets are recognised as highly sensitive; this is the case

for kinetoplast DNA (kDNA) which has more than 10,000 copies per cell [40]. PCR of kDNA has been employed for the detection of the parasite, followed by other approaches to determine the species of *Leishmania* present such as sequencing, RFLP or hybridisation (Supplementary Material File S1). In some papers, the employment of PCR that amplify ITS1 or SSU allows also for the classification at the species level [5,14].

Animals infected with zoonotic species of *L. (Viannia)* belong to the orders Carnivora, Cingulata, Chiroptera, Didelphimorphia, Lagomorpha, Pilosa, Primata and Rodentia, this last order being the most extensively studied.

Carnivores are usually blamed to be reservoirs of different species of *Leishmania*, and the scarce number of studies carried out revealed the presence of *Leishmania* (*Viannia*) spp. *L. braziliensis* DNAwas amplified by PCR in crab-eating dogs [34] and in Molina's hog-nose skunks, this last species being pointed out as a reservoir by the authors, since a strain was isolated from one animal [41]. Specific antibodies employing serological techniques, such as direct agglutination test (DAT), were found in high percentages in hoary foxes, ring-tailed coatis and crab-eating racoons (50–100%), but the authors tested a small number of the animals for each species [37] (for details, see Supplementary Material File S1).

The number of studies exploring the presence of *Leishmania* in bats has increased since 2013, when Shapiro et al. found DNA of the parasite in blood, liver and skin by PCR [42]. Since then, four more studies found *L.* (*Viannia*) spp. DNA in more than eight species of bats including hematophagous, insectivorous and frugivorous individuals [32,43–45].

Armadillos (order Cingulata) have been examined for *Leishmania* infection and found positive by PCR and culture plus zymodeme analysis in blood, spleen and liver [46] and in another study by PCR of the kDNA region, but the species of *Leishmania* present were not further investigated [34]. Regarding Lagomorpha, only one study demonstrated the presence of *L. braziliensis* in tapetis (*Sylvvilagus braziliensis*) in Colombia, employing xenodiagnosis and PCR followed by hybridisation [29] (Supplementary Material File S1).

The presence of *L. braziliensis* has previously been reported in sloths, rodents and marsupials, and the reservoir character of these groups has been shown by several authors in the past [13,23]. The order Didelphimorphia, especially the white-eared opossum (*Didelphis albiventris*), was the focus of at least sixteen studies employing diverse PCRs, culture and serology, with highly variables percentages of infection [21,29,30,34,37–39,47–55] (Supplementary Material File S1). In addition, xenodiagnosis was successful in this species as well as in the woolly-mouse opossum (*Micoureus demerarae*), which reinforces their role as main reservoirs of leishmaniasis [29,48]. One study found three two-toed-sloths (*Choloepus hoffmani*) infected with *L. panamensis* in Panama [56].

Rodents are the group most widely explored regarding *Leishmania* infections, both in natural and experimental conditions. The presence of *L. braziliensis* and other zoonotic species of the subgenus *Viannia* has been reported in 27 species including *Rattus rattus*, *Cerradomys subflavus, Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* and *Mus musculus,* the latter being the species more often investigated [21,29–31,33–37,39,47,49,50,53,55,57–63] (Supplementary Material File S1). This may be due to the fact of several reasons: their probable role as relevant reservoirs of leishmaniasis for humans, their proximity and high prevalence values (rats and domestic mouse), their abundance in ecological niches where phlebotomines reproduce, or to the successful attempts when xenodiagnosis or strain isolation were employed. Prevalence values varied from 1.2% to 100% depending on the sampling area, the sample size, the organs analysed, the diagnostic procedures employed for detection and characterisation and, probably, also on the age and lifespan of the sampled animals. Xenodiagnosis was successful in synanthropic species, such as black rats, and wild species, such as *Melanomys caliginosus* and *Mycroryzomys minutus.* The parasite was isolated by culture from *Akodon* spp., *Agouti paca, C. subflavus, N. lasiurus, R. rattus* and *Sigmodon hispidus*, but the PCR of kDNA was the preferred method for detection. When RFLP or sequencing was applied after PCR, the species could be determined, being *L. braziliensis* and *L. guyanensi* the most frequent. *L. naiffi*, *L. shawi* and *L. lainsoni* were obtained from rodents. Minor zoonotic species, such *L. shawi* and *L. naiffi,*

were detected in species of the genus *Trichomys* [36], and *L. lainsoni* was mainly found in the big rodent paca (*Agouti paca*) [57] (Supplementary Material File S1). Less frequent species of *Leishmania*, such as *L. peruviana,* were obtained from rodents and Didelphimorphia in Peru [47].

Only four studies were performed on primates employing PCR of KDNA, miniexon or ITS regions, some followed by sequencing or RFLP [34,37,64,65], while DAT was only employed in one study. *Leishmania* (*Viannia*) spp. was found between 8.6–100% of the animals analysed, with *L. braziliensis* being present, when identified to the species level [37].

All these investigations are summarized in Table 2.

Table 2. Wild animals reported infected with zoonotic *Leishmania* (*Viannia*) species. Organs or tissues where the parasite was detected are indicated, as well as the techniques employed for detection. *L* (*Viannia*) species are as follows: Lb: *L. braziliensis*, Lg: *L. guyanensis*, LVsp: *Leishmania* (*Viannia*) spp., Lsp: *Leishmania* sp., Lpa: *L. panamensis*, Lpe: *L. peruviana*, Ln: *L. naiffi*, Ls: *L. shawi* and Ll: *L. lainsoni*.

Host	Prevalence	Organs/Tissue Analysed	Methods for Detection	*Leishmania* (*Viannia*) species	Country	References
Order Carnivora						
Cerdocyon thous (crab-eating fox)	20–100%	blood, serum	PCR (kDNA), DAT	LVsp	Brazil	[34] [37]
Conepatus chinga rex (Molina's hog-nose skunk)	50%	Skin + liver + spleen	Inoculation to hamster, isoenzyme analysis, hybridisation, PCR (kDNA)	Lb	Bolivia	[41]
Lycalopex (Pseudalopex) vetulus (hoary fox)	100%	serum	DAT	LVsp	Brazil	[37]
Nasua nasua (ring-tailed coati)	50%	serum	DAT	LVsp	Brazil	[37]
Procyon cancrivorous (crab-eating raccoon)	50%	serum	DAT	LVsp	Brazil	[37]
Order Cingulata						
Dasypus novemcinctus (armadillo)	15.6%	blood, LN, liver, skin, spleen	Culture, zymodeme analysis	Lb	Brazil	[46]
Dasypus sp.	100%	blood	PCR (kDNA)	LVsp	Brazil	[34]
Order Chiroptera						
Artibeus planirostris (frugivorous)	4.3%	skin	PCR (kDNA), PCR (HSP70) + RFLP, PCR (G6DP) + sequencing	Lb	Brazil	[43]
Cynomops planirostris (insectivorous)	11.1%	liver, skin	PCR (kDNA), nPCR (SSU) + sequencing	Lb	Brazil	[44]
Desmodus rotundus (hematophagous)	3.2%	blood	PCR (kDNA), PCR (Cyt B) + sequencing	Lb	Brazil	[43]
Eumops perotis (insectivorous)	5.6%	blood	PCR (kDNA), PCR (Cyt B) + sequencing	Lb	Brazil	[45]
Glossophaga soricina (insectivorous)	0.9–40%	blood, liver, spleen	PCR (ITS1) + RFLP, PCR (kDNA, PCR (Cyt B) + sequencing	Lb	Brazil	[42,44,45]
Lasiurus cinereus (insectivorous)	20%	liver, skin	PCR (kDNA), nPCR (SSU) + sequencing	Lb, LVsp	Brazil	[44]
Molossus molossus (insectivorous)	44–25%	blood	PCR (ITS1) + RFLP, PCR (kDNA), PCR (Cyt b) + sequencing	Lb	Brazil	[42,45]
Platyrrhinus lineatus (frugivorous)	13.3%	skin	PCR (kDNA), PCR (HSP70) + RFLP, PCR (G6DP) + sequencing	Lb	Brazil	[43]
Several species: *Artibeus lituratus, Carollia perspicillata, Diphylla ecaudata and Glossophaga soricina*)	19.8%	oral swab	PCR (SSU) + sequencing	LVsp	Brazil	[32]
Order Didelphimorphia						
Didelphis albiventris (white-eared opossum)	1.6–50%	blood, BM, liver, serum, skin (tail/ear), spleen	culture, imprints, isoenzymes, PCR (kDNA), qPCR (kDNA) PCR (ITS1), PCR (HSP70), PCR (HSP70) + RFLP, PCR (ITS) + RFLP, nPCR (SSU) + sequencing, IFAT, DAT	Lb, LVsp, Lg, Lpe	Peru, Brazil	[21,30,37–39,47,50–54]

Didelphis marsupialis (common opossum)	20–33.3%	ear	PCR (kDNA), hybridisation, xenodiagnoses vector	Lb, LVsp	Colombia	[29,49]
Didelphis sp.	90%	blood	PCR (kDNA), culture	LVsp	Brazil	[34]
Marmosa sp.	16.7–25%	skin, spleen	PCR (kDNA), smears, culture	LVsp	Brazil	[30,39]
Gracilinanus agilis (agile gracile opossum)	1.4–75%	blood, BM, liver, skin (tail/ear), spleen	PCR (kDNA), PCR (HSP70), PCR (HSP70) + RFLP, PCR (ITS) + RFLP	Lb, LVsp, Lg	Brazil	[21,55]
Marmosops incanus (grey slender opossum)	50%	ear skin	PCR (HSP70) + RFLP		Brazil	[21]
Temerarae (woolly mouse opossum)	66.7%	ear	PCR (kDNA), hybridisation, xenodiagnoses vector	Lb	Colombia	[29]
Monodelphis domestica	25%	skin, spleen	PCR (kDNA)	LVsp	Brazil	[39]
Micoureus pagaruayanus (woolly-mouse opossum)	4.2–11.6%	skin	PCR (kDNA), qPCR (kDNA), nPCR (SSU), nPCR (G6DP)	Lb, LVsp	Brazil	[48]
Micoureus sp.	100%	blood	PCR (kDNA)	LVsp or Lsp.	Brazil	[34]
Order Lagomorpha						
Sylvilagus brasiliensis (tapeti)	100% (*n* = 1)	ear	PCR (kDNA), hybridisation, xenodiagnoses vector	Lb	Colombia	[29]
Order Pilosa						
Choloepus hoffmani (two-toed sloth)	75%	blood	Culture, PCR (kDNA), PCR (HSP70)	Lpa	Panama	[56]
Order Primates						
Alouatta caraya (black howler)	8.3%	ear tissue	PCR (ITS) + RFLP + sequencing	Lb, LVsp	Argentina	[64]
Aotus azarai (Azara's night monkey)	44.4%	blood, spleen	PCR (miniexon) + RFLP + sequencing	Lb	Argentina	[65]
Callithrix sp.	100%	blood	PCR (kDNA)	LVsp	Brazil	[34]
Cebus apella (tufted capuchin)	100%	serum	DAT	LVsp	Brazil	[37]
Order Rodentia						
Agouti paca (paca)	100%	skin	culture, isoenzymes, inoculation hamster	Ll	Brazil	[57]
Akodon arviculoides	4%	spleen	smears, PCR (kDNA)	LVsp	Brazil	[30]
Akodon cursor	9.7%	liver, skin (tail), spleen	culture (liver and skin), PCR (kDNA)	Lb	Brazil	[31]
Akodon sp.	2.6%	blood, skin	culture + isoenzymes, PCR	LVsp	Peru	[47]
Cerradomys (sin. *Oryzomys) subflavus*	7.8–50%	BM, liver, skin (tail/ear), spleen	culture (skin), PCR (kDNA), PCR (kDNA) + hybridisation, nPCR (SSU) + sequencing, PCR (HSP70) + RFLP	Lb, LVsp	Brazil	[31,39,50,53,57]
Calomys expulsus	3.3%	liver	PCR (kDNA)	LVsp	Brazil	[55]
Dasyprocta azarae (Agouti)	75%	serum	DAT		Brazil	[37]
Holochilus scieurus	7.1–15%	skin, spleen	imprints, PCR (kDNA)	LVsp	Brazil	[30,39]
Melanomys caliginosus	21.4%	ear	PCR (kDNA) + hybridisation	Lb	Colombia	[29]
Microryzomys minutus	50%	ear	PCR (kDNA) + hybridisation	Lb	Colombia	[29]
Mus musculus	55–100%	blood, BM, liver, skin (tail/ear), spleen	PCR (kDNA) + RFLP, nPCR (SSU) + sequencing	Lb, LVsp	Brazil	[34,50,59]
Necromys (sin. Bolomys) lasiurus	4.9–100%	BM, liver, skin (tail/ear), spleen	culture, imprints, PCR (kDNA), PCR (kDNA) + RFLP, serodeme, isoenzyme, PCR (ITS) + RFLP, PCR (D7 24Sα rRNA =	Lb	Brazil	[30,35,50,59,60]

154

			trypanosomatids) & PCR (ITS) + sequencing, nPCR (SSU) + sequencing			
Nectomys squamipes	7.2–28.1%	skin, spleen	culture, smears, serodeme, isoenzyme, PCR (ITS) + RFLP, PCR (kDNA), serology rK39 Ag, inoculation to hamster, zymodeme	Lb, LVsp	Brazil	[30,39,60]
Oecomys trinitatus	100% (*n* = 1)	ear skin	PCR (kDNA)	LV sp	Colombia	[49]
Oligoryzomis nigripes	26.8%	liver	PCR (kDNA)	LV sp	Brazil	[55]
Oxymyicterus dasytrichus	33.3%	liver	culture, PCR (kDNA), PCR (HSP70) + RFLP	Lb	Brazil	[31]
Phyllotis andinum	1.2%	blood, skin	culture + isoenzymes, PCR	LVsp, Lpe	Peru	[47]
Proechymis sp.	100% (*n* = 1)	liver, skin	PCR (kDNA)	LVsp	Brazil	[61]
Rhipidomys macrurus	29.6%	ear skin	PCR (D7 24Sα rRNA trypanosomatids) and PCR ITS + sequencing	Lb	Brazil	[35]
Rattus norvegicus (brown rat)	26.9–66.6%	blood, BM, liver, skin (tail/ear), spleen,	nPCR (SSU) + sequencing	Lb	Brazil	[50,62]
Rattus rattus (black rat)	2.5–50%	blood, BM, liver, skin (tail/ear), spleen	culture, hybridisation, smears, serodeme, isoenzyme, PCR (kDNA), PCR (kDNA) + RFLP, PCR (ITS) + RFLP, nPCR (SSU)+ sequencing, PCR (HSP70) + RFLP, serology rK39 Ag	Lb, LVsp	Brazil, Colombia, Venezuela	[29,30,33,39,50,53,57,60,63]
Sigmodon hispidus (hispid cotton rat)	0.3%-100% (*n* = 1)	blood, ear skin	culture, PCR (kDNA), PCR (kDNA) + RFLP or hybridisation	Lb, LVsp	Venezuela Colombia	[33] [49]
Trichomys apereoides	6.3–15.6%	liver, skin (tail/ear)	PCR (HSP70) + RFLP	Lb, Lg	Brazil	[21]
Trichomys fosteri	2.5%	spleen	PCR (kDNA), PCR (HSP70)	Ln	Brazil	[36]
Trichomys inermis	3%	spleen	PCR (kDNA), PCR HSP70	Ls	Brazil	[36]
Trichomys laurentis	2–3.9%	spleen	PCR (kDNA), PCR (HSP70)	Lb, Ls, Ln, Lg	Brazil	[36]
Trichomys sp.	100% (*n* = 1)	blood	PCR (kDNA)	LVsp	Brazil	[34]
Zygodontomys bruneus	100% (*n* = 1)	ear skin	PCR (kDNA)	LVsp	Colombia	[49]

BM: bone marrow; Cytb: cytochrome B; DAT: direct agglutination test; FML: fucose-mannose ligand; G6DP: glucose e phosphate dehydrogenase; HSP70: heat shock protein 70 kDa; IHC: immunohistochemistry; IC: immunochromatography; ELISA: enzyme immune assay; IFAT: immunofluorescence assay; ITS: internal transcriber spacer; kDNA: kinetoplast DNA; LN: lymph node; nPCR: nested PCR; qPCR: quantitative PCR; RFLP: restriction fragment length polymorphism; SSU: small subunit of ribosomal RNA.

155

In previous reviews [23,24], other species of wild animals were found infected with *Leishmania* (*Viannia*) spp., such as rodents (*Coendu* sp., *Rhipidomys leucodactylus*, *Heteromys dermarestianus*, *Proechymis semispinosus*, *Trichomys pachyurus*), sloths (*Choleopus didactylus*, *Bradypus infuscatus*, *Bradypus tridactylus*), anteanters (*Tamandua tetradactyla*), primates (*Aotus trivirgatus*, *Cebus apella*, *Chiropotes satanas*, *Sanguinus geoffroyi*) and carnivores (*Nasua nasua*, *Potos flavus*). For more details, see previous articles dealing with leishmaniasis in the Americas [23,24].

3.3. Wild Animals Infected with Leishmania amazonensis.

L. amazonensis was described in countries from Central and South America, where data were available, including Costa Rica, Panama, Venezuela, Colombia, Ecuador, Peru, Argentina, Uruguay, French Guiana, Surinam, Brazil and Bolivia, the last two countries being the most widely studied [3,5]. This review includes updated information of wild animals infected with the parasite from surveys carried out in Brazil, Bolivia and Argentina.

Among carnivores, *L. amazonensis* was detected only in one of two skunks analysed from a focus of leishmaniasis in Bolivia [41]. More information was retrieved from three studies including several species of bats [14,45,66]. Most of the species analysed were insectivorous bats, but the parasite was also detected in hematophagous (*Desmodus rotundus*), nectarivorous and omnivorous species. Prevalence values varied from 1% to 25%, probably depending on the geographic area, the species and the organs or techniques employed for detection. Higher values were observed in *Sturnira lilium* and *Eumops auripendulus* from urban areas and remnants of primitive forest of Sao Paulo (Brazil), employing nested PCR from liver and spleen (Supplementary Material File S2).

Primates and opossum have been scarcely reported with *L. amazonensis* in the last 30 years, but the species was recently detected by PCR of the ITS region in the ear tissue of 2.8% of 209 black howler monkeys (*Alouatta caraya*) from Argentina [64]. In addition, a clinical case of a spider monkey (*Ateles paniscus*) from a zoo in Brazil, which showed weight loss and pale mucous membranes, was further confirmed by PCR and RFLP from blood [67]. *L amazonensis* DNA was also detected in 1.1% of the analysed woolly-mouse opossum (*Marmosa paraguayanus*) from Brazil [48] (Supplementary Material File S2).

Three studies from Bolivia and Brazil reported the presence of *L. amazonensis* in blood or skin (tail or ear) by PCR followed by sequencing, in 7.1–33.3% of the analysed rodents (*Hylaeamys, Oryzomys, Akodon, Necromys* and *Olygoryzomis* genera) [35,41,68]. Some of these rodents displayed old lesions including scars on the tail or ear [68].

Animals found infected with *L. amazonensis*, as weel as the techniues employed, are summarized in Table 3.

Table 3. Wildlife that reported positive for *Leishmania amazonensis*. Organs or tissues where the parasite was detected are indicated, as well as the techniques employed for detection.

Host	Prevalence	Organs/Tissue Analysed	Methods for Detection	Country	Reference
Order Carnivora					
Conepatus chinga rex (Molina's hog-nose skunk)	50%	liver, skin and spleen	Inoculation to hamster, Isoenzyme typing, PCR (kDNA) PCR (trypanosomatids) + hybridisation	Bolivia	[41]
Order Chiroptera					
Artibeus lituratus (nectarivorous)	1.6%	liver, skin and spleen	nPCR (SSU), qPCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP	Brazil	[14,66]
Artibeus planirostris (nectarivorous)	n.s.	skin	qPCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP	Brazil	[14]
Desmodus rotundus (haematofagous)	n.s.	liver, spleen	qPCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP	Brazil	[14]
Eumops glaucinus (insectivorous)	8.3%	liver, skin and spleen	nPCR (SSU), qPCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP	Brazil	[14,66]
Eumops auripendulus (insectivorous)	25%	liver, spleen	nPCR (SSU)	Brazil	[66]
Eumops perotis (insectivorous)	5.6%	blood	PCR (kDNA), PCR (Cyt b) + sequencing	Brazil	[45]
Glossophaga soricina (insectivorous)	2.8–4.2%	blood, liver and spleen	nPCR (SSU), PCR (kDNA), PCR (Cyt B) + sequencing	Brazil	[45,66]
Molossus molossus (insectivorous)	1–1.6%	blood, liver and spleen	nPCR (SSU), PCR (kDNA), PCR (Cyt B) + sequencing	Brazil	[45,66]
Molossus rufus (insectivorous)	1%	liver, skin, spleen	nPCR (SSU), qPCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP	Brazil	[14,66]
Myotis nigricans (insectivorous)	2.9%	liver, spleen	nPCR (SSU), qPCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP	Brazil	[14,66]
Nyctinomops laticaudatus (insectivorous)	10%	liver, spleen	nPCR (SSU)	Brazil	[66]
Phyllostomus hastatus (omnivorous)	2.9%	blood	PCR (kDNA), PCR (Cyt b) + sequencing	Brazil	[45]
Platyrrhinus lineatus (omnivorous)	18.2%	blood, spleen	qPCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP, PCR (kDNA), PCR (Cyt b) + sequencing	Brazil	[14,45]
Sturnira lilium (nectarivorous)	25%	liver, spleen	nPCR (SSU)	Brazil	[66]
Order Didelphimorphia					
Marmosa (Micoureus) paraguayanus (woolly-mouse opossum)	1.1%	skin	PCR (kDNA), qPCR (kDNA), nPCR (SSU), PCR (G6PD), sequencing	Brazil	[48]
Order Primata					
Alouatta caraya (black howler monkey)	2.8%	ear tissue	PCR (ITS) + RFLP + sequencing	Argentina	[64]
Ateles paniscus (spider monkey)	100%	blood	PCR (kDNA), PCR (ITS) + RFLP	Brazil	[67]
Order Rodentia					
Akodon spp.	7.1%	blood	PCR (kDNA) + hybridisation	Bolivia	[41]
Necromys (sin. *Bolomys) lasiurus*	20%	ear skin	PCR-D7 24Sα rRNA (trypanosomatids) and PCR (ITS) + sequencing	Brazil	[35]
Oligoryzomys spp. (rice rat)	25%	blood	PCR (kDNA) + hybridisation	Bolivia	[41]
Hylaeamys (Oryzomys) acritus	33.3%	tail skin	PCR (kDNA) + sequencing	Bolivia	[68]
Oryzomys nitidus	13.3%	tail skin	PCR (kDNA) + sequencing	Bolivia	[68]

BM: bone marrow; Cyt B: cytochrome B; G6DP: glucose 6 phosphate dehydrogenase; ITS: Internal transcriber spacer; kDNA: kinetoplast DNA; nPCR: nested PCR; n.s.: not specified; qPCR: quantitative PCR; RFLP: restriction fragment length polymorphism; SSU: small subunit of ribosomal RNA.

157

Further information on other species infected with *L. amazonensis* can be found in previous reviews [23,24], and include rodents (*Dasyprocta* spp., *Oligoryzomis* spp., *Orzyomis melanotis*, *Proechymis* spp., *Trichomys apereoides*, *Sciurus vulgaris*), carnivores (*Cerdocyon thous*, *Potos flavus*), anteaters (*Tamandua tetradactyla*), marsupials (*Didelphis marsupialis*, *Metachirus nudicaudatus*, *Philander opossum* and *Marmosa cinerea*) and primates (*Saguinus geoffroyi*).

3.4. Wild Animals Infected with Leishmania mexicana

In this review, data regarding infection with *L. mexicana* in wild animals were mainly from the USA and Mexico, two countries where the parasite is frequently reported, but data from rodents and carnivores from Brazil and Bolivia were also included (Supplementary Material File S3). The species was present in other American territories such as Venezuela, Colombia, Ecuador and all countries in Central America [3,5].

According to the data from the systematic review, thirty-one species of wild animals from six orders were found to be infected with *L. mexicana*. In carnivores, only one out of two Molina's hog-nosed skunks (*Conepatus chinga rex*) were infected with *L. mexicana* in Bolivia, and the parasite was isolated by inoculation in hamster and subsequently analysed by isoenzyme analysis and hybridisation [41]. Samples from seven grey foxes (*Urocyon cinereoargenteus)* were analysed by ELISA, showing 100% prevalence in Mexico [69] (Supplementary Materials File S3). Both species should be considered as sentinel or even reservoirs, due to the parasite's isolation and high values of positivity.

Thirteen species of bats (order Chiroptera) were also found infected with the parasite in Mexico, employing skin, heart, liver and spleen in a PCR of kDNA and SSU [5]. The authors found infection rates ranging from 4–100% of the animals [70].

In rodents, eleven species were infected in ten different surveys, with *Handleyomis* (sin. *Oryzomis*) *melanotis*, *Ototylomis phyllotis*, *Peromyscus yucatanicus* and *Sigmodon hispidus* being the species with the higher levels of infection (100% in at least one study), which may indicate their role as reservoirs of the disease [33,58,71–78]. Within the order Didelphimorphia, the Mexican mouse opossum (*Marmosa mexicana*) [71] and the northern anteater [79] were found to be infected in Mexico employing PCR.

The order Primates was less explored, and only indirect evidence of the infection was reported by serology (ELISA, IFAT and Western blot). A prevalence of 5–37.5% was found in two species of howler monkeys (*Alouatta palliate* and *A. pigra*) in Mexico [80].

The base of the tail was the election site for detection or isolation of *L. mexicana* in rodents and marsupials, with 100% of infection in many studies in which animals with lesions were sampled [71–73,77], but the ear and foot were also included [76] (Supplementary Materials File S3). When other organs were investigated, such as liver, spleen, kidney or heart, they were also infected, but at lower percentages (11–66.7%) [72]. Heart, liver, spleen and skin were also employed to find infections in Chiroptera [70], while lymph nodes, lung, spleen, liver and kidney tissues were used in the northern anteater, with DNA detection by PCR only in spleen [79].

In general, wild animals showed mild clinical signs of leishmaniasis and no external signs were reported in the orders Carnivora, Chiroptera, Pilosa and Primates. On the contrary, rodents and marsupials were reported with cutaneous clinical signs in most of the surveys, including swollen skin, depigmentation, ulcers, alopecia and erythema, mainly at the base of the tail. This fact can be explained because the authors were searching for lesions to find reservoirs of the disease [71,72,77].

Wild animals infected with *L. mexicana*, along with techniques and organs or tissues positive to the parasite are shown in Table 4.

Table 4. Wild animals infected with *L. mexicana*. Organs or tissues where the parasite was detected, as well as the techniques employed, are indicated.

Host	Prevalence	Organs/Tissue Analysed	Methods for Detection	Country	References
Order Carnivora					
Conepatus chinga rex (Molina's hog-nosed skunk)	50%	Liver + skin + spleen (macerate)	Inoculation to hamster, isoenzyme analysis, hybridisation	Bolivia	[41]
Urocyon cinereoargenteus (fox)	100%	serum	ELISA	Mexico	[69]
Order Chiroptera					
Pteronotus personatus	25%	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Artibeus jamaicensis	5.8%	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Artibeus lituratus	7.3%	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Carollia sowelli	4.4%	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Choeroniscus godmani	23.1%	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Desmodus rotundus	7.1%	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Dermanura phaeotis	8.1%	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Glossophaga commissarissi	75%	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Glossophaga soricina	26.9%	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Leptonycteris curasoae	50%	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Phyllostomus discolor	100% (n = 1)	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Stumira lilium	11.1%	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Stumira ludovici	4%	heart, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (SSU)	Mexico	[70]
Order Didelphimorphia					
Marmosa mexicana (Mexican mouse opossum)	66.7%	base of the tail	PCR (kDNA)	Mexico	[71]
Order Pilosa					
Tamandua mexicana (northern tamandua)	6.3%	spleen	PCR (ALAT), PCR (ITS1) + sequencing	Mexico	[79]
Order Primates					
Alouatta palliate (mantled howler monkey)	5%	serum	ELISA, IFAT and WB	Mexico	[80]
Alouatta pigra (Guatemalan black howler)	37.5%	serum	ELISA, IFAT and WB	Mexico	[80]
Order Rodentia					
Heteromys gaumeri	46.3%	base of the tail	PCR (kDNA)	Mexico	[71]
Heteromys desmarestianus	100%	base of the tail	PCR (kDNA)	Mexico	[71]

Neotoma micropus (woodrats)	7.3–50%	skin, ear tissue	Culture, PCR (kDNA), Culture of lesions + PCR + isoenzyme analysis of cultures	USA	[73] [74]
Neotoma floridana (eastern woodrat)	100%	ear, foot	Smears, PCR	USA	[76]
Handleyomys (*Oryzomys) melanotis*	65–100%	skin (base-tail, lesions), liver and spleen	Culture, Mab, imprints and PCR (kDNA)	Mexico	[71,72,75,77]
Ototylomis phyllotis	75.5–100%	skin (base-tail), liver	Culture, Mab, imprints and PCR (kDNA)	Mexico	[71,72,75]
Peromyscus attwateri	100% (n = 1)	skin (neck)	PCR (ITS1) + sequencing	USA	[78]
Peromyscus yucatanicus	28.6–100%	skin (base-tail), heart and kidney, liver, spleen	Culture, PCR (kDNA) and imprints	Mexico	[71,72]
Rattus rattus (black rat)	2.9–19%	blood	Culture, PCR (kDNA) + RFLP/hybridisation	Venezuela, Brazil	[33] [58]
Reithrodontomys gracilis	66.6%	skin (base-tail)	Culture, PCR (kDNA)	Mexico	[71]
Sigmodon hispidus (cotton rat)	58.8–100%	liver, skin (base-tail, lesion) and spleen	Imprints, culture, Mab and PCR (kDNA)	Mexico	[71,72,75,77]
Trichomys apereoides	27.8%	blood	PCR (kDNA) + hybridisation	Brazil	[58]

ALAT: alanine transaminase; ELISA: enzyme immune assay; IFAT: Immunofluorescence assay; ITS: internal transcriber spacer; kDNA: kinetoplast DNA; Mab: monoclonal antibodies; SSU: small subunit of ribosomal RNA.

In previous reviews, several species from publications prior to 1990 were reported to be infected with *L. mexicana* (*Agouti paca*, *Marmosa robinson*, *Nyctomys sumichrasti*, *Oryzomis capito*, *Proechymis* spp., *Reithrodontomys gracilis*) [23,24].

3.5. Wild Animals Infected with Leishmania infantum (L. chagasi)

L. infantum is the most globally distributed of all species of zoonotic *Leishmania*. Australia is considered free of *L. infantum*, but the protozoan is present on almost all continents with available data, including Southern Europe, Africa, Asia and the Americas from north (excluding Alaska and Canada) to south. African countries and Brazil report more than 90% of the human VL cases around the world, but detailed characterised focusses are more frequently reported in Brazil and Mediterranean countries (North Africa and South Europe) [3,5].

Techniques employed to detect infection with *L. infantum* in different parts of the world are similar to those previously described for *L. braziliensis*. Serology was mainly employed in carnivores, primates and occasionally in marsupials or other species, such as rodents or Lagomorpha (Supplementary Materials Files S4 and S5), while the rest of the species were examined preferentially by PCR. Among the serological techniques, ELISA, IFAT, DAT or rapid test (rK39) were extensively employed. The most frequent target, again, was kDNA, but other targets, such as SSU and ITS1 and the repeat region, were also used in several studies and animal species. Less frequently used targets include cytochrome B (Cyt B), HSP70, ITS2, glyceraldehyde phosphate hydrogenase (GAPDH) and α-tubulin (for details, see Supplementary Materials File S4). Xenodiagnosis or culture were employed only in a few occasions.

Blood, skin, liver and spleen were the most employed tissues for PCR detection, but heart, lungs, lymph nodes, intestines, kidney and bone marrow were also used in several studies. Blood was more frequently employed in carnivores, marsupials and primates, because it is easier to obtain, while other tissues were accessible only during post-mortem examinations or after fatal clinical cases or euthanasia of the animals. This was the case for rodents, some bats, several clinical cases of carnivores, and road-killed mammals. Hair and eye swabs were also successfully tested in some studies (Supplementary Materials Files S4 and S5).

3.5.1. *L. infantum* in the Americas.

According to the literature, eight orders of wild animals are infected with *L. infantum* in the Americas: Carnivores, Chiroptera, Cingulata, Didelphimorphia, Lagomorpha, Pilosa, Primates and Rodentia (Supplementary Materials File S4). Carnivores were the most widely studied, mainly because domestic and wild carnivores are considered reservoirs of the disease, but also because clinical cases are more frequently reported in them, both in nature and in zoological parks [24,25]. The crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) is a widespread carnivore in South America that can act as a reservoir of leishmaniasis for humans, since it can be found in forest locations as well as in residential areas. It was found to be infected with *L. infantum* or exposed to the parasite (positive serology) in several publications, some of which were clinical cases, and thus were not considered in this study. The percentage of infection varied widely among the studies when including more than one animal (4–75%), and exposure to the parasite was demonstrated by serology (i.e., ELISA, IFAT), while culture, microscopy of smears, PCR followed by sequencing and inoculation of hamsters were employed to detect the parasite [81–89]. Several organs and tissues tested positive via PCR: bone marrow, heart, lymph nodes, liver, lungs, skin and spleen. Mainly serological test were employed in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) with prevalence values from 10% to 75% depending on the study [82,84,85,88–90], while the parasite was found only in bone marrow and skin by PCR [84,85]. In the bush dog (*Speothos venaticus*), several techniques were employed including serology, culture of isolates, PCR, smears and histopathology. While most studies reported results from only one or two animals, only three studies analysed a higher number (4–6) and found 33.3% positives using PCR (blood) and 60–100% of the animals positive by serology

[84,85,89–91] (Supplementary Materials File S4). The potential transmission to the vector was demonstrated in manned wolves and bush dogs [89], which reinforces their role as reservoirs.

Several studies investigated free-ranging carnivores by serology using a direct agglutination test (DAT), and positive values were found in tayras (*Eira barbara*), lesser grison (*Galictis cuja*) and coatis (*Nasua nasua*) in Brazil at high serum dilutions (≥1:1280) [92]. In carnivores kept in captivity, serology was also employed to demonstrate the presence of antibodies against the parasites in ocelots (*Leopardus pardalis*), hoary foxes (*Lycalopex–Pseudalopex vetulus*), jaguars (*Panthera onca*), Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*), African lions (*Panthera leo*) and cougars (*Puma concolor*) (Supplementary Material File S4) [84,90,93,94]. Clinical signs of VL were more frequent in wild canids compared to wild felines and included weight loss, anaemia, lymph node enlargement, vomiting, diarrhoea and polydipsia/polyuria, which were described in some of the animals from the previously mentioned species, such crab-eating foxes [85], bush dogs [84,85], hoary foxes [84], Siberian tigers and maned wolves [84,90]. African lions were reported to test positive for the first time by PCR (kDNA) followed by RFLP, but the animal did not show clinical signs [94]. Finally, *Leishmania* infection (probably *L. infantum*) was found in the kidney of one road-killed crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) in Brazil by PCR followed by sequencing [86].

The DNA of *L. infantum* was found in at least 17 species of bats in nine studies, including one hematophagous species and several frugivorous, omnivorous or insectivorous ones [14,32,44,45,66,95–98]. The feeding habits of the animals were relevant, since the oral route was suggested for transmission in animals feeding on insects, including the vector of leishmaniasis [14]. They also shared the same ecological niche in bat caves and probably other locations. Values of infection varied widely, from less than 1% to 100% of the analysed bats, being infected mainly in the blood but also in the liver, skin, spleen and even in oral swab samples [32]. PCR followed by RFLP or sequencing was employed in the studies and, when sensitive primers were employed, a prevalence higher than 30% was usually obtained [95].

A small number of species of the orders Cingulata and Pilosa were found to be infected with *L. infantum* in Brazil. The lesser anteater (*Tamandua tetradactyla*) was reported to test positive by PCR (kDNA) in blood and bone marrow in 2013 [99] and again in 2014, together with giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*) and one seven-banded armadillo (*Dasypus septemcinctus*) found dead on the roads in Brazil, employing PCR from several tissues [86].

Marsupials were studied in several surveys by PCR or serology (Supplementary Material File S4). The white-eared opossum (*Didelphis albiventris*) was analysed by six groups in Brazil, who found the parasite in blood, bone marrow, lungs, kidney, skin and spleen by culture or PCR (kDNA, ITS1 or SSU) and sequencing or RFLP [38,39,50,54,86,100,101], with percentages of infection between 6.3% and 22.2%. The big-eared opossum (*Didelphis aurita*) was positive at a low percentage in Brazil by PCR, spleen imprints and serology (rK39), and one of the animals displayed spleen enlargement, but no other clinical signs were recorded from the rest [102]. In Brazil as well as in Colombia and Venezuela, the common opossum (*Didelphis marsupialis*) was widely analysed [102–107]. Two studies in Colombia demonstrated the transmission of isolates from common opossums to hamster, highlighting their role as reservoirs of *L. infantum* [105,106]. The parasite was found in several tissues employing PCR (kDNA, SSU and ITS1) followed by hybridisation or RFLP [38,103,107]. Two studies in Brazil employed serology and PCR simultaneously. In the first one, the authors found 9–21.6% of the animals positive using serology, and only 5% positive by PCR–RFLP [38], while the other study analysed 112 individuals of two species (i.e., white-eared and big-eared opossums), and found high percentages of positivity (71–91.6%) with both techniques (see Supplementary Materials File S4 for details).

Lagomorphs were scarcely reported as exposed to *L. infantum* in the Americas, with one European hare (*Lepus europaeus*) found positive in Brazil by DAT and with a low antibody titre (1:320) [92].

Infection with *L. infantum* in primates were studied in five surveys, and eleven species were reported with DNA of the parasite. Several species of captive primates

showed high prevalence values when employing PCR (kDNA) in an endemic area of Brazil including brown howler monkeys (*Alouatta guariba*), black-headed night monkeys (*Aotus nigriceps*), black-fronted titi (*Callicebus nigrifons*), golden-bellied capuchin (*Cebus xanthosternos*), golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*), bald-faced saki (*Pithecia irrorata*) and emperor tamarin (*Saguinus imperator*). Among them, one black-fronted titi was found dead with clinical signs compatible with leishmaniasis, but the rest did not show clinical signs [108]. On the other hand, free-ranging howler monkeys (*Alouatta caraya*) sampled at the marginal area of an endemic region from Argentina displayed low values of prevalence (6.3%) [64]. Two other studies found indirect evidence of infection with the parasite using DAT in one white-tufted-ear marmoset (*Callithrix jacchus*) [109] and 26.9% of the black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) [109]; the last study also employed PCR of the skin. Positive serology was detected in twenty-two percent of red howler monkeys (*Alouatta seniculus*) in French Guiana, and data were further confirmed by PCR (110).

Rodents occupied most of the attention of researchers investigating *L. infantum* in the Americas, and twelve studies fulfilled the inclusion criteria of this systematic review [21,36,39,50,53,58,86,92,101,106,107,110]. Most of the studies employed different PCR approaches in several tissues, although in one study the authors detected antibodies. Brazilian guinea pigs were reported to be infected in Brazil by PCR in heart tissue [86]. The infection was also found in two species of porcupines from Brazil: the prehensile tailed porcupine (*Coendu–Sphiggurus villosus*) by serology (DAT) [92], which is indirect evidence of the parasitism, and the Paraguayan hairy dwarf porcupine (*Coendou–Sphiggurus spinosus*) by PCR and sequencing from several tissues Supplementary Materila File S4) [86]. Agouties were also reported to test positive for *L. infantum* in the spleen (16.7%), skin and blood by PCR [36,110]. The giant rodent capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) was positive in the lungs by PCR and sequencing [86]. Several species from wild mice, rats and cricetidae of the genera *Cerradomys*, *Clyomis*, *Holochilus*, *Hylaeamys*, *Nectomys*, *Oryzomys*, *Proechymis*, *Rhipidomys* and *Trichomys* were reported to be infected with *L. infantum* in several surveys, and in previous studies the potential role as reservoir of some of them was indicated [24]. The authors employed distinct approaches of PCR followed by RFLP, hybridisation or sequencing [21,36,39,50,58,106,110].

Synanthropic rodents, such as the house mouse (*Mus musculus*), the black rat (*Rattus rattus*) and the brown rat (*Rattus norvegiccus*) were investigated in Brazil and Venezuela. Researchers found 20% of house mice to be infected [50], while the prevalence in black rats varied widely, with values from 0.1% to 100% using several approaches of PCR followed by hybridisation, RFLP or sequencing [21,39,50,53,58,107]. Almost 17% of brown rats were positive by nPCR and sequencing [50]. These synanthropic species of rodents could act as relevant reservoirs of leishmaniasis, since they were infected at high percentages and share habitats with humans.

Additional species were analysed in other surveys or in some of the previous studies in which the authors could not characterise the parasite at the species level (Supplementary Material File S4) [44,91,111–118]. Indirect evidence of *Leishmania* spp. was found in the USA using rapid tests (rk30 antigen) in several wild carnivores such as coyotes (*Canis latrans*, 1.6%), American red foxes (*Vulpes fulvus*, 9.1%) and grey foxes (*Urocyon cinereoargenteus*, 2%) [111,112]. On the other hand, DNA of *Leishmania* spp. was detected in several species, including carnivores, such as South American grey foxes (*Lycalopex–Pseudalopex griseus*) [113] and Neotropical otters (*Lontra longicaudis*), and some species of primates, such as black-headed night monkeys (*Aotus nigriceps*), black-bearded sakis (*Chiropotes satanas*) and grey-woolly monkeys (*Lagothrix cana*) in Brazil [114]. Among rodents, *Leishmania* spp. DNA was reported in the blood of a red-tailed squirrel (*Sciurus granatensis*) in Venezuela [103]. All this information is summarized in Table 5.

Table 5. Wild animals infected with *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) and *Leishmania* spp. in the Americas. Organs or tissues positive to the parasite, as well as techniques employed, are indicated.

Host	Prevalence	Organs/Tissue Analysed	Method of Detection	Country	Reference
Order Carnivora					
Cerdocyon thous (crab-eating fox)	4–100%	BM, heart, liver, lung, mesenteric LN, serum skin and spleen	Smears, ELISA, culture, PCR, inoculation to hamster, IFAT, xenodiagnosis vector, PCR (kDNA) + sequencing, PCR (kDNA) + sequencing *	Brazil	[81–87,89]
Chrysocyon brachyurus (maned wolf)	10–75%	BM, serum and skin	ELISA, IFAT, PCR (kDNA), PCR (kDNA) + sequencing, IC rk39, xenodiagnoses in vector	Brazil	[82,84,85,88–90]
Eira barbara (tayra)	n.s.	serum	DAT (n = 3)	Brazil	[92]
Galictis cuja (lesser grison)	n.s.	serum	DAT (n = 3)	Brazil	[92]
Leopardus pardalis (ocelot)	75%	serum	ELISA,	Brazil	[90]
Lycalopex (*Pseudalopex*) *vetulus* (hoary fox)	33.3%	BM, serum	IFAT, ELISA, PCR (kDNA)	Brazil	[84]
Nasua nasua (coati)	n.s.	serum	DAT (n = 2)	Brazil	[92]
Speothos venaticus (bush dogs)	33.3–100%	blood, LN, serum, skin, spleen and other tissues (liver, kidney, lung and large intestine)	PCR (kDNA), PCR (kDNA) + sequencing, histopathology, IHC, ELISA, IFAT, IC rk39, xenodiagnoses in vector	Brazil	[84,85,89–91]
Panthera onca (jaguar)	20–50%	blood, LN and serum	PCR (kDNA) + RFLP, ELISA, IC	Brazil	[90,93]
Panthera tigris altaica (Siberian tiger)	50%	serum	ELISA, IC	Brazil	[90]
Panthera leo (lion)	50–100%	blood, serum	PCR (kDNA) + RFLP, ELISA	Brazil	[90,94]
Puma concolor (cougar)	71.4%	blood, LN	PCR (kDNA) + RFLP	Brazil	[93]
Procyon cancrivorus (crab-eating racoon)	33.3%	kidney	PCR (kDNA) + sequencing *	Brazil	[86]
Order Chiroptera					
Artibeus planirostris (frugivorous)	7.4–16.7%	blood	PCR (kDNA), PCR (Cyt B) + sequencing	Brazil	[45,95]
Artibeus lituratus (frugivorous)	40.9%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[95]
Desmodus rotundus (hematophagous)	50%	liver, skin	qPCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP, PCR (kDNA), nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[14,44]
Carollia perspicillata (frugivorous)	3–27.3%	blood, spleen	Culture, qPCR (kDNA), qPCR (SSU), PCR (kDNA), PCR (ITS2) + sequencing	Venezuela, Brazil and French Guiana	[95–97]
Eumops perotis (insectivorous)	11.1%	blood	PCR (kDNA), PCR (Cyt B) + sequencing	Brazil	[45]
Eptesicus furinalis (frugivorous)	100% (n = 1)	blood	PCR (kDNA), PCR (Cyt B) + sequencing	Brazil	[45]
Glossophaga soricina (nectarivorous)	0.7–100%	blood, liver and spleen	nPCR (SSU), PCR (kDNA), PCR (Cyt B) + sequencing, qPCR (kDNA), PCR (kDNA) and nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[44,45,66,95]
Myotis nigricans (insectivorous)	33.3%	liver	PCR (kDNA) + nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[44]
Molossus molossus (insectivorous)	0.5%–100%	blood, liver and spleen	nPCR (SSU), qPCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP, PCR (kDNA), PCR (Cyt B) + sequencing, PCR (kDNA) + nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[14,44,45,66]
Molossus pretiosus (insectivorous)	21.1%	liver, skin	PCR (kDNA) + nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[44]
Molossus rufus (insectivorous)	20–100%	liver, spleen	qPCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP, nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[14,44]

Molossidae spp. (insectivorous)	40%	liver, skin	PCR (kDNA)+ nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[44]
Nyctinomops laticaudatus (insectivorous)	40%	liver, skin	PCR (kDNA) and nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[44]
Nyctinomops macrotis (insectivorous)	60%	liver, skin	PCR (kDNA) + nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[44]
Platyrrhynus lineatus (frugivorous)	15.4%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[95]
Phyllostomus hastatus (omnivorous)	5.9%	blood	PCR (kDNA), PCR (Cyt B) + sequencing	Brazil	[45]
Phyllostomus discolor (omnivorous)	100% (*n* = 1)	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[95]
Pteronotus parnellii (insectivorous)	100% (*n* = 1)	blood	PCR (SSU), PCR (GAPDP)	Brazil	[98]
Bats (n.s.)	0.1%	oral swab	PCR (SSU) + sequencing *	Brazil	[32]
Order Cingulata					
Dasypus septemcinctus (seven-banded armadillo)	100% (*n* = 1)	liver	PCR (kDNA) + sequencing *	Brazil	[86]
Order Didelphimorphia					
Didelphis albiventris (white-eared opossum)	6.3–22.2%	blood, BM, liver, lung, kidney, skin and spleen	Culture, PCR (ITS1) + RFLP, PCR (kDNA), PCR (kDNA) + sequencing, nPCR (SSU) + sequencing, PCR (kDNA), PCR (ITS1)	Brazil	[100] [39,50,54,86]
Didelphis aurita (big-eared opossum)	6.3%	LN, serum and spleen	Spleen smears, PCR (kDNA) + hybridisation IC rk39	Brazil	[102]
Didelphis marsupialis (common opossum)	7.1–40.5%	blood, BM, liver, serum, skin and spleen	smears, Culture, inoculation to hamster + isoenzyme, Mab, PCR (kDNA) + hybridisation, IFAT, DAT, PCR+RFLP, nPCR (SSU), PCR (ITS1)	Brazil, Colombia and Venezuela	[38,103–107]
Didelphis sp. *D. albiventris* *D. aurita*	91.6%	blood, BM	PCR (kDNA) ELISA, FML-ELISA, smears, culture	Brazil	[101]
Order Lagomorpha					
Lepus europaeus (European hare)	n.s.	serum	DAT (n = 1)	Brazil	[92]
Order Pilosa					
Myrmecophaga tridactyla (giant anteater)	33.3%	heart, kidney, lung and mesenteric LN	PCR (kDNA) + sequencing *	Brazil	[86]
Tamandua tetradactyla (lesser anteater)	50–100%	BM, liver, lung and mesenteric LN	PCR (kDNA), PCR (ITS1) + sequencing	Brazil	[99] [86]
Order Primates					
Alouatta caraya (black howler)	3.7%	ear tissue	PCR (ITS) + RFLP + sequencing	Brazil, Argentina	[64]
Alouatta guariba (brown howler monkey)	12.5	blood	PCR (kDNA)	Brazil	[108]
Alouatta seniculus (red howler monkey)	22.2%	blood	PCR (kDNA), PCR (ITS2), PCR (SSU), IC	French Guiana	[119]
Aotus nigriceps (black-headed night monkey)	100% (*n* = 1)	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[108]
Callicebus nigrifons (black-fronted titi)	33.3%	blood, liver, lung, intestine and spleen	qPCR (kDNA), IHC,	Brazil	[108]
Callithrix jacchus (white-tufted-ear marmoset)	100% (*n* = 1)	serum	DAT	Brazil	[92]
Callithrix penicillata, C. jacchus	26.9%	blood, skin	DAT, PCR + sequencing	Brazil	[109]
Cebus xanthosternos (golden-bellied capuchin)	60%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[108]

Leontopithecus chrysomelas (golden-headed lion tamarin)	20%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[108]
Pithecia irrorata (bald-faced saki)	50%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[108]
Saguinus imperator (emperor tamarin)	100%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[108]
Order Rodentia					
Cavia aperea (Brazilian guinea pig)	25%	heart	PCR (kDNA) + sequencing	Brazil	[86]
Cerradomys (Oryzomys) subflavus	25%	BM, liver and spleen	nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[50]
Coendu (Sphiggurus) villosus (prehensile tailed porcupine)	n.s.	serum	DAT (n = 2)	Brazil	[92]
Coendou (Sphiggurus) spinosus (Paraguayan hairy dwarf porcupine)	20%	heart, kidney, liver and spleen	PCR (kDNA) + sequencing	Brazil	[86]
Clyomis laticeps	5.2%	spleen	PCR (kDNA) + PCR (HSP70)	Brazil	[36]
Dasyprocta azarae	16.7%	spleen	PCR (kDNA) + PCR (HSP70)	Brazil	[36]
Dasyprocta sp.	n.s.	blood, skin	PCR (kDNA) + PCR (ITS), PCR (HSP70) + sequencing	Brazil	[110]
Holochilus scieurus	10%	skin, spleen	PCR (kDNA)	Brazil	[39]
Hydrochoerus hydrochaeris (capybara)	50%	lung	PCR (kDNA) + sequencing	Brazil	[86]
Mus musculus (house mice)	20%	BM, liver, tail–ear skin and spleen	nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[50]
Nectomys squamipes	7%	skin, spleen	PCR (kDNA)	Brazil	[39]
Proechymis canicollis	8.8%	skin, spleen	PCR + hybridisation	Colombia	[106]
Proechymis cuvieri	n.s.	blood, skin	PCR (kDNA) + PCR (ITS), PCR (HSP70) + sequencing	Brazil	[110]
Rhipidomys mastacalis	28.5%	liver	PCR (HSP70) + RFLP	Brazil	[21]
Rattus norvegicus (brown rat)	16.7%	liver, tail–ear skin,	nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[50]
Rattus rattus (black rat)	0.1–100%	blood, BM, liver, skin and spleen	PCR (kDNA), PCR (kDNA) + hybridisation, PCR (HSP70) + RFLP, PCR (kDNA), nPCR (SSU) + sequencing, PCR (HSP70) + RFLP	Venezuela Brazil	[21,39,50,53,58,107]
Trichomys apereoides	6.3–11.1%	skin, ear skin	PCR (kDNA) + hybridisation PCR (HSP70) + RFLP	Brazil	[21,58]
Trichomys laurentis	1%	spleen	PCR (kDNA)	Brazil	[36]

Wild animals infected with ***Leishmania* spp.** in the Americas

Host	Prevalence	Organs/tissue analysed	Method of detection	Country	Reference
Order Carnivora					
Canis latrans (coyote)	1.6%	serum	IC rAgK39	USA	[112]
Cerdocyon thous (crab-eating fox)	15.3–100%	blood, serum and skin	qPCR (kDNA), IFAT, IC	Brazil	[114,115]
Chrysocyon brachyurus (maned wolf)	42.9%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[114]
Lontra longicaudis (neotropical otter)	50%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[114]
Lycalopex (Pseudalopex) griseus (South American grey fox)	37.5%	blood	PCR (kDNA) + sequencing	Argentina	[113]
Lycalopex (Pseudalopex) vetulus (hoary fox)	7.1–50%	blood, serum	qPCR (kDNA), IFAT	Brazil	[114] [115]
Nasua nasua (coati)	50%	blood	qPCR (kDNA), IFAT	Brazil	[114,116]
Puma concolor (cougar)	100% (n = 1)	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[114]
Spheotos venaticus (bush dog)	33.3–100%	Blood, serum, liver and LN	ELISA, PCR (kDNA)	Brazil	[91,117]

Vulpes fulvus (American red fox)	9.1%	serum	IC rK39	USA	[112]
Urocyon cinereoargenteus (gray fox)	2%	serum	IC rK39	USA	[111]
Order Chiroptera					
Molossus molossus (insectivorous)	7.4%	liver	PCR (kDNA)+ nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[44]
Molossus pretiosus (insectivorous)	5.2%	liver	PCR (kDNA)+ nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[44]
Nyctinomops macrotis (insectivorous)	6.7%	liver	PCR (kDNA)+ nPCR (SSU) + sequencing	Brazil	[44]
Order Pilosa					
Myrmecophaga tridactyla (giant anteater)	36.4%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[114]
Tamandua tetradactyla (lesser anteater)	33.3%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[114]
Order Primates					
Alouatta guariba (brown howler monkey)	37.5%	blood	PCR (kDNA)	Brazil	[91]
Aotus nigriceps (black-headed night monkey)	20%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[114]
Chiropotes satanas (black-bearded saki)	50%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[114]
Lagothrix cana (gray-woolly monkey)	33.3%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[114]
Leontopithecus chrysomelas (golden-headed lion tamarin)	16.7%	blood	qPCR (kDNA)	Brazil	[114]
Order Rodentia					
Rattus rattus (black rat)	9.1%	serum	IFAT	Dominican Republic	[118]
Sciurus granatensis (red-tailed squirrel)	100% (*n* = 1)	blood	nPCR (SSU)	Venezuela	[103]

BM: bone marrow; Cyt B: cytochrome B; DAT: direct agglutination test; FML: fucose-mannose ligand; GADPH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; HSP70: heat shock protein 70kDa; IHC: immunohistochemistry; IC: immunochromatography; ELISA: enzyme immune assay; IFAT: immunofluorescence assay; ITS: internal transcriber spacer; kDNA: kinetoplast DNA; LN: lymph node; nPCR: nested PCR; n.s.: not specified; qPCR: quantitative PCR; RFLP: restriction fragment length polymorphism; SSU: small subunit of ribosomal RNA. * Probably *L. infantum*, according to the sequence.

The following species have been reported to be infected with *L. infantum* in the Americas in previous reviews: the rodent *Proechymis spinosus*, the Brazilian porcupine (*Coendu prehensilis*) and the fennec fox (*Vulpes zerda*). More information can be retrieved from the abovementioned reviews [23–25,27].

3.5.2. *L. infantum* in Wild Animals from Europe, Asia and Africa

Carnivores, bats, wallabies, hedgehogs, lagomorphs and rodents tested positive for *L. infantum* via antibody detection or PCR in several countries in South Europe (Croatia, France, Greece, Italy, Portugal, Spain, Romania), North Africa (Morocco, Tunisia) and Asia (Georgia, Iran, Israel, Saudi Arabia), Spain being the country with the highest number of studies of wild animals (Supplementary Material File S5).

L. infantum infection was reported in a large list of wild carnivores including 18 species. The golden jackal (*Canis aureus*) was positive in four studies at low percentages. The lowest values were found in Georgia using a rapid test (2.6%) [120] and in Romania employing PCR and sequencing of the ITS1 region from bone marrow samples (3%) [121]. In Iran, 11.6% of the jackals were found positive by serological test (DAT), and subsequent smears and culture from skin lesions, lymph nodes, spleen and liver were furthered characterised by PCR and sequencing [122]. Only 7.8% of the animals were found positive by PCR using blood samples [123]. The target or the technique used in each study could influence the results obtained by the different authors.

The wolf was the focus of research of many zoonoses including *L. infantum* infections. In this review, nine studies reported the animal to be positive for the parasite, although three of them included a low number of animals (three or less). In Croatia, only one wolf was reported positive by PCR and sequencing of the cysteine protease B in lymph nodes [124]. The remaining authors employed PCR of the kDNA region to detect the infection and, in some cases, RFLP and sequencing were later applied. Prevalence values from 33% to 50% were found in Spain when using spleen, skin or lymph nodes as samples [125–129] including one study conducted in a non-endemic region [127]. The percentage of infected animals was lower when blood (9%) [130] or hair (4.1%) [131] were used to detect the parasite. In Italy, 25% of the animals were infected when samples from spleen were analysed [132]. Skin lesions were reported only in one study [127].

A smaller number of individuals from wild cats (*Felis silvestris*) [127,128,133] and genets (*Genetta genetta*) [125,127–129,133,134] tested positive to *L. infantum* in samples from skin, liver or spleen employing PCR of the kDNA. The percentage of infection in both species reached 100% of the sampled animals, although wild cats showed 25% as the minimum value [128,133], while genets displayed a 10% prevalence in blood or spleen samples [134]. In two studies, additional PCR and sequencing of the ITS2 region were carried out [129,133].

Several studies were conducted employing similar approaches to detect *L. infantum* in various species of carnivores. The parasite was found in the spleen or blood of 28.6% of Egyptian mongoose (*Herpestes ichneumon*) from Spain [125] and 4.7% (only spleen) from Portugal [135]. Seventy percent of otters' (*Lutra lutra*) spleens [136] and 25% of Iberian lynxes' (*Lynx pardinus*) samples (spleen and blood) [135] were found to be infected in two studies. Six surveys reported the presence of *L. infantum* in hair, liver, spleen or lymph nodes of 29–100% of sampled beech martens (*Martes foina*) in Spain [127–129,131,133,137]. Values between 30% and 62% were found in pine martens (*Martes martes*) using the same techniques [127,133,134]. Badgers (*Meles meles*) were found infected in the liver or spleen in Italy (53%) [132] and Spain (26%) [133]. European minks (*Mustela lutreola*) were found to be infected with values of 50% in Spain using a similar methodology [133] but at lower percentages (e.g., 2.1%) when ELISA or PCR of the ITS1 were employed in Greece [136]. Moreover, 20% of pole cats (*Mustela putorius*), 45% of tigers (*Panthera tigris*) in a zoo, 20% of red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and one individual of each species of American mink (*Mustela vison*) and brown bear (*Ursus arctos*) were reported to be infected with the protozoa [129,133,137,138].

The DNA of *L. infantum* was found in at least 17 species of bats in nine studies, including one hematophagous species and several frugivorous, omnivorous or insectivorous ones [14,32,44,45,66,95–98]. The feeding habits of the animals were relevant, since the oral route was suggested for transmission in animals feeding on insects, including the vector of leishmaniasis [14]. They also shared the same ecological niche in bat caves and probably other locations. Values of infection varied widely, from less than 1% to 100% of the analysed bats, being infected mainly in the blood but also in the liver, skin, spleen and even in oral swab samples [32]. PCR followed by RFLP or sequencing was employed in the studies and, when sensitive primers were employed, a prevalence higher than 30% was usually obtained [95].

A small number of species of the orders Cingulata and Pilosa were found to be infected with *L. infantum* in Brazil (Supplementary Material File S4). The lesser anteater (*Tamandua tetradactyla*) was reported to test positive by PCR (kDNA) in blood and bone marrow in 2013 [99] and again in 2014, together with giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*) and one seven-banded armadillo (*Dasypus septemcinctus*) found dead on the roads in Brazil, employing PCR from several tissues [86].

Marsupials were studied in several surveys by PCR or serology (Supplementary Material File S4). The white-eared opossum (*Didelphis albiventris*) was analysed by six groups in Brazil, who found the parasite in blood, bone marrow, lungs, kidney, skin and spleen by culture or PCR (kDNA, ITS1 or SSU) and sequencing or RFLP [38,39,50,54,86,100,101], with percentages of infection between 6.3% and 22.2%. The big-eared opossum (*Didelphis aurita*) was positive at a low percentage in Brazil by PCR, spleen imprints and serology (rK39), and one of the animals displayed spleen enlargement, but no other clinical signs were recorded from the rest [102]. In Brazil as well as in Colombia and Venezuela, the common opossum (*Didelphis marsupialis*) was widely analysed [102–107]. Two studies in Colombia demonstrated the transmission of isolates from common opossums to hamster, highlighting their role as reservoirs of *L. infantum* [105,106]. The parasite was found in several tissues employing PCR (kDNA, SSU and ITS1) followed by hybridisation or RFLP [38,103,107]. Two studies in Brazil employed serology and PCR simultaneously. In the first one, the authors found 9–21.6% of the animals positive using serology, and only 5% positive by PCR–RFLP [38], while the other study analysed 112 individuals of two species (i.e., white-eared and big-eared opossums), and found high percentages of positivity (71–91.6%) with both techniques (see Supplementary Materials File S4 for details).

Lagomorphs were scarcely reported as exposed to *L. infantum* in the Americas, with one European hare (*Lepus europaeus*) found positive in Brazil by DAT and with a low antibody titre (1:320) [92].

Infection with *L. infantum* in primates were studied in five surveys, and eleven species were reported with DNA of the parasite. Several species of captive primates showed high prevalence values when employing PCR (kDNA) in an endemic area of Brazil including brown howler monkeys (*Alouatta guariba*), black-headed night monkeys (*Aotus nigriceps*), black-fronted titi (*Callicebus nigrifons*), golden-bellied capuchin (*Cebus xanthosternos*), golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*), bald-faced saki (*Pithecia irrorata*) and emperor tamarin (*Saguinus imperator*). Among them, one black-fronted titi was found dead with clinical signs compatible with leishmaniasis, but the rest did not show clinical signs [108]. On the other hand, free-ranging howler monkeys (*Alouatta caraya*) sampled at the marginal area of an endemic region from Argentina displayed low values of prevalence (6.3%) [64]. Two other studies found indirect evidence of infection with the parasite using DAT in one white-tufted-ear marmoset (*Callithrix jacchus*) [109] and 26.9% of the black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) [109]; the last study also employed PCR of the skin. Positive serology was detected in twenty-two percent of red howler monkeys (*Alouatta seniculus*) in French Guiana, and data were further confirmed by PCR (110).

Rodents occupied most of the attention of researchers investigating *L. infantum* in the Americas, and twelve studies fulfilled the inclusion criteria of this systematic review [21,36,39,50,53,58,86,92,101,106,107,110]. Most of the studies employed different PCR approaches in several tissues, although in one study the authors detected antibodies. Brazilian guinea pigs were reported to be infected in Brazil by PCR in heart tissue [86]. The infection was also found in two species of porcupines from Brazil: the prehensile tailed porcupine (*Coendu–Sphiggurus villosus*) by serology (DAT) [92], which is indirect evidence of the parasitism, and the Paraguayan hairy dwarf porcupine (*Coendou–Sphiggurus spinosus*) by PCR and sequencing from several tissues (Supplementary Material File S4) [86]. Agouties were also reported to test positive for *L. infantum* in the spleen (16.7%), skin and blood by PCR [36,110]. The giant rodent capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) was positive in the lungs by PCR and sequencing [86]. Several species from wild mice, rats and cricetidae of the genera *Cerradomys*, *Clyomis*, *Holochilus*, *Hylaeamys*, *Nectomys*, *Oryzomys*, *Proechymis*, *Rhipidomys* and *Trichomys* were reported to be infected with *L. infantum* in several surveys, and in previous studies the potential role as reservoir of some of them was indicated [24]. The authors employed distinct approaches of PCR followed by RFLP, hybridisation or sequencing [21,36,39,50,58,106,110].

Synanthropic rodents, such as the house mouse (*Mus musculus*), the black rat (*Rattus rattus*) and the brown rat (*Rattus norvegiccus*) were investigated in Brazil and Venezuela. Researchers found 20% of house mice to be infected [50], while the prevalence in black rats varied widely, with values from 0.1% to 100% using several approaches of PCR followed by hybridisation, RFLP or sequencing [21,39,50,53,58,107]. Almost 17% of brown rats were positive by nPCR and sequencing [50]. These synanthropic species of rodents could act as relevant reservoirs of leishmaniasis, since they were infected at high percentages and share habitats with humans.

Additional species were analysed in other surveys or in some of the previous studies in which the authors could not characterise the parasite at the species level (Supplementary Material File S4) [44,91,111–118]. Indirect evidence of *Leishmania* spp. was found in the USA using rapid tests (rk30 antigen) in several wild carnivores such as coyotes (*Canis latrans*, 1.6%), American red foxes (*Vulpes fulvus*, 9.1%) and grey foxes (*Urocyon cinereoargenteus*, 2%) [111,112]. On the other hand, DNA of *Leishmania* spp. was detected in several species, including carnivores, such as South American grey foxes (*Lycalopex–Pseudalopex griseus*) [113] and Neotropical otters (*Lontra longicaudis*), and some species of primates, such as black-headed night monkeys (*Aotus nigriceps*), black-bearded sakis (*Chiropotes satanas*) and grey-woolly monkeys (*Lagothrix cana*) in Brazil [114]. Among rodents, *Leishmania* spp. DNA was reported in the blood of a red-tailed squirrel (*Sciurus granatensis*) in Venezuela [103].

Seventeen studies reported the infection in the red fox (*Vulpes vulpes*), with lower prevalence values found in France (9–15%) and Georgia (2.6%) and higher in southern European Mediterranean countries, such as Italy (12.3–40%), Greece (59.5%) or Spain (12–74%) (Supplementary Materals File S5) [122,125,127–129,131,132,139–146]. The high numbers of publications might be due to the epidemiological relevance of this animal because it is a widespread species, which inhabit different ecosystems where the parasite life cycle can be completed, from forest to areas close to human settlements. One study carried out in Iran reported intermediate values (28.6%) using serology, cultures, smears and PCR-sequencing from lymph nodes, skin and spleen [122]. Serology (ELISA, IFAT) was first employed in Italy [139] and then in Georgia (recombinant antigen rK39 rapid test) [120], but since 2000, PCR was the most widely used technique to detect the infection [122,125,127–129,131,132,140–143,145,146]. Although no clinical signs were reported in most of the studies, the majority of the animals from the study carried out in Greece (63.8%) showed at least 2–3 clinical signs compatible with canine VL including low weight, dermatitis, skin lesions, alopecia, esplenomegaly, enlargement of lymph nodes and onychogryphosis [143].

The infection was demonstrated also in Bennett's wallabies in a zoo in Madrid (Spain) using serology (rk39) and PCR followed by sequencing of the ITS1 and ITS2 regions.

Thirty- three percent of the animals were infected in several tissues including blood, kidneys, lymph nodes, liver, lungs, skin and spleen [147]. In addition, two North West Bornean orangutan (*Pongo pygmaeus*) with clinical signs of visceral leishmaniasis were found to be infected using PCR (ITS1) of the bone marrow and serology [148].

Over the last decade, new reservoirs of leishmaniasis in Europe have been reinforced through investigation with bats, lagomorpha and hedgehog species, enlarging the list of wild animals infected with the parasite. Only one study in Europe demonstrated the presence of *L. infantum* in spleen, hair and blood of 51.9% common urban bats (*Pipistrellus pipistrellus*) in Spain, using PCR and sequencing of the repeat region [149]. One hundred percent of Algerian hedgehogs were found infected in two studies in Tunisia [150,151]. The authors employed smears, PCR and RFLP and sequencing of several targets. Spleen, liver, kidney, heart, lymph nodes, blood and eye swabs were positive to all of the techniques employed. In Spain, the European hedgehog was found to be infected using ELISA and qPCR of the kDNA region, finding higher values of infection in the spleen than in skin samples [137]. The parasite was also detected in a hair sample from one animal [131].

The DNA of *L. infantum* was first detected in 2013 in the spleen of European hares (*Lepus europaeus*) and Iberian hares (*Lepus granatensis*) from Spain, with 43.6% of the animals infected [152], since the outbreak of human leishmaniasis in Madrid motivated research on wild reservoirs. Since then, other studies were conducted finding the parasite in spleen, hair and skin with molecular (PCR of several targets), histological (direct antibody fluorescence assay) and serological analyses (IFAT) in Spain [153,154], Italy [155,156] and Greece [136]. Similar approaches were used for the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), which was investigated in six studies from Spain [128,129,153,154,157,158]. The authors found positive values ranging from 0.6% to 59%, depending on the time of the year, the sampling area or the techniques employed (i.e., smears, ELISA, IFAT, PCR). In general, serology displayed lower percentages of infection than PCR. In Italy and Greece, lower values of infected animals were obtained, but as previously pointed out, this might be due to the techniques employed (serology or PCR of ITS) [136,145].

Wild and synanthropic rodents were always the focus of researchers interested in *L. infantum* epidemiology, similar to what happened with other species of *Leishmania*. In Spain, the wood mouse (*Apodemus sylvaticus)* was positive with values of 20–50%, depending on the study, in several tissues [128,129,159]. The authors employed culture and smears [159], but also PCR followed by RFLP or sequencing of ITS1, ITS2, kDNA and SSU regions. Blood and spleen from shrews (*Crocidura russula*) were found to be infected at a low prevalence [160] as well as Algerian mice (*Mus spretus*), in percetanges from 4.3% to 42.9% using PCR in several tissues as well as serology [137,160]. In Iran, 39% of the sampled shor-tailed bandicoot rat (*Nesokia indica*) were positive in smears of skin and spleen, and later characterised as *L. infantum* by nested PCR of the kDNA when compared with reference isolates [161].

Synanthropic rodents were studied in eight surveys displaying high prevalence values for *Leishmania* infection. In most of them, *L. infantum* was found in the skin, liver and spleen of house mice (*Mus musculus*) and brown rats (*Rattus norvegicus*) in Portugal and Morocco [162,163], with animals displaying skin lesions in both studies. Smears were employed in Portugal while PCR and sequencing were employed in both studies, although different targets were selected (kDNA, ITS1, SSU). Prevalence values ranged from 22% to 33.3% in mice and 33% in rats. In Spain, 50% of house mice were found to test positive using PCR and sequencing of blood, bone-marrow and skin samples [159]. Brown rats were found infected using similar methologies, with 33–100% of animals positive in Spain [129,131] and 5.9% in Greece [164]. Black rats (*Rattus rattus*) were found infected in 18.2% of sampled animals in Saudi Arabia [163], 15.5% in Italy [165], 33.3% in Spain [157] and 7.5% in Morocco [161].

A summary of the techniques and organs found infected wit *L. infantum* in wild animals from Europe, Asia and Africa is summarised in Table 6.

Table 6. Wild animals reported to be positive for *L. infantum* from Europe, Asia and Africa. Organs or tissues where the parasite was detected are indicated, as well as the techniques employed for detection.

Host	Prevalence	Organs/Tissue Analysed	Methods for Detection	Country	References
Order Carnivora					
Canis aureus (golden jackal)	3–11.6%	blood, BM, liver, LN, serum, spleen	qPCR (ITS1), PCR (kDNA), IC rk39, smear, culture, PCR (α-tubulin and GAPDH)	Georgia, Israel, Iran and Romania	[120–123]
Canis lupus (grey wolf)	6–100%	blood, hair, liver, LN, skin, serum, spleen	PCR (cysteine protease B), qPCR (kDNA), PCR (kDNA) + RFLP, PCR (ITS2) + RFLP, PCR (kDNA) + sequencing, ELISA	Croatia, Italy, Spain	[124–132]
Felis silvestris (wildcat)	25–100%	liver, LN, skin, spleen	qPCR (kDNA), PCR (ITS2) + sequencing, PCR (kDNA) + sequencing, qPCR (kDNA) + RFLP + sequencing	Spain	[127,128,133]
Genetta genetta (common genet)	10–100%	blood, liver, skin and spleen	PCR (kDNA) + RFLP, qPCR (kDNA), PCR (ITS2) + sequencing, PCR (kDNA) + sequencing, qPCR (kDNA) + RFLP + sequencing, PCR (kDNA & ITS2) + RFLP	Spain	[125,127–129,133,134]
Herpestes ichneumon (Egyptian mongoose)	4.7–28.6%	blood, spleen,	PCR (kDNA) + RFLP, PCR (kDNA) + sequencing, PCR (ITS1)	Spain, Portugal	[125] [135]
Lutra lutra (Eurasian otter)	70%	spleen	PCR (kDNA) + sequencing	Spain	[127]
Lynx pardinus (Iberian lynx)	25%	blood, spleen,	PCR (kDNA) + RFLP	Spain	[125]
Martes foina (beech marten)	29–100%	liver, LN, hair, skin and spleen	qPCR (kDNA), qPCR (ITS2) + sequencing, PCR (kDNA) + sequencing, qPCR (kDNA) + sequencing, PCR (kDNA & ITS2) + RFLP	Spain	[127–129,131,133,137]
Martes martes (European pine marten)	30–62%	blood, liver, spleen	PCR (kDNA) + RFLP, qPCR (kDNA), qPCR (ITS2) + sequencing, PCR (kDNA) + sequencing	Spain	[127,133,134]
Meles meles (European badger)	26–53%	liver, spleen	qPCR (kDNA), PCR (ITS2) + sequencing, PCR (kDNA) + sequencing	Spain, Italy	[132,133]
Mustela lutreola (European Mink)	2.1–50%	liver, spleen, serum	qPCR (kDNA), PCR (ITS2) + sequencing, PCR (ITS1), ELISA	Greece, Spain	[133,136]
Mustela putorius (European polecat)	25%	liver, spleen	qPCR (kDNA), PCR (ITS2) + sequencing	Spain	[133]
Mustela vison (American mink)	100% (n = 1)	liver, spleen	qPCR (kDNA)	Spain	[137]

Panthera tigris (Tiger)	25%	serum, LN and swab (oral, conjunctival and nasal)	IFAT, qPCR	Italy	[138]
Sciurus vulgaris (red squirrel)	20%	liver, skin, pleen	qPCR (kDNA)	Spain	[137]
Ursus arctos (brown bear)	100% (*n* = 1)	liver, skin, spleen	PCR (kDNA), PCR (ITS2) + RFLP	Spain	[129]
Vulpes vulpes (red fox)	2.6–74.6%	blood, BM, hair, liver, LN, skin, spleen, serum	PCR (Repeat Region), PCR (kDNA), PCR (kDNA) + RFLP, qPCR (kDNA), qPCR (ITS2) + sequencing, qPCR (ITS1) + RFLP, PCR (α-tubulin and GAPDH) + sequencing, PCR (kDNA) + RFLP, PCR (kDNA) + sequencing, PCR (ITS2) + RFLP, PCR (ITS1) + sequencing, ELISA, IFAT, WB, IC rk39, smear, culture	France, Georgia and Greece, Iran, Italy and Spain	[120,122,125,127–129,131,132,139–146]
Order Chiroptera					
Pipistrellus pipistrellus (common urban bat)	59.2%	blood clot, hair, spleen	PCR (Repeat region) + sequencing	Spain	[149]
Order Diprotodontia					
Macropus rufogriseus (Bennett's wallaby)	33.3%	blood, BM, liver, lung, LN, kidney, skin, spleen	PCR (ITS1 and ITS2) + sequencing, IC rk39	Spain	[147]
Order Eulipotyphla					
Atelerix algirus (Algerian hedgehog)	100%	blood, eye swab, heart, kidney, liver, LN, skin, spleen	PCR (kDNA), PCR (ITS1), PCR (mini-exon), PCR (Repeat region), PCR (SSU), smear	Tunisia	[150,151]
Erinaceus europaeus (European hedgehog)	34.4–100%	hair, serum, skin, spleen	qPCR (kDNA), ELISA	Spain	[131] [137]
Order Lagomorpha					
Lepus europaeus (European hare)	0.9–43.6%	blood, spleen, serum	PCR (kDNA) + RFLP, PCR (ITS1), PCR (ITS1) + sequencing, ELISA, IFAT	Greece, Italy and Spain	[136,152,155,156]
Lepus granatensis (Iberian hare)	10.1–100%	hair, skin, spleen, serum	PCR (kDNA) + RFLP, qPCR (kDNA), nPCR (SSU), IFAT, DFA	Spain	[152–154]
Oryctolagus cuniculus (European rabbit)	0.6–59%	blood, BM, hair, heart, liver, LN, skin, spleen, serum	qPCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP, ELISA, nPCR (SSU), qPCR (kDNA) + RFLP + sequencing, PCR (kDNA) + RFLP, PCR (ITS2) + RFLP, PCR (ITS1), smears, culture, IFAT, DFA, ELISA, IC rk39	Greece, Italy and Spain	[128,129,136,145,153,154,157,158]
Order Primates					

173

Pongo pygmaeus (north west Bornean orangutan)	100%	BM, serum	Microscopy, IFAT, nPCR (ITS1)	Spain	[148]
Order Rodentia					
Apodemus sylvaticus (wood mouse)	20–50%	blood, BM, liver, skin, spleen	[illegible] (kDNA) + RFLP + sequencing, PCR (ITS2) + RFLP, smear, culture	Spain	[128,129,15[illegible]
Crocidura russula (white-toothed shrew)	13.3%	blood and/or spleen	qPCR (kDNA)	Spain	[160]
Mus musculus (house mouse)	22–50%	blood, BM, liver, skin, spleen	qPCR (kDNA) + sequencing, PCR (ITS1) + sequencing, PCR-ELISA (kDNA), nPCR (SSU and ITS1) + sequencing, smear	Morocco, Portugal and Spain	[162,163]
Mus spretus (Algerian mouse)	4.3–42.9%	blood, liver, skin, spleen and serum	qPCR (kDNA), ELISA	Spain	[137,160]
Nesokia indica (short-tailed bandicoot rat)	39%	liver, skin, spleen,	nPCR (kDNA), smear	Iran	[162]
Rattus norvegicus (brown rat)	5.9–100%	hair, liver, skin, spleen	nPCR (SSU), nPCR (ITS1) + sequencing, qPCR (kDNA), PCR (kDNA), PCR (kDNA) + RFLP, PCR (ITS2) + RFLP, smear	Greece, Morocco, Portugal and Spain	[129,131,162,163,166]
Rattus rattus (black rat)	7.5–33.3%	blood, BM, liver, skin, spleen	PCR (kDNA) + sequencing, PCR (ITS1) + sequencing, PCR-ELISA (kDNA), nPCR (SSU), nPCR (ITS1) + sequencing, smear, culture, inoculation to hamster, isoenzymes	Italy, Morocco, Saudi Arabia and Spain	[159,163–165]

BM: bone marrow; Cyt b: cytochrome B; DFA: direct fluorescence antibody assay; GADPH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; IC: immunochromatography; ELISA: enzyme immune assay; IFAT: immunofluorescence assay; ITS: internal transcriber spacer; kDNA: kinetoplast DNA; LN: lymph node; nPCR: nested PCR; qPCR: quantitative PCR; RFLP: restriction fragment length polymorphism; SSU: small subunit of ribosomal RNA; WB: Western blot.

In previous reviews, other species were reported infected with *L. infantum* or were described as clinical cases: domestic ferrets (*Mustela putorius furo*), corsac foxes (*Vulpes corsak*), raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*), Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*), Persian jirds (*Meriones persicus*), Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), grey hamsters (*Cricetulus migratorius*) and porcupines (*Hystrix* sp.). Detailed information can be found in specific reviews [19,26,27].

3.6. Wild Animals Infected with L. major

L. major infections extended through Asian and African countries [3,5], and nineteen studies were carried out from 1990 in wild animals in Algeria, Tunisia, Iran, Israel, Ethiopia, Kenya, Cameroon and Morocco (Supplementary Material File S5).

In the included studies, the most employed techniques to detect *L. major* were PCR of the kDNA (nine studies) and ITS (nine studies) regions, although SSU and the repeat regions were also employed, mainly followed by RFLP and/or sequencing (four and two studies, respectively). Only seven studies exclusively employed the skin to search for the parasite, but the rest of the studies employed also other anatomical sites such as liver, spleen, heart, blood, kidney, lymph nodes, eye swabs or even feces. Noteworthy were the higher prevalence values observed in smears compared with the PCR of the kDNA in some studies, probably due to the methodology employed, since the DNA was extracted from fixed smears [161,167–171] (for details, see Supplementary Materials File S5).

The infection was demonstrated in the orders Chiroptera, Eulipotyphla, Primates, and Rodentia, the last group, again, being the most widely studied. Only one species of bat (*Nycteris hispida*) was reported in Ethiopia to be infected with *L. major* in the spleen by qPCR and sequencing of the kDNA and ITS regions [172]. The DNA of the parasite was found in several organs and tissues in three species of hedgehogs in Algeria, Iran and Tunisia including spleen, skin, heart, kidney, liver, blood and eye swab. A hundred percent prevalence was reported in two studies carried out on the Algerian hedgehog (*Atelerix algirus*) in Tunisia [150,151], while 36.8% was reported in Algeria by serology and PCR–RFLP of the kDNA region employing the spleen and skin [173] (Supplementary Materials File S5). Two studies, including the long-eared hedgehog (*Hemiechinus auritus*), reported prevalence rates ranging from 33%, using nPCR of the ITS and smears of the skin [173], to 53.3%, employing nPCR of the kDNA from the skin and smears from skin, liver and spleen [174]. The desert hedgehog (*Paraechinus aethiopicus*) was found to be infected with *L. major* in two studies. The first study employed qPCR of the kDNA region from spleen and skin as well as serology [175], and the other reported the infection in the kidney, blood, liver, eye swab and lymph node of one animal by qPCR of the kDNA, SSU and repeat regions [151]. The high values of infection found in these animals suggest their role as reservoirs, and these animals should be monitored in endemic areas.

One study investigated the immune response to *L. major* of three species of primates in Kenya (*Cercopithecus mitis*, *Chlorocebus aethiops* and *Papio cynocephalus anubis*) including humoral (ELISA and Western blot) and cellular responses (lymphoproliferative assay) [176]. The authors include 57–213 individuals per technique and found that 60–77% of the animals were previously exposed to the parasite. Surprinsingly, one study found parasites (amastigote and promastigotes forms) and DNA of *L. major* in the feces of gorillas (*Gorilla gorilla*) in Cameroon, and the authors pointed to the ingestion of phlebotomines by the animals [15]. However, no other method to measure exposure (serology) or presence of the parasite in organs was employed.

Eleven species of rodents were reported as infected with the parasite in nine studies from Iran, and another one from Israel (Supplementary Material File S5), following the same tendency of other zoonotic species of *Leishmania* included in the systematic review. The higher prevalence was found in *Meriones libycus* by PCR of kDNA in the skin [177], which is also the species most studied regarding *Leishmania* infections in Iran [167–171,173,177,178]. Other species of *Meriones* (*M. hurrianae*, *M. persicus* and *M tristrami*) and *Microtus* (*M. guentheri* and *M. socialis*) were reported to be infected with parasites with

values of 5.7–58.3% [161,168,171,179]. *Mus musculus* was found to be infected with low percentages of infection (2.3–33%) in three studies carried out in Iran and Israel. However, PCR of the ITS region from skin samples, and smears from skin, liver and spleen, were used instead of PCR of kDNA, [161,179]. *Nesokia indica* was found to be infected in three studies from Iran, ranging from 8% in skin by smears and PCR of the ITS region [168] to values higher than 61% employing smears and PCR of skin, liver and spleen tissues [161,167]. The same techniques (PCR of the ITS and kDNA regions) were employed in three studies in Iran to detect *L. major* infections in *Tatera indica* from skin, liver or spleen, with values of prevalence ranging from 3,7 to 50% [168,171,178]. The great gerbil (*Rhombomys opimus*) was reported infected with the parasite in Iran [168,178] using smears, PCRs and inoculation of hamsters (see Supplementary Materials File S5 for details). The high prevalence found in many of these rodent species points to their reservoir role.

Most of the studies did not find clinical signs in infected animals, or the authors did not look for them; however, skin lesions were recorded in *Meriones libycus* from Iran [177].

All the information concerning *L. major* infection in wild animals is summarised in Table 7.

In previous reviews, other species were reported infected with *L. major* in the past including primates (*Cercopithecus aethiops*) and rodents (*Xerus rutilus*, *Gerbillus pyramidum*, *Tatera gambiana*, *Tatera robusta*, *Taterillus emini*, *Meriones crassus*, *Meryones meridianus*, *Meryones shawi*, *Psammomis obesus*, *Praomys erythroleucus* and *Mastomys natalensis*) [23].

Table 7. Wild animals reported positive for *L. major*. Organs or tissues where the parasite was detected, and the techniques employed are indicated.

Host	Prevalence	Organs/Tissue Analysed	Methods for Detection	Country	References
Order Chiroptera					
Nycteris hispida	100% (*n* = 1)	spleen	qPCR (kDNA and ITS1) + sequencing	Ethiopia	[172]
Order Eulipotyphla					
Atelerix algirus (Algerian hedgehog)	36.8–100%	blood, eye swab, heart, kidney, liver, LN, skin, spleen	qPCR (kDNA), PCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP, nPCR (kDNA), PCR (ITS1) + sequencing + RFLP, PCR (mini-exon) + sequencing + RFLP, nPCR (Repeat region) + sequencing + RFLP, PCR (SSU) + sequencing, smear, ELISA, WB	Algeria, Tunisia	[150,151,175]
Hemiechinus auritus (long-eared hedgehogs)	33.3–53.3%	liver, skin, spleen	nPCR (ITS1) + sequencing, nPCR (kDNA), semi-nPCR (kDNA), smear	Iran	[173,174]
Paraechinus aethiopicus (desert hedgehog)	40–100%	blood, eye swab, kidney, liver, LN, skin, spleen, serum	qPCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP, PCR (kDNA and SSU) + sequencing, nPCR (Repeat region) + RFLP + sequencing, ELISA, WB	Algeria, Tunisia	[151,175]
Order Primates					
Cercopithecus mitis (syke's monkeys)	67.2%	serum	ELISA, WB	Kenya	[176]
Chlorocebus aethiops (vervet monkeys)	60.6%	serum	ELISA, WB, lymphocyte proliferation assay	Kenya	[176]
Gorilla gorilla (gorilla)	13.2%	faeces	qPCR (SSU), qPCR (SSU) + sequencing, PCR (ITS) + sequencing, PCR (Cytb) + sequencing	Cameroon	[15]
Papio cynocephalus anubis (olive baboons)	77.2%	serum	ELISA, WB	Kenya	[176]
Order Rodentia					
Gerbillus nanus	11.8%	liver, skin, spleen	PCR (kDNA), smear	Iran	[171]
Meriones hurrianae	7.7%	liver, skin, spleen	PCR (kDNA), smear	Iran	[171]
Meriones libycus	5.7–100%	liver, skin, spleen	PCR (kDNA), nPCR (ITS1), PCR (ITS1) + RFLP + sequencing, semi-nPCR (kDNA), PCR (Cytb) + sequencing, nPCR (ITS1) + sequencing, nPCR (ITS2) + RFLP, smear, inoculation to hamster, inoculation to BALB/c mice	Iran	[167–170,173,177,178]
Meriones persicus	33%	skin	PCR (ITS1) + RFLP + sequencing, smear	Iran	[168]
Meriones tristrami	58.3%	skin	PCR (ITS1) + RFLP	Israel	[179]
Microtus guentheri	16.5%	skin	PCR (ITS1) + RFLP	Israel	[179]
Microtus socialis	50%	liver, skin, spleen	smear	Iran	[161]
Mus musculus (house mouse)	2.3–33%	liver, skin, spleen	PCR (ITS1) + RFLP, smear	Israel, Morocco and Iran	[161,179]
Nesokia indica	8–63.4%	liver, skin, spleen	PCR (ITS1) + RFLP + sequencing, PCR (kDNA), nPCR (kDNA), smear	Iran	[161,167,168]
Rhombomys opimus (great gerbil)	13.4–33%	skin	PCR (ITS1) + RFLP + sequencing, semi-nPCR (kDNA), PCR (Cytb) + sequencing, smear, IHC, inoculation to hamster, inoculation to BALB/c mice	Iran	[168,169]
Tatera indica	3.7–50%	liver, skin, spleen	PCR (kDNA), PCR (ITS1) + RFLP + sequencing, semi-nPCR (kDNA) + sequencing, PCR (Cytb), smear	Iran	[168,169,171]

Cytb: cytochrome B; IHC: immunohistochemistry; ELISA: enzyme immune assay; ITS: internal transcriber spacer; kDNA: kinetoplast DNA; LN: lymph node; nPCR: nested PCR; qPCR: quantitative PCR; RFLP: restriction fragment length polymorphism; SSU: small subunit of ribosomal RNA; WB: Western blot.

3.7. Wild Animals Infected with Leishmania tropica

Four studies conducted in Ethiopia [175,180], Kenya [181] and Egypt [182] demonstrated the presence of *L. tropica* DNA in the spleen of rodents and bats. One hundred and sixty-three bats (*Cardioderma cor*) were analyzed in Ethiopia by qPCR of the kDNA and ITS1 regions and 4.9% were found to be infected [175]. Using the same techniques, the authors found prevalences from 9.9% to 20% in the rodents *Acomys* sp. *Arvicanthis niloticus* and *Gerbillus nanus* [180] (Supplementary Materials File S5). In Egypt, *L. tropica* was found in 14.3% of the analyzed Anderson's gerbils (*Gerbillus andersoni*) with clinical signs by smears and PCR of the ITS1 region [182]. Finally, employing nested PCR and sequencing of the SSU and the ITS1 regions, 22% of the sampled house mice (skin) were found infected with *L. tropica* in Morocco [163].

The species *Procavia capensis* and *Arvicanthis niloticus* were reported in previous reviews infected with *L. tropica* [23].

3.8. Wild Animals Infected with Leishmania donovani

In Africa, rodents were infected with *L. donovani* in three studies. One employed serology and found 5.5% of African grass rats (*Arvicanthis niloticus*) to be positive by ELISA in Sudan [183], while another study found 18.2% of black rats (*Rattus rattus*) with clinical signs carrying the parasite in Saudi Arabia [164], employing culture, smear and inoculation of hamster. The other study found DNA of the *L. donovani* complex in the spleen in 15.3% of *Mastomys erythroleucus*, 7.7% of *Gerbilliscus nigricaudus* and 17.4% of *Arvicanthis niloticus* from Ethiopia using PCR of the kDNA and ITS regions [180].

Finally, one study obtained a prevalence of 23.5% of the *L. donovani* complex in European hares from Greece by nested PCR of the ITS region, employing the spleen of 166 animals [184] (Supplementary Materials File S5).

Details of infection with *L. donovani* of *Felis serval* can be found in a previous review [23].

Some of the previously mentioned studies obtained positive results for *Leishmania* spp., but they could not further determine the species (see Supplementary Materials File S5). The spleen of other four species of bats (*Glauconycteris variegate*, *Miniopterus arenarius*, *Neoromicia somalica* and *Scotophilus colias*) were found to be infected with *Leishmania* spp. in Ethiopia by PCR [175]. In a similar approach, 40% of the analyzed rodents of *Aethomys* spp. were also positive [180]. Smears of liver and spleen and indirect haemagglutination test were employed to detect the parasite in 40% of the sand cat (*Felis margarita*) in Saudi Arabia [185]. The same techniques were employed to detect *Leishmania* spp. infections in *Gerbillus pyramidum* and *Rattus norvegicus* in Egypt [186].

In previous reviews, other species of mammals, such as *Crycetomys gambianus*, *Heterohyrax brucei* and *Dendrohyrax arboreus*, were reported to be infected with *L. aethiopica* [23].

4. Conclusions

Knowledge of the role of wild animals as suitable hosts or reservoirs of *Leishmania* zoonotic species is essential in order to apply control measues or monitoring programmes. In this review, a systematic search of wild animals infected with zoonotic species of *Leishmania* was conducted, starting from 1990 and following PRISMA methodology. One hundred and eighty-nine species of wild animlas from ten orders (i.e., Carnivora, Chiroptera, Cingulata, Didelphimorphia, Diprotodontia, Lagomorpha, Eulipotyphla, Pilosa, Primates and Rodentia) were included in the review. Rodents and carnivores were the orders more widely explored, being the most probable main reservoirs, and also the ones presenting more clinical signs. *L. infantum* was the most widely distributed species, both geographically and in the range of species, followed by *L.* (*Viannia*) *braziliensis*, but this fact could be due to the more exhaustive investigation on these species.

More studies on the role of infected wild animals are necessary in order to implement specific measures when an outbreak of the disease appears.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2076-2607/9/5/1101/s1, Supplementary File S1: Detailed information on wild animals infected with *Leishmania* (*Viania*) spp.; Supplementary File S2: Detailed information on wild animals infected with *Leishmania amazonensis;* Supplementary File S3: Detailed information on wild animals infected with *Leishmania mexicana;* Supplementary File S4: Detailed information on wild animals infected with *Leishmania infantum* in the Americas; Supplementary File S5: Detailed information on wild animals infected with *Leishmania* spp. from Europe, Africa and Asia.

Author Contributions: Conceptualisation, R.A.M.-D., I.A.-C. and M.T.G.-M.; Methodology, M.T.G.-M. and I.A.-C.; Software, R.A.M.-D., I.A.-C. and M.T.G.-M.; Validation, R.A.M.-D., I.A.-C. and M.T.G.-M.; Formal Analysis, R.A.M.-D., I.A.-C. and M.T.G.-M.; Investigation, R.A.M.-D., I.A.-C. and M.T.G.-M.; Resources, R.A.M.-D., I.A.-C. and M.T.G.-M.; Data Curation, R.A.M.-D., I.A.-C. and M.T.G.-M.; Writing—Original Draft Preparation, R.A.M.-D., I.A.-C. and M.T.G.-M.; Writing—Review and Editing, R.A.M.-D., I.A.-C. and M.T.G.-M.; Validation: R.A.M.-D., I.A.-C. and M.T.G.-M.; Supervision, R.A.M.-D. and M.T.G.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Maxfield: L.; Crane, J.S. *Leishmaniasis*; StatPearls Pulblishing: 2019. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531456/ (accessed on 6 September 2020).
2. Bern, C.; Maguire, J.H.; Alvar, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2008**, *2*, e313.
3. World Health Organization. *Leishmaniasis Situation and Trends*; Global Health Observatory data; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018.
4. Akhoundi, M.; Kuhls, K.; Canne, A.; Votýpka. J.; Marty, P.; Delaunay, P.; Sereno, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis*. **2016**, *10*, e0004349.
5. Akhoundi, M.; Downing, T.; Votýpka, J.; KKuhls, K.; Lukeš, J.; Cannet, A.; Ravel, C.; Marty, P.; Delaunay, P.; Kasbari, M.; et al. *Leishmania* Infections: Molecular Targets and Diagnosis. *Mol. Asp. Med*. **2017**, *57*, 1–29, doi:10.1016/j.mam.2016.11.012.
6. Schönian, G.; Mauricio, I.; Cupolillo, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol*. **2010**, *26*, 466–469.
7. Pruzinova, K.; Sadlova, J.; Seblova, V.; Homola, M.; Votypka, J.; Volf, P. Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128203.
8. World Health Organization. *Control of the Leishmaniases*; WHO Technical Report Series; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2010; pp. 1–186.
9. Naucke, T.J.; Lorentz, S. First Report of Venereal and Vertical Transmission of Canine Leishmaniosis from Naturally Infected Dogs in Germany. *Parasit. Vectors* **2012**, *5*, 1–5, doi:10.1186/1756-3305-5-67.
10. Guedes, D.L.; van Henten, S.; Cnops, L.; Adriaensen, W.; Johan Griensven, J. Sexual Transmission of Visceral Leishmaniasis: A Neglected Story. *Trends Parasitol.* **2020**, *36*, 950–952, doi:10.1016/j.pt.2020.08.002.
11. Naucke, T.J.; Amelung, S.; Lorentz, S. First Report of Transmission of Canine Leishmaniosis through Bite Wounds from a Naturally Infected Dog in Germany. *Parasit. Vectors* **2016**, *9*, 1–4, doi:10.1186/s13071-016-1551-0.
12. Coutinho, M.T.Z.; Linardi, P.M. Can Fleas from Dogs Infected with Canine Visceral Leishmaniasis Transfer the Infection to Other Mammals? *Vet. Parasitol*. **2007**, *147*, 320–325, doi:10.1016/j.vetpar.2007.04.008.
13. Lainson, R. Ecological Interactions in the Transmission of the Leishmaniases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **1988**, *321*, 389–404, doi:10.1098/rstb.1988.0099.
14. De Oliveira, F.M.; Costa, L.H.C.; de Barros, T.L.; Ito, P.K.R.K.; Colombo, F.A.; Carvalho, C.; Pedro, W.A.; Queiroz, L.H.; Nunes, C.M. First Detection of *Leishmania* Spp. DNA in Brazilian Bats Captured Strictly in Urban Areas. *Acta Trop.* **2015**, *150*, 176–181, doi:10.1016/j.actatropica.2015.07.010.
15. Hamad, I.; Forestier, C.L.; Peeters, M.; Delaporte, E.; Raoult, D.; Bittar, F. Wild Gorillas as a Potential Reservoir of *Leishmania major*. *J. Infect. Dis.* **2015**, *211*, 267–273, doi:10.1093/infdis/jiu380.
16. Rescigno, M.; Urbano, M.; Valzasina, B.; Francolín, M.; Rotta, G.; Bonasio, R.; Granucci, F.; Kraehenbuhl, J.-P.; Ricciardi-Castagnoli, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 361–367.
17. Rodríguez, J.M. The origin of human milk bacteria: Is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv. Nutr.* **2014**, *5*, 779–784.
18. World Health Organization. Leishmaniasis Facksheet. Available online: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis (accessed on 8 January 2021).
19. Cardoso, L.; Schallig, H.; Persichetti, M.F.; Pennisi, M.G. New Epidemiological Aspects of Animal Leishmaniosis in Europe: The Role of Vertebrate Hosts Other than Dogs. *Pathogens* **2021**, *10*, 1–46.

20. Miró, G.; Müller, A.; Montoya, A.; Checa, R.; Marino, V.; Marino, E.; Fuster, F.; Escacena, C.; Descalzo, M.A.; Gálvez, R. Epidemiological Role of Dogs since the Human Leishmaniosis Outbreak in Madrid. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 209, doi:0.1186/s13071-017-2147-z.
21. Quaresma, P.F.; Rego, F.D.; Botelho, H.A.; da Silva, S.R.; Moura, A.J., Jr.; Teixeira Neto, R.G.; Madeira, F.M.; Carvalho, M.B.; Paglia, A.P.; Melo, M.N.; et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *105*, 579–585.
22. World Health Organization. *Control of the Leishmaniases*: *Report of a WHO Expert Committee*; WHO Report Series; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1990; Volume 793.
23. Ashford, R.W. Leishmaniasis Reservoirs and Their Significance in Control. *Clin. Dermatol.* **1996**, *14*, 523–532.
24. Roque, A.L. R.; Jansen, A.M. Wild and Synanthropic Reservoirs of *Leishmania* Species in the Americas. *Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl.* **2014**, *3*, 251–262, doi:10.1016/j.ijppaw.2014.08.004.
25. Souza, T.D.; Turchetti, A.P.; Fujiwara, R.T.; Paixão, T.A.; Santos; R.L. Visceral Leishmaniasis in Zoo and Wildlife. *Vet. Parasitol.* **2014**, *200*, 233–241, doi:10.1016/j.vetpar.2013.12.025.
26. Millán, J.; Ferroglio, E.; Solano-Gallego, L. Role of Wildlife in the Epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitol. Res.* **2014**, 2005–2014, doi:10.1007/s00436-014-3929-2.
27. Quinnell, R.J.; Courtenay, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* **2009**, *136*, 1915–1934, doi:10.1017/s0031182009991156.
28. Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *PLoS Med*. **2021**, *18*, e1003583, doi:10.1371/journal.pmed.1003583, PMID: 33780438.
29. Alexander, B.; Lozano, C.; Barker, D.C.; McCann, S.H.E.; Adler, G.H. Detection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Complex in Wild Mammals from Colombian Coffee Plantations by PCR and DNA Hybridization. *Acta Trop.* **1998**, *69*, 41–50, doi:10.1016/S0001-706X(97)00114-9.
30. Brandão-Filho, S.P.; Brito, M.E.; Carvalho, F.G.; Ishikaw, E.A.; Cupolillo, E.; Floeter-Winter, L.; Shaw, J.J. Wild and Synanthropic Hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the Endemic Cutaneous Leishmaniasis Locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *97*, 291–296, doi:10.1016/S0035-9203(03)90146-5.
31. Tonelli, G.B.; Tanure, A.; Rego, F.D.; Carvalho, G.M.L.; Stumpp, R.; Ássimos, G.R.; Campos, A.M.; Lima, A.C.V.M.; Gontijo, C.M.F.; Paz, G.F.; et al. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Infection in Wild Small Mammals in Ecotourism Area of Brazil. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–10, doi:10.1371/journal.pone.0190315.
32. Lucas, J.; Lourenço, M.; Minuzzi-souza, T.T.C.; Silva, L.R.; Oliveira, A.M. High Frequency of Trypanosomatids in Gallery Forest Bats of a Neotropical Savanna. *Acta Trop.* **2018**, *177*, 200–206.
33. De Lima, H.; De Guglielmo, Z.; Rodriguez, A.; Convit, J.; Rodriguez, N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 169–174.
34. Trüeb, I.; Portela, R.D.; Franke, C.R.; Carneiro, I.O.; Ribeiro, G.J.; Soares, R.P.; Barrouin-Melo, S.M. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. Infection in Wildlife from Urban Rainforest Fragments in Northeast Brazil. *J. Wildl. Dis.* **2018**, *54*, 76–84, doi:10.7589/2017-01-017.
35. Cardoso, R.M.; De Araújo, N.S.L.; Romero, G.A.S.; Souza, T.T.C.M.; Dietrich, A.G.; Mendes, J.D.; Reis, M.L.; Ferreira, J.B.C.; Hecht, M.M.; Gurgel-Gonçalves, R. Expanding the Knowledge about *Leishmania* Species in Wild Mammals and Dogs in the Brazilian Savannah. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 1–8, doi:10.1186/s13071-015-0780-y.
36. Cássia-Pires, R.; Boité, M.C.; D'Andrea, P.S.; Herrera, H.M.; Cupolillo, E.; Jansen, A.M.; Roque, A.L.R. Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, 8, doi:10.1371/journal.pntd.0003389.
37. Voltarelli, E.M.; Arraes, S.M.A.A.; Perles, T.F.; Lonardoni, M.V.C.; Teodoro, U.; Silveira, T.G.V. Serological survey for *Leishmania* sp. Infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná state, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2009**, 15, 732–744.
38. Schallig, H.D.F.H.; da Silva; E.S.; van der Meide, W.F.; Schoone, G.J.; Contifjo, C.M.F. *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): A Potential Reservoir Host for Zoonotic Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2007**, *7*, 387–393, doi:10.1089/vbz.2006.0651.
39. Lima, B.S.; Dantas-Torres, F.; de Carvalho, M.R.; Marinho-Junior, J.F.; de Almeida, E.L.; Brito, M.E.; Gomes, F.; Brandão-Filho, S.P. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in North-Eastern Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2013**, *107*, 592–597.
40. Aransay, A.M.; Scoulica, E.; Tselentis, Y: Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 1933–1938.
41. Telleria, J.; Bosseno, M.F.; Tarifa, T.; Buitrago, R.; Martinez, E.; Torrez, M.; Le Pont, F.; Brenière, S.F. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a Sub-Andean focus of Bolivia identified by kDNA-polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1999**, *94*, 5–6.
42. Shapiro, J.T.; da Costa Lima Junior, M.S.; Dorval, M.E.; de Oliveira, F.A.; Cepa Matos, M.F.; Bordignon, M.O. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. *Acta Trop*. **2013**, *128*, 171–174.

43. Castro Ferreira, E.; Pereira, A.A.S.; Silveira, M.; Margonari, C.; Marcon, G.E.B.; França, A.O.; Souza, L.; Castro, L.S.; OscarBordignon, M.; Fischer, E.; et al. *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* Infecting Bats from Pantanal Wetland, Brazil: First Records for *Platyrrhinus lineatus* and *Artibeus planirostris*. *Acta Trop.* **2017**, *172*, 217–222, doi:10.1016/j.actatropica.2017.05.012.
44. Castro, L.S., Dorval, M.E.C.; Matheus, L.: M.D.; Bednaski, A.V.; Facco, G.G.; Silveira, M.; Santos, C.F.; Gontijo, C.M.F.; Oliveira, A.P.G.; Ferreira, E.C. *Leishmania* Presence in Bats in Areas Endemic for Leishmaniasis in Central-West Brazil. *Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl.* **2020**, *11*, 261–267, doi:10.1016/j.ijppaw.2020.02.008.
45. Gómez-Hernández, C.; Bento, E.C.; Rezende-Oliveira, K.; Nascentes, G.A.N.; Barbosa, C.G.; Batista, L.R.; Tiburcio, M.G.S.; Pedrosa, A.L.; Lages-Silva, E.; Ramírez, J.D; et al. *Leishmania* Infection in Bats from a Non-Endemic Region of Leishmaniasis in Brazil. *Parasitology* **2017**, *144*, 1980–1985, doi:10.1017/S0031182017001500.
46. Naiff, R.D.; Freitas, R.A.; Naiff, M.F.; Arias, J.R.; Barrett, T.V.; Momen, H.; Grimaldi Júnior, G. Epidemiological and Nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* **1991**, *86*, 317–321.
47. Llanos-Cuentas, E.A.; Roncal, N., Villaseca, P.; Paz, L.; Ogusuku, E.; Perez, J.E.; Cáceres, A.; Davies, C.R. Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *93*, 15–20.
48. Quintal, A.P.; Ribeiro, E.S.; Rodrigues, F.P.; Rocha, F.S.; Floeter-Winter, L.M.; Nunes, C.M. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. *Vet. Parasitol.* **2011**, *176*, 112–119.
49. Ocampo, C.B.; Ferro, M.C.; Cadena, H.; Gongora, R.; Pérez, M.; Valderrama-Ardila, C.H.; Quinnell, R.J.; Alexander, N. Environmental Factors Associated with American Cutaneous Leishmaniasis in a New Andean Focus in Colombia. *Trop. Med. Int. Health* **2012**, *17*, 1309–1317, doi:10.1111/j.1365-3156.2012.03065.x.
50. de Castro Ferreira, E.; Cruz, I.; Cañavate, C.; de Melo, L.A.; Pereira, A.A.S.; Madeira, F.A.M.; Nogueira Valério, S.A.; Cunha, H.M.; Paglia, A.P.; Ferreira Gontijo, C.M. Mixed Infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in Rodents from Endemic Urban Area of the New World. *BMC Vet. Res.* **2015**, *11*, 1–7, doi:10.1186/s12917-015-0392-y.
51. Silva, E.M.; Alves, L.C.; Guerra, N.R.; Farias, M.P.; Oliveira, E.L.; de Souza, R.C.; da Cunha, C.; Ramos, R.A.; Porto, W.J. *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from Northeastern Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.* **2016**, *47*, 942–944, doi:10.1638/2015-0148.1.
52. Paiz, L.; Donalisio, M.R.; Richini-Pereira, V.B.; Motoie, G.; Castagna, C.L.; Tolezano, J.E. Infection by *Leishmania* spp. in Free-Ranging Opossums (*Didelphis albiventris*) in an Environmentally Protected Area Inhabited by Humans in Southeastern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2016**, *16*, 728–730, doi:10.1089/vbz.2016.2001.
53. Pereira, A.A.S.; De Castro Ferreira, E.; Da Rocha Lima, A.C.V.M.; Tonelli, G.B.; Rêgo, F.D.; Paglia, A.D.; Andrade-Filho, J.D.; Paz, G.F.; Gontijo, C.M.F. Detection of *Leishmania* spp in Silvatic Mammals and Isolation of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from *Rattus rattus* in an Endemic Area for Leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–9, doi:10.1371/journal.pone.0187704.
54. Donalisio, M.R.; Paiz, L.M.; da Silva, V.G.; Richini-Pereira, V.B.; von Zuben, A.P.B.; Castagna, C.L.; Motoie, G.; Hiramoto, R.M.; Tolezano, J.E. Visceral leishmaniasis in an environmentally protected area in southeastern Brazil: Epidemiological and laboratory cross- sectional investigation of phlebotomine fauna, wild hosts and canine cases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, 11, e0005666, doi:10.1371/journal. pntd.0005666.
55. Brandão, E.M.V.; Samanta, C.C.; Xavier, J.G.; Carvalhaes, P.S.; D'andrea, Lemos, F.G.; Azevedo, F.C.; Cássia-Pires, R.; Jansen, A.M.; Roque, A.L.R. Trypanosomatids in Small Mammals of an Agroecosystem in Central Brazil: Another Piece in the Puzzle of Parasite Transmission in an Anthropogenic Landscape. *Pathogens* **2019**, *8*, 1–15, doi:10.3390/pathogens8040190.
56. González, K., Calzada, J.E.; Saldaña, A.; Rigg, C.A.; Alvarado, G.; Rodríguez-Herrera, B.; Kitron, U.D.; Adler, G.H.; Gottdenker, N.L.; Chaves, L.F.; et al. Survey of Wild Mammal Hosts of Cutaneous Leishmaniasis Parasites in Panamá and Costa Rica. *Trop. Med. Health* **2015**, *43*, 75–78, doi:10.2149/tmh.2014.
57. Silveira, F.T.; Lainson, R., Shaw; J.J., Braga, R.R.; Ishikawa, E.E.; Souza, A.A. Cutaneous leishmaniasis in Amazonia: Isolation of *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* from the rodent *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), in the state of Para, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1991**, *33*, 18–22.
58. Oliveira, F.S., Pirmez, C.; Pires, M.Q.; Brazil, R.P.; Raquel, S. Pacheco. PCR-Based Diagnosis for Detection of *Leishmania* in Skin and Blood of Rodents from an Endemic Area of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* **2005**, *129*, 219–227, doi:10.1016/j.vetpar.2005.01.005.
59. de Freitas, T.P.; D'Andrea, P.S.; de Paula, D.A.; Nakazato, L.; Dutra, V.; Bonvicino, C.R.; de Almeida, A.d.B.P.F.; Boa-Sorte, E.d.; Sousa, V.R.F. Natural infection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. **2012**, *12*, 81–83.
60. Brito, M.E.F.; Andrade, M.S.; Mendonça, M.G.; Silva, C.J.; Almeida, E.L.; Lima, B.S.; Félix, S.M.; Abath, F.G.C.; da Graça, G.C.; Porrozzi, R.; et al. Species Diversity of *Leishmania* (*Viannia*) Parasites Circulating in an Endemic Area for Cutaneous Leishmaniasis Located in the Atlantic Rainforest Region of Northeastern Brazil. *Trop. Med. Int. Health* **2009**, *14*, 1278–1786, doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02361.x.
61. De Bruijn, M.H.L.; Barker, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop*. **1992**, *52*, 45–58.
62. Marcelino, A.P.; Ferreira, E.C.; Avendanha, J.S.; Costa, C.F.; Chiarelli, D.; Almeida, G.; Moreira, E.C.; Leite, R.C.; dos Reis, J.K.P.; Gontijo, C.M.F. Molecular Detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an Area Endemic for Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* **2011**, *183*, 54–58, doi:10.1016/j.vetpar.2011.06.019.

63. Vasconcelos, I.A.; Vasconcelos, A.W.; Fe Filho, N.M.; Queiroz, R.G.; Santana, E.W.; Bozza, M.; Sallenave, S.M.; Valim, C.; David, J.R.; Lopes, U.G. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturité, northeastern Brazil. *Am. J. Trop Med. Hyg.* **1994**, *50*, 158–164.
64. Martínez, M.F.; Kowalewski, M.M.; Giuliani, M.G.; Acardi, S.A.; Salomón, O.D. Molecular Identification of *Leishmania* in Free-Ranging Black and Gold Howler Monkeys (*Alouatta caraya*) in Northeastern Argentina. *Acta Trop.* **2020**, *210*, 105534, doi:10.1016/j.actatropica.2020.105534.
65. Acardi, S.A.; Rago, M.V.; Liotta, D.J.; Fernandez-Duque, E.; Salomón, O.D. *Leishmania* (*Viannia*) DNA Detection by PCR-RFLP and Sequencing in Free-Ranging Owl Monkeys (*Aotus azarai azarai*) from Formosa, Argentina. *Vet. Parasitol.* **2013**, *193*, 256–259, doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.012.
66. Savani, E.S., de Almeida, M.F., de Oliveira Camargo, M.C., D'Auria, S.R., Silva, M.M., de Oliveira, M.L.; Sacramento, D. Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in Brazilian bats. *Vet. Parasitol*. **2010**, *168*, 5–10.
67. De Lima, V.M.F.; Santiago, M.E.B.; Sanches, L.dC.; de Lima, B.D. Molecular diagnosis of *Leishmania amazonensis* ina captive spider monkey in Bauru, Sao Paulo, Brazil. *J. Zoo Wildl. Med*. **2012**, *43*, 943–945, doi:10.1638/2012-0059R1.1.
68. Kerr, S.F.; Emmons, L.H.; Melby, P.C.; Liu, C.; Perez, L.E.; Villegas, M.; Miranda, R. *Leishmania amazonensis* infections in Oryzomys acritus and Oryzomys nitidus from Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **2006**, *75*, 1069–1073.
69. Zamora-Ledesma, S.; Hernández-Camacho, N.; Villagrán-Herrera, M.E.; Sánchez-Moreno, M.; Concha-Valdez, F.G.; Jones, R.W.; Moreno-Pérez, M.A.; Camacho-Macías, B. Presence of Trypanosomatid Antibodies in Gray Foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) and Domestic and Feral Dogs (*Canis lupus familiaris*). *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* **2016**, *5*, 25–30.
70. Berzunza-Cruz, M.; Rodríguez-Moreno, A.; Gutiérrez-Granados, G.; González-Salazar, C.; Stephens, C.R.; Hidalgo-Mihart, M.; Marina, C.F.; Rebollar-Téllez, E.A.; Bailón-Martínez, D.; Balcells, C.D.; et al. *Leishmania* (*L.*) *mexicana* Infected Bats in Mexico: Novel Potential Reservoirs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, 1–15, doi:10.1371/journal.pntd.0003438.
71. Van Wynsberghe, N.R.; Canto-Lara, S.B.; Sosa-Bibiano, E.I.; Rivero-Cardenas, N.A.; Andrade-Narvaez, F.J. Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* in five foci of cutaneous leishmaniasis in the State State of Campeche, Mexico. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2009**, *51*, 87–94.
72. Van Wynsberghe, N.R.; Canto-Lara, S.B.; Mian-Centeno, A.G.; Itza-Ortiz, M.F.; Andrade-Narvaez, F.J. Retention of *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* in naturally infected rodents from the State of Campeche, Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2000**, *95*, 595–600.
73. Kerr, S.F.; McHugh, C.P.; Dronen, N.O., Jr. Leishmaniasis in Texas: Prevalence and seasonal transmission of *Leishmania mexicana* in *Neotoma micropus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **1995**, *53*, 73–77.
74. Raymond, R.W.; McHugh, C.P.; Witt, L.R.; Kerr, S.F. Temporal and Spatial Distribution of *Leishmania mexicana* Infections in a Population of *Neotoma micropus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2003**, *98*, 171–180, doi:10.1590/S0074-02762003000200002.
75. Canto-Lara, S.B.; Van Wynsberghe, N.R.; Vargas-González, A.; Ojeda-Farfán, F.F.; Andrade-Narváez, F.J. Use of Monoclonal Antibodies for the Identification of *Leishmania* Spp. Isolated from Humans and Wild Rodents in the State of Campeche, Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1999**, *94*, 305–309, doi:10.1590/S0074-02761999000300005.
76. McHug, C.P.; Thies, M.L.; Melby, P.C.; Yantis, L.D.; Raymond, R.W.; Villegas, M.D.; Kerr, S.F. Short report: A disseminated infection of *Leishmania mexicana* in an eastern woodrat, *Neotoma floridana*, collected in Texas. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **2003**, *69*, 470–472.
77. Chable-Santos, J.B.; Van Wynsberghe, N.R.; Canto-Lara, S.B.; Andrade-Narvaez, F.J. Isolation of *Leishmania* (*L.*) *mexicana* from Wild Rodents and Their Possible Role in the Transmission of Localized Cutaneous Leishmaniasis in the State of Campeche, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1995**, *53*, 141–145, doi:10.4269/ajtmh.1995.53.141.
78. Kipp, E.J.; Mariscal, J.; Armijos, R.X.; Weigel, M.; Waldrup, K. Genetic Evidence of Enzootic Leishmaniasis in a Stray Canine and Texas Mouse from Sites in West and Central Texas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2016**, *111*, 652–654, doi:10.1590/0074-02760160225.
79. Muñoz-García, C.I.; Sánchez-Montes, S.; Villanueva-García, C.; Romero-Callejas, E.; Díaz-López, H.M.; Gordillo-Chávez, E.J.; Martínez-Carrasco, C.; Berriatua, E.; Rendón-Franco, E. The Role of Sloths and Anteaters as *Leishmania* Spp. Reservoirs: A Review and a Newly Described Natural Infection of *Leishmania mexicana* in the Northern Anteater. *Parasitol. Res.* **2019**, *118*, 1095–1101, doi:10.1007/s00436-019-06253-6.
80. Rovirosa-Hernández, M.J.; Cortes-Ortíz, L.; García-Orduña, F.; Guzmán-Gómez, D.; López-Monteon, A.; Caba, M.; Ramos-Ligonio, A. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana* in free-ranging howler monkeys in southeastern Mexico. *Am. J. Primatol*. **2013**, *75*, 161–169, doi:10.1002/ajp.22094.
81. Courtenay, O.; Quinnell, R.J.; Garcez, L.M.; Dye, C. Low Infectiousness of a Wildlife Host of *Leishmania Infantum*: The Crab-Eating Fox Is Not Important for Transmission. *Parasitology* **2002**, *125*, 407–414, doi:10.1017/S0031182002002238.
82. Almeida Curi, N.H. de; Miranda, I.; Talamoni, S.A. Serologic Evidence of *Leishmania* Infection in Free-Ranging Wild and Domestic Canids around a Brazilian National Park. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2006**, *101*, 99–101, doi:10.1590/s0074-02762006000100019.
83. Gomes, R.B.; Mendonca, I.L.; Silva, V.C.; Ruas, J.; Silva, M.B.; Cruz, M.S.P.; Barral, A.; Costa, C.H.N. Antibodies against *Lutzomya longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *101*, 127–133.

84. Luppi, M.M.; Malta, M.C.C.; Silva, T.M.A.; Silva, F.L.; Motta, R.O.C.; Miranda, I.; Ecco, R.; Santos, R.L. Visceral Leishmaniasis in Captive Wild Canids in Brazil. *Vet. Parasitol.* **2008**, *155*, 146–151, doi:10.1016/j.vetpar.2008.04.024.
85. Jusi, M.M.G.; Starke-Buzetti, W.A.; de Sousa Oliveira, T.M.F.; da Silva Tenório, M.; de Oliveira de Sousa, L.; Zacarias Machad, R. Molecular and Serological Detection of *Leishmania* spp. in Captive Wild Animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. *Rev. Bras. de Parasitol. Veterinária* **2011**, *20*, 219–222.
86. Richini-Pereira, V.B.; Marson, P.M.; Hayasaka, E.Y.; Victoria, C.; da Silva, R.C.; Langoni, H. Molecular Detection of *Leishmania* Spp. in Road-Killed Wild Mammals in the Central Western Area of the State of São Paulo, Brazil. *J. Ven. Anim. Tox. Trop. Dis.* **2014**, *20*, 1–7, doi:10.1186/1678-9199-20-27.
87. Almeida, J.C.; Melo, R.P.B.; Kim, P.C.P.; Guerra, N.R.; Alves, L.C.; Costa, D.F.; Alves, C.J.; Porto, W.J.N.; Mota, R.A. Molecular and Serological Investigation of Infectious Diseases in Captive and Free-Range Crab-Eating Fox (*Cerdocyon thous*-Linnaeus, 1776) from Northeastern Brazil. *Acta Parasitol.* **2018**, *63*, 184–189, doi:10.1515/ap-2018-0021.
88. de Almeida Curi, N.H.; Coelho, C.M.; Malta, M.C.C.; Magni, L.M.V.; Sábato, M.A.L.; Araújo, A.S.; Lobato, Z.I.P.; Santos, J.L.C.; Santos, H.A.; Ragozo, A.A.M.; et al. Pathogens of Wild Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in Brazil. *J. Wildl. Dis.* **2012**, *48*, 1052–1056, doi:10.7589/2011-10-304.
89. Mol, J.P.S.; Soave, S.A.; Turchetti, A.P.; Pinheiro, G.R.G.; Pessanha, A.T.; Malta, M.C.C.; Tinoco, H.P.; Figueiredo, L.A.; Gontijo, N.F.; Paixão, T.A.; et al. Transmissibility of *Leishmania infantum* from Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*) and Bush Dogs (*Speothos venaticus*) to *Lutzomyia longipalpis*. *Vet. Parasitol.* **2015**, *212*, 86–91, doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.024.
90. Tolentino, N.; Pinheiro, G.R.G.; Ottino, J.; Rodrigues de Oliveira, A.; Coelho, C.M.; Tinoco, H.P.; Fujiwara, R.T.; Santos, R.L.; Ribeiro, V.M. Serological Evidence of *Leishmania* Infection by Employing ELISA and Rapid Tests in Captive Felids and Canids in Brazil. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* **2019**, *17*, 100308, doi:10.1016/j.vprsr.2019.100308.
91. Lombardi, M.C.; Turchetti, A.P.; Tinoco, H.P.; Pessanha, A.T.; Soave, S.A.; Malta, M.C.C.; Paixão, T.A.; Santos, R.L. Diagnosis of *Leishmania Infantum* Infection by Polymerase Chain Reaction in Wild Mammals. *Pesquisa Vet. Brasil.* **2014**, *34*, 1243–1246, doi:10.1590/S0100-736X2014001200017.
92. Paiz, L.M., Fornazari, F.; Menozzi, B. Serological Evidence of Infection by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (Synonym: *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*) in Free-Ranging Wild Mammals in a Nonendemic Region of the State of Sa˜o Paulo, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *11*, 667–673, doi:10.1089/vbz.2015.1806.
93. Dahroug, M.A.; Almeida, A.B.; Sousa, V.R.; Dutra, V.; Turbino; N.C., Nakazato, L.; de Souza, R.L. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in captive wild felids in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. **2010**, *104*, 73–74.
94. Dahroug, M.A.; Almeida, A.B.; Sousa, V.R.; Dutra, V.; Guimarães, L.D.; Soares, C.E.; Nakazato, L.; de Souza, R.L. The first case report of *Leishmania* (*leishmania*) *chagasi* in *Panthera leo* in Brazil. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. **2011**, *3*, 249–250, doi:10.1016/S2221-1691(11)60036.
95. Rezende, M.B. de; Herrera, H.M.; Carvalho, C.M.E.; Carvalho Anjos, E.A.; Ramos, C.A.N.; de Araújo, F.R.; Torres, J.M.; de Oliveira, C.E. Detection of *Leishmania* spp. in Bats from an Area of Brazil Endemic for Visceral Leishmaniasis. *Trans. Emerg. Dis.* **2017**, 64, e36–e42, doi:10.1111/tbed.12597.
96. Medkour, H.; Davoust, B.; Dulieu, F.; Maurizi, L.; Lamour, T.; Marié, J.L.; Mediannikov, O. Potential animal reservoirs (dogs and bats) of human visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in French Guiana. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, 13, e0007456, doi:10.1371/journal.pntd.0007456.
97. De Lima, H.; Rodriguez, N.; Barrios, M.A.; Avila, A.; Canizales, I.; Gutierrez, S. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2008**, *103*, 412–414.
98. Pereira da Costa, A.; Costa, F.B.; Soares, H.S.; Ramirez, D.G.; de Carvalho, E.T.K.; Gennari, S.M.; Marcili, A. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* Infection in Wild Mammals from Maranhão State, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. **2015**, *15*, 656–666, doi:10.1089/vbz.2015.1771.
99. de Araujo, V.A.; Boite, M.C.; Cupolillo, E.; Jansen, A.M.; Roque, A.L. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Para State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. *Parasitology* **2013**, *140*, 455–460.
100. Humberg, R.M.; Oshiro, E.T.; Cruz, M.S.; Ribolla, P.E.; Alonso, D.P.; Ferreira, A.M.; Bonamigo, R.A.; Tasso, N., Jr.; de Oliveira, A.G. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *87*, 470–472.
101. Santiago, M.E.; Vasconcelos, R.O.; Fattori, K.R.; Munari, D.P.; Michelin, A.F.; Lima, V.M. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (Sao Paulo, Brazil). *Vet. Parasitol*. **2007**, *150*, 283–290.
102. Carreira, J.C.; da Silva, A.V.; de Pita, P.D.; Brazil, R.P. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasit. Vectors* **2012**, *5*, 111.
103. Viettri, M.; Herrera, L.; Aguilar, C.M.; Morocoima, S.; Reyes, J.; Lares, M.; Lozano-Arias, D.; García-Alzate, R.; Chacón, T.; Feliciangeli, M.D.; et al. Molecular Diagnosis of *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania* Spp. Coinfection in Domestic, Peridomestic and Wild Mammals of Venezuelan Co-Endemic Areas. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* **2018**, *14*, 123–130, doi:10.1016/j.vprsr.2018.10.002.
104. Corredor, A.; Gallego, J.F.; Tesh, R.B.; Pelaez, D.; Diaz, A., Montilla; M.; Palau, M.T. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. **1989**, *83*, 195–195.
105. Travi, B.L.; Jaramillo, C.; Montoya, J.; Segura, I.; Zea, A.; Goncalves, A.; Velez, I.D. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **1994**, *50*, 557–565.

106. Travi, B.L.; Osorio, Y.; Becerra, M.T.; Adler, G.H. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. **1998**, *92*, 275–278.
107. Zulueta, A.M.; Villarroel, E.; Rodriguez, N.; Feliciangeli, M.D.; Mazzarri, M.; Reyes, O.; Rodriguez, V.; Centeno, M.; Barrios, R.M.; Ulrich, M. Epidemiologic Aspects of American Visceral Leishmaniasis in an Endemic Focus in Eastern Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *61*, 945–950, doi:10.4269/ajtmh.1999.61.945.
108. Malta, M.C.; Tinoco, H.P.; Xavier, M.N.; Vieira, A.L.; Costa, E.A.; Santos, R.L. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Vet. Parasitol*. **2010**, *169*, 193–197.
109. Paiz, L.M.; Motoie, G.; Richini-Pereira, V.B.; Langoni, H.; Menozzi, B.D.; Tolezano, J.E.; Donalisio, M.R. Antibodies and molecular detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in samples of free-ranging marmosets (Primates: Callicitrichidae: *Callithrix* spp.) in an area of canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2019**, *19*, 249–254.
110. Moreno, E.S.; Sabioni, L.A.; Moraes de Seixas, M.M.; de Souza Filho, J.A.; Marcelino, A.P. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro. Evidence of a Sylvatic Enzootic Cycle of *Leishmania infantum* in the State of Amapá, Brazil. *Rev. Da Soc. Brasil. Med. Trop.* **2020**, *53*, 13–15, doi:10.1590/0037-8682-0169-2019.
111. Rosypal, A.C.; Tripp, S.; Lewis, S.; Francis, J.; Stoskopf, M.K.; Larsen, R.S.; Lindsay, D. Survey of antibodies to *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in gray and red fox populations from North Carolina and Virginia. *J. Parasitol.* **2010**, *96*, 1230–1231.
112. Rosypal, A.C.; Alexander, A., Byrd, D.; Weaver, M.; Stewart, R.; Gerhold, R.; Houston, A.; vanWhy, K.; Dubey, J.P. Survey of antibodies to *Leishmania* spp. in wild canids from Pennsylvania and Tennesee. *J. Zoo Wildl. Med*. **2013**, *44*, 1131–1133.
113. Millán, J.; Travaini, A.; Zanet, S.; López-Bao, J.V.; Trisciuoglio, A.; Ferroglio, E.; Rodríguez, A. Detection of *Leishmania* DNA in Wild Foxes and Associated Ticks in Patagonia, Argentina, 2000 Km South of Its Known Distribution Area. *Parasit. Vectors* **2016**, *9*, 1–7, doi:10.1186/s13071-016-1515-4.
114. Reis, F.; Minuzzi-Souza Mariana, T.T.C.; Renata, N.; De Morais, I.O.B.; De Lima, T.M.; Hecht, M.; Nitz, N.; Gurgel-Gonçalves, R. Trypanosomatid Infections in Captive Wild Mammals and Potential Vectors at the Brasilia Zoo, Federal District, Brazil. *Vet. Med. Sci.* **2020**, *6*, 248–256, doi:10.1002/vms3.216.
115. Brandao, E.M.V.; Xavier, S.C.C.; Rocha, F.L.; Lima, C.F.M.; Roque, A.L.R. Wild and Domestic Canids and Their Interactions in the Transmission Cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in an Area of the Brazilian Cerrado. *Pathogens* **2020**, *9*, 1–19, doi:10.3390/pathogens9100818.
116. Porfirio, F.E.O.; Santos, F.M.; Carvalho de Macedo, G.; Barreto, W.T.G.; Campos, J.B.V.; Meyers, A.C.; André, M.R.; Perles, L.; Oliveira, C.E.; ChagasXavier, S.C.D.; et al. Maintenance of *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* and *Leishmania* spp. by Domestic Dogs and Wild Mammals in a Rural Settlement in Brazil-Bolivian Border. *Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl.* **2018**, *7*, 398–404, doi:10.1016/j.ijppaw.2018.10.004.
117. Lima, V.M.F.; Fattori, F.R.; Apargecida de Fátima Michelin, A.F.; Nogueira, F.S.; de Oliveira e Souza, L. Evidence of *Leishmania* spp. Antibodies and DNA in Bush Dogs (*Speothos venaticus*) in Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.* **2009**, *40*, 91–94.
118. Johnson, R.N.; Young, D.G.; Butler, J.F.; Bogaert-Diaz, H. Possible Determination of the Vector and Reservoir of Leishmaniasis in the Dominican Republic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1992**, *46*, 282–287, doi:10.4269/ajtmh.1992.46.282.
119. Medkour, H.; Davoust, B.; Levasseur, A.; Mediannikov, O. Molecular Evidence of *Leishmania infantum* and *Leishmania guyanensis* in Red Howler Monkey (*Alouatta seniculus*) from French Guiana. *Vector Borne Zoonotic Dis*. **2019**, *12*, 896–900.
120. Babuadze, G.; Alvar, J.; Argaw, D.; de Koning, H.P.; Iosava, M.; Kekelidze, M.; Tsertsvadze, N.; Tsereteli, D.; Chakhunashvili, G.; Mamatsashvili, T.; et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Georgia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, 1–8, doi:10.1371/journal.pntd.0002725.
121. Mitková, B.; Hrazdilová, K.; Amico, G.D.; Duscher, G.G.; Suchentrunk, F.; Forejtek, P.; Gherman, M.; Matei, I.A., Ionică, A.M.; Daskalaki, A.A.; et al. Eurasian Golden Jackal as Host of Canine Vector-Borne Protists. *Parasit. Vectors* **2017**, 10, 1–11, doi:10.1186/s13071-017-2110-z.
122. Mohebali, M.; Arzamani, K.; Zarei, Z.; Akhoundi, B.; Hajjaran, H.; Raeghi, S.; Heidari, Z.; Motavalli-Haghi, S.M.; Elikaee, S.; Mousazadeh-Mojarrad, A.; et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Wild Canines (Fox, Jackal and Wolf) in Northeastern Iran Using Parasitological, Serological, and Molecular Methods. *J. Arthopod Borne Dis.* **2016**, *10*, 538–545.
123. Talmi-Frank, D.; Kedem-Vaanunu, N.; King, R.; Bar-Gal, G.K.; Edery, N.; Jaffe, C.L.; Baneth, G. *Leishmania tropica* Infection in Golden Jackals and Red Foxes, Israel. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1973–1975, doi:10.3201/eid1612.100953.
124. Beck, A.; Beck, R.; Kusak, J.; Gudan, A.; Martinkovic, F.; Artukovic, B.; Hohšteter, M.; Huber, D.; Marinculic, A.; Grabarevic, Z. A Case of Visceral Leishmaniosis in a Gray Wolf (*Canis lupus*) from Croatia. *J. Wildl. Dis.* **2008**, *44*, 451–456, doi:10.7589/0090-3558-44.2.451.
125. Sobrino, R.; Ferroglio, E.; Oleaga, A.; Romano, A.; Millan, J.; Revilla, M.; Arnal, M.C.; Trisciuoglio, A.; Gortázar, C. Characterization of Widespread Canine Leishmaniasis among Wild Carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* **2008**, *155*, 198–203, doi:10.1016/j.vetpar.2008.05.003.
126. Oleaga, A.; Vicente, J.; Ferroglio, E.; Pegoraro de Macedo, M.R.; Casais, R.; Del Cerro, A.; Espí, A.; García, E.J.; Gortázar, C. Concomitance and Interactions of Pathogens in the Iberian Wolf (*Canis lupus*). *Res. Vet. Sci.* **2015**, *101*, 22–27, doi:10.1016/j.rvsc.2015.05.010.
127. Oleaga, A.; Zanet, S.; Espí, A.; Raquel, M.; De Macedo, P.; Gortázar, C.; Ferroglio, E. *Leishmania* in Wolves in Northern Spain: A Spreading Zoonosis Evidenced by Wildlife Sanitary Surveillance. *Vet. Parasitol.* **2018**, *255*, 26–31, doi:10.1016/j.vetpar.2018.03.015.

128. Risueño, J.; Ortuño, M.; Pérez-Cutillas, P.; Goyena, E.; Maia, C.; Cortes, S.; Campino, L.; BernalL, J.; Muñoz, C.; ArcenillasI, L.; et al. Epidemiological and Genetic Studies Suggest a Common *Leishmania infantum* Transmission Cycle in Wildlife, Dogs and Humans Associated to Vector Abundance in Southeast Spain. *Vet. Parasitol.* **2018**, *259*, 61–67, doi:10.1016/j.vetpar.2018.05.012
129. Ortuño, M.; Latrofa, M.S.; Iborra, M.A.; Pérez, P.; Bernal, L.J.; Risueño, J.; Muñoz, C.; Bernal, A.; Sánchez-Lopez, P.F.; Segovia, M.; et al. Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships between *Leishmania infantum* from Dogs, Humans and Wildlife in South - East Spain. *Zoonoses Public Health* **2019**, *66*, 961–973, doi:10.1111/zph.12646.
130. Sastre, N.; Francino, O.; Ramírez, O.; Enseñat, C.; Sánchez, A.; Altet, L. Detection of *Leishmania infantum* in Captive Wolves from Southwestern Europe. *Vet. Parasitol.* **2008**, *158*, 117–120, doi:10.1016/j.vetpar.2008.08.008.
131. Muñoz-Madrid, R.; Belinchón-Lorenzo, S.; Iniesta, V.; Fernández-Cotrina, J.; Parejo, J.C.; Serrano, F.J.; Monroy, I.; Baz, V.; Gómez-Luque, A.; Gómez-Nieto, L.C. First Detection of *Leishmania infantum* Kinetoplast DNA in Hair of Wild Mammals: Application of QPCR Method to Determine Potential Parasite Reservoirs. *Acta Trop.* **2013**, *128*, 706–709, doi:10.1016/j.actatropica.2013.08.009.
132. Battisti, E.; Zanet, S.; Khalili, S.; Trisciuoglio, A.; Hertel, B.; Ferroglio, E. Molecular Survey on Vector-Borne Pathogens in Alpine Wild Carnivorans. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 1–9, doi:10.3389/fvets.2020.00001.
133. Del Río, L.; Chitimia, L.; Cubas, A.; Victoriano, I.; De la Rúa, P.; Gerrikagoitia, X.; Barral, M.; Muñoz-García, C.I.; Goyena, E.; García-Martínez, D.; et al. Evidence for Widespread *Leishmania infantum* Infection among Wild Carnivores in *L. infantum* Periendemic Northern Spain. *Prev. Vet. Med.* **2014**, *113*, 430–435, doi:10.1016/j.prevetmed.2013.12.001.
134. Millán, J.; Zanet, S.; Gomis, M.; Trisciuoglio, A.; Negre, N.; Ferroglio, E. An Investigation into Alternative Reservoirs of Canine Leishmaniasis on the Endemic Island of Mallorca (Spain). *Trans. Emerg. Dis.* **2011**, *58*, 352–357, doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01212.x.
135. Gomes, J.; Rocha, H.; Carvalho, C.; Bandeira, V.; Fonseca, C.; Rosalino, L.M.; Cunha, M.V. Molecular Detection and Characterization of *Leishmania infantum* in Free-Ranging Egyptian Mongoose (*Herpestes ichneumon*). *Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl.* **2020**, *11*, 158–162, doi:10.1016/j.ijppaw.2020.02.001.
136. Tsakmakidis, G.; Pavlou, C.; Tamvakis, A.; Papadopoulos, T.; Christodoulou, V.; Angelopoulou, K.; Dovas, C.; Antoniou, M.; Anastasakis, C.; Diakou, A. *Leishmania* infection in lagomorphs and minks in Greece. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep*. **2019**, 16. 100279, doi:10.1016/j.vprsr.2019.100279.
137. Alcover, M.M.; Ribas, A.; Guillén, M.C.; Berenguer, D.; Tomás-Pérez, M.; Riera, C.; Fisa, R. Wild Mammals as Potential Silent Reservoirs of *Leishmania infantum* in a Mediterranean Area. *Prev. Vet. Med.* **2020**, 175, doi:10.1016/j.prevetmed.2019.104874.
138. Calavera, M.A.; Latta, R.; Laricchiuta, P.; Passantino, G.; Abramo, F.; Mendoza-Roldan, J.A.; Otranto, D.; Zatelli, A. Clinical, haematological and biochemical findings in tigers infected by *Leishmania infantum*. *BMC Vet. Res*. **2020**, 214, doi:10.1186/s12917-020-02419-y.
139. Mancianti, F.; Mignone, W.; Galastri, F. Serologic Survey for Leishmaniasis in Free-Living Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. *J. Wildl. Dis.* **1994**, *30*, 454–456, doi:10.7589/0090-3558-30.3.454.
140. Criado-Fornelio, A.; Gutierrez-Garcia, L.; Rodriguez-Caabeiro, F.; Reus-Garcia, E.; Roldan-Soriano, M.A.; Diaz-Sanchez, M.A. A Parasitological Survey of Wild Red Foxes (*Vulpes vulpes*) from the Province of Guadalajara, Spain. *Vet. Parasitol.* **2000**, *92*, 245–251, doi:10.1016/S0304-4017(00)00329-0.
141. Dipineto, L.; Manna, L.; Baiano, A.; Gala, M.; Fioretti, A.; Gravino, A.E.; Menna, L.F. Presence of *Leishmania infantum* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Southern Italy. *J. Wildl. Dis.* **2007**, *43*, 518–520, doi:10.7589/0090-3558-43.3.518.
142. Davoust, B.; Mary, C.; Marié, J.L. Detection of *Leishmania* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) from Southeastern France Using Real-Time Quantitative PCR. *J. Wildl. Dis.* **2014**, *50*, 130–132.
143. Karayiannis, S.; Ntais, P.; Messaritakis, I.; Tsirigotakis, N.; Dokianakis, E.; Antoniou, M. Detection of *Leishmania infantum* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Central Greece. *Parasitology* **2015**, *142*, 1574–1578, doi:10.1017/S0031182015001158.
144. Lledó, L.; Giménez-Pardo, C.; Saz, J.V.; Serrano, J.L. Wild Red Foxes (*Vulpes vulpes*) as Sentinels of Parasitic Diseases in the Province of Soria, Northern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*. **2015**, *15*, 743–749, doi:10.1089/vbz.2014.1766.
145. Abbate, L.M.; Arfuso, F.; Napoli, E.; Gaglio, G.; Giannetto, S.; Latrofa, M.S.; Otranto, D.; Brianti, E. *Leishmania infantum* in Wild Animals in Endemic Areas of Southern Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *67*, 101374, doi:10.1016/j.cimid.2019.101374.
146. Medkour, H.; Laidoudi, Y.; Marié, J.L.; Fenollar, F.; Davoust, B.; Mediannikov, O. Molecular Investigation of Vector-Borne Pathogens in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) from Southern France. *J. Wildl. Dis.* **2020**, *56*, 837–850, doi:10.7589/2019-09-234.
147. Montoya, A.; Pérez De Quadros, L.; Mateo, M.; Hernández, L.; Gálvez, R.; Alcántara, G.; Checa, R.; Jiménez, M.Á.; Chicharro, C.; Israel Cruz, G.M. *Leishmania infantum* infection in Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in a spanish wildlife park. *J. Zoo Wildl. Med.* **2016**, *47*, 586–593, doi:10.1638/2014-0216.1.
148. Miró, G.; Troyano, A.; Montoya, A.; Fariñas, F.; Fermín, M.L.; Flores, L.; Rojo, C.; Checa, R.; Gálvez, R.; Marino, V.; et al. First report of *L. infantum* infection in the endangered orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Madrid, Spain. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 1–7, doi: 10.1186/s13071-018-2772-1.
149. Azami-Conesa, I.; Martínez-Díaz, R.A.; González, F.; Gómez-Muñoz, M.T. First Detection of *Leishmania infantum* in Common Urban Bats *Pipistrellus pipistrellus* in Europe. *Res. Vet. Sci.* **2020**, *132*, 172–176, doi:10.1016/j.rvsc.2020.06.019.
150. Chemkhi, J.; Souguir, H.; BelHadjAli, I.; Driss, M.; Guizani, I.; Guerbouj, S. Natural Infection of Algerian Hedgehog, *Atelerix algirus* (Lereboullet 1842) with *Leishmania* Parasites in Tunisia. *Acta Trop.* **2015**, *150*, 42–51, doi:10.1016/j.actatropica.2015.06.009.

151. Souguir-Omrani, H.; Chemkhi, J.; Fathallah-Mili, A.; Saadi-BenAoun, Y.; BelHadjAli, I.; Guizani, I.; Guerbouj, S. *Paraechinus aethiopicus* (Ehrenberg 1832) and *Atelerix algirus* (Lereboullet 1842) Hedgehogs: Possible Reservoirs of Endemic Leishmaniases in Tunisia. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *63*, 219–230, doi:10.1016/j.meegid.2018.05.029.
152. Ruiz- Fons, F.; Ferroglio, E.; Gortázar, C. *Leishmania infantum* in Free-Ranging Hares, Spain, 2004–2010. *Eurosurveillance* **2013**, *30*, 80–81, doi:10.1016/j.pt.2019.10.006.
153. Ortega, M.V.; Moreno, I.; Domínguez, M.; de la Cruz, M.L.; Martín, A.B.; Rodríguez-Bertos, A.; López, R.; Navarro, A.; González, S.; Mazariegos, M.; et al. Application of a Specific Quantitative Real-Time PCR (QPCR) to Identify *Leishmania infantum* DNA in Spleen, Skin and Hair Samples of Wild Leporidae. *Vet. Parasitol.* **2017**, *243*, 92–99, doi:10.1016/j.vetpar.2017.05.015.
154. Ortega-García, M.V.; Salguero, F.J.; Rodríguez-Bertos, A.; Moreno, I.; García, N.; García-Seco, T.; Torre, G.L.; Domínguez, L.; Domínguez, M.A Pathological Study of *Leishmania infantum* Natural Infection in European Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and Iberian Hares (*Lepus granatensis*). *Trans. Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 2474–2781, doi:10.1111/tbed.13305.
155. Ebani, V.V.; Poli, A.; Rocchigiani, G.; Bertelloni, F.; Nardoni, S.; Papini, R.A.; Mancianti, F. Serological Survey on Some Pathogens in Wild Brown Hares (*Lepus europaeus*) in Central Italy. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2016**, *9*, 465–469, doi:10.1016/j.apjtm.2016.03.032.
156. Rocchigiani, G.; Ebani, V.V.; Nardoni, S.; Bertelloni, F.; Bascherini, A.; Leoni, A.; Mancianti, F.; Poli, A. Molecular Survey on the Occurrence of Arthropod-Borne Pathogens in Wild Brown Hares (*Lepus europaeus*) from Central Italy. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *59*, 142–147, doi:10.1016/j.meegid.2018.02.005.
157. Chitimia, L.; Muñoz- García, C.I.; Sánchez-Velasco, D.; Lizana, V.; Del Río, L.; Murcia, L.; Fisa, R.; Rierad, C.; Giménez-Fonte, P.; Jiménez-Montalbán, P.; et al. Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a Feature of Canines Only? A Study of Natural Infection in Wild Rabbits, Humans and Dogs in Southeastern Spain. *Vet. Parasitol.* **2011**, *181*, 12–16, doi:10.1016/j.vetpar.2011.04.016.
158. Díaz-Sáez, V., Merino-Espinosa, G.; Morales-Yuste, M.; Corpas-López, V.; Pratlong, F.; Morillas-Márquez, F.; Martín-Sánchez, J. High Rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* Infection in Wild Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Sympatric and Syntrophic Conditions in an Endemic Canine Leishmaniasis Area: Epidemiological Consequences. *Vet. Parasitol.* **2014**, *202*, 119–127, doi:10.1016/j.vetpar.2014.03.029.
159. Navea-Pérez, H.M.; Díaz- Sáez, V.; Corpas- López, V.; Merino- Espinosa, G.; Morillas- Márquez, F.; Martín- Sánchez, J. *Leishmania infantum* in Wild Rodents: Reservoirs or Just Irrelevant Incidental Hosts? *Parasitol. Res.* **2015**, *114*, 2363–2370, doi:10.1007/s00436-015-4434-y.
160. Millán, J. Molecular Investigation of Vector-Borne Parasites in Wild Micromammals, Barcelona (Spain). *Parasitol. Res.* **2018**, *117*, 3015–3018.
161. Pourmohammadi, B.; Mohammadi-Azni, S.; Kalantari, M. Natural Infection of *Nesokia indica* with *Leishmania major* and *Leishmania infantum* Parasites in Damghan City, Northern Iran. *Acta Trop.* **2017**, *170*, 134–139, doi:10.1016/j.actatropica.2017.03.001.
162. Helhazar, M.; Leitão, J.; Duarte, A.; Tavares, L.; da Fonseca, I.P. Natural Infection of Synathropic Rodent Species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra-Portugal. *Parasit. Vectors* **2013**, *6*, 1–6.
163. Echchakery, M.; Chicharro, C.; Boussaa, S.; Nieto, J.; Carrillo, E.; Sheila, O.; Moreno, J.; Boumezzough, A. Molecular Detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in Rodent Species from Endemic Cutaneous Leishmaniasis Areas in Morocco. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 1–8, doi:10.1186/s13071-017-2398-8.
164. Ibrahim, E.A.; Al-Zahrani, M.A.; Al-Tuwaigri, A.S.; Al-Shammary, F.J.; Evans, D.A. *Leishmania* Infecting Man and Wild Animals in Saudi Arabia. 9. The Black Rat (*Rattus rattus*) a Probable Reservoir of Visceral Leishmaniasis in Gizan Province, South-West Saudi Arabia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1992**, *86*, 513–514, Available online: https://academic.oup.com/trstmh/article/86/5/513/1922532 (accessed on 25 February, 2021).
165. Zanet, S.; Sposimo, P.; Trisciuoglio, A.; Giannini, G.; Strumia, F.; Ferroglio, E. Epidemiology of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in *Rattus rattus* in Absence of Domestic Reservoir and Definitive Hosts. *Vet. Parasitol.* **2014**, *199*, 247–249, doi:10.1016/j.vetpar.2013.10.023.
166. Papadogiannakis, E.; Spanakos, G.; Kontos, V.; Menounos, P.G.; Tegos, N.; Vakalis, N. Molecular Detection of *Leishmania infantum* in Wild Rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoonoses Public Health* **2010**, *57*, 2009–2011, doi:10.1111/j.1863-2378.2009.01264.x.
167. Pourmohammadi, B.; Motazedian, M.H.; Kalantari, M. Rodent Infection with *Leishmania* in a New Focus of Human Cutaneous Leishmaniasis, in Northern Iran. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2008**, *102*, 127–133, doi:10.1179/136485908X252223.
168. Akhoundi, M.; Mohebali, M.; Asadi, M.; Mahmodi, M.R.; Amraei, K.; Mirzaei, A. Molecular Characterization of *Leishmania* spp. in Reservoir Hosts in Endemic Foci of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Iran. *Folia Parasitol.* **2013**, *60*, 218–224, doi:10.14411/fp.2013.024.
169. Masoumeh, A.; Kourosh, A.; Mohsen, K.; Hossein, M.M.; Qasem, A.; Djaefar, M.F.M.; Esmaeil, N.M.; Tahereh, D. Laboratory Based Diagnosis of Leishmaniasis in Rodents as the Reservoir Hosts in Southern Iran, 2012. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, 4, S575–S580, doi:10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0199.
170. Nezamzadeh-Ezhiyeh, H.; Mirhendi, H.; Jafari, R.; Veysi, A.; Rassi, Y.; Oshaghi, M.A.; Arandian, M.H.; Abdoli, H.; Bahrami, S.; Ramazani, A.R.Z.; et al. An Eco-Epidemiological Study on Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Central Iran. *Iran. J. Public Health* **2021**, *50*, 350–359, doi:10.18502/ijph.v50i2.5350.

171. Azizi, K.; Moemenbellah-Fard, M.D.; Fakoorziba, M.R.; Fekri, S. *Gerbillus nanus* (Rodentia: Muridae): A New Reservoir Host of *Leishmania major*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2011**, *105*, 431–437, doi:10.1179/1364859411Y.0000000036.
172. Kassahun, A.; Sadlova, J.; Benda, P.; Kostalova, T.; Warburg, A.; Hailu, A.; Baneth, G.; Volf, P.; Votypka, J. Natural Infection of Bats with *Leishmania* in Ethiopia. *Acta Trop.* **2015**, *150*, 166–170, doi:10.1016/j.actatropica.2015.07.024.
173. Rouhani, S.; Mirzaei, A.; Spotin, A.; Parvizi, P. Novel Identification of *Leishmania major* in *Hemiechinus auritus* and Molecular Detection of This Parasite in *Meriones libycus* from an Important Foci of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Iran. *J. Infect. Public Health* **2014**, *7*, 210–212]17, doi:10.1016/j.jiph.2013.12.002.
174. Pourmohammadi, B.; Mohammadi-Azni, S. Molecular Detection of *Leishmania major* in *Hemiechinus auritus*, A Potential Reservoir of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Damghan, Iran. *J. Arthropod Borne Dis.* **2019**, *13*, 334–343, doi:10.18502/jad.v13i3.1542.
175. Tomás-Pérez, M.; Khaldi, M.; Riera, C.; Mozo-León, D.; Ribas, A.; Hide, M.; Barech, G.; Benyettoub, M.; Seghirib, K.; Doudou, S.; et al. First Report of Natural Infection in Hedgehogs with *Leishmania major*, a Possible Reservoir of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Algeria. *Acta Trop.* **2014**, *135*, 44–49, doi:10.1016/j.actatropica.2014.03.018.
176. Gicheru, M.M.; Jeneby, M.M.; Macharia, J.C.; Carlsson, H.E.; Suleman, M.A. Prevalence of Antibodies and Cell Mediated Immune Response against *Leishmania major* in Feral Nonhuman Primates from Kenya. *Acta Trop.* **2009**, *109*, 136–140, doi:10.1016/j.actatropica.2008.09.020.
177. Moemenbellah-Fard, M.D.; Kalantari, M.; Rassi, Y.; Javadian, E. The PCR- Based Detection of *Leishmania major* Infections in *Meriones libycus* (Rodentia: Muridae) from Southern Iran. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2003**, *97*, 865–873, doi:10.1179/000349803225002651.
178. Najafzadeh, N.; Sedaghat, M.M., Sultan, S.S.; Spotin, A.; Zamani, A.; Taslimian, R.; Yaghoubinezhad, A.; Parvizi, P. The Existence of Only One Haplotype of *Leishmania major* in the Main and Potential Reservoir Hosts of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis Using Different Molecular Markers in a Focal Area in Iran. *Revista Soc. Brasil. Med. Trop.* **2014**, *47*, 599–606, doi:10.1590/0037-8682-0164-2014.
179. Faiman, R.; Abbasi, I.; Jaffe, C.; Motro, Y.; Nasereddin, A.; Schnur, L.F.; Torem, M.; Pratlong, F.; Dedet, J.P.; Warburg, A. A Newly Emerged Cutaneous Leishmaniasis Focus in Northern Israel and Two New Reservoir Hosts of *Leishmania major*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2058, doi:10.1371/journal.pntd.0002058.
180. Kassahun, A.; Sadlova, J.; Dvorak, V.; Kostalova, T.; Rohousova, I.; Frynta, D.; Aghova, T.; Yasur-Landaud, D.; Lemma, W.; Hailu, A.; et al. Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian Wild Rodents. *Acta Trop.* **2015**, *145*, 39–44, doi:10.1016/j.actatropica.2015.02.006.
181. Massamba, N.N.; Mutinga, M.J.; Kamau, C.C. Characterisation of *Leishmania* Isolates from Laikipia District, Kenya. *Acta Trop.* **1998**, *71*, 293–303, doi:10.1016/S0001-706X(98)00071-0.
182. Doha, S.A.; Shehata, M.G.; Fahmy, A.R.; Samy, A.M. Natural and Experimental Evidence of Viscerotropic Infection Caused by *Leishmania tropica* from North Sinai, Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **2014**, *44*, 425–434, doi:10.12816/0006481.
183. Mukhtar, M.M.; Sharief, A.H.; El Saffi, S.H.; Harith, A.E.; Higazzi, T.B.; Adam, A.M.; Abdalla, H.S. Detection of Antibodies to *Leishmania donovani* in Animals in a Kala-Azar Endemic Region in Eastern Sudan: A Preliminary Report. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *94*, 33–36, doi:10.1016/S0035-9203(00)90429-2.
184. Tsokana, C.N.; Sokos, C.; Giannakopoulos, A.; Mamuris, Z.; Birtsas, P.; Papaspyropoulos, K.; Valiakos, G.; Spyrou, V.; Lefkaditis, M.; Chatzopoulos, D.C. et al. First Evidence of *Leishmania* Infection in European Brown Hare (*Lepus europaeus*) in Greece: GIS Analysis and Phylogenetic Position within the *Leishmania* spp. *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 313–321, doi:10.1007/s00436-015-4749-8.
185. Morsy, T.A.; Al-Dakhil, M.A.; El-Bahrawy, A.F. Natural *Leishmania* infection in sand cats captured in Riyadh district, Saudi Arabia. J. *Egypt. Soc. Parasitol*. **1999**, *29*, 69–74, PMID: 12561884.
186. Morsy, T.A.; el Shazly, A.M.; el Kady, G.A.; Sabry, A.H.; Handousa, A.A.; Ragheb, D.A.; Kotb, M.M. Natural *Leishmania* infections in two stray dogs and two *Gerbillus pyramidum* in Dakahlia Governorate, Egypt. *J. Egypt Soc. Parasitol*. **1994**, *24*, 383–394.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Wildlife as a sentinel for pathogen introduction in non-endemic areas: Is *Leishmania tropica* circulating in wildlife in Spain?

Authors: Iris Azami-Conesa[1,2]; Pablo Matas Méndez[3]; Paula Pérez-Moreno[1]; Javier Carrión[1], J.M. Alunda[1], Marta Mateo Barrientos*[4]; María Teresa Gómez-Muñoz*[1]

Affiliations

1. Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Sciences, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain

2. Universidad Europea de Madrid. Faculty of Biomedical and Health Sciences. Department of Pharmacy and Nutrition, Villaviciosa de Odón, Madrid, Spain.

3. Faculty of Veterinary Sciences, University Alfonso X el Sabio, Villanueva de la Cañada, Madrid, Spain.

4. Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain.

* These authors contributed equally to this work and share last authorship.

Correspondence: María Teresa Gómez Muñoz (mariateg@ucm.es) and Marta Mateo Barrientos (mmateo14@ucm.es).

Keywords: Wildcat, *Leishmania tropica*, Spain, First description, autochthonous; Iberian Peninsula; PCR; genotyping.

Abstract

Background

Leishmaniasis is a global arthropod-borne zoonotic disease of chronic course and cutaneous, mucocutaneous, and visceral clinical manifestations. In the Iberian Peninsula, only *Leishmania infantum* has been reported, although other species of *Leishmania*, such as *L. tropica* and *L. major*, are present in surrounding countries.

Aim

The aim of this work is to analyse the occurrence of *Leishmania* spp. infection in wildcats as sentinels, including their genotypic characterization.

Methods

Necropsies of 18 roadkill wildcats were carried out. Samples from ear skin and spleen were taken, and DNA isolation and PCR analysis of the highly sensitive *SSUrDNA* target were conducted. Subsequent PCR tests were conducted using more specific targets for *Leishmania* species determination: *hsp70* and *ITS1*Positive samples were sequenced, and phylogenetic trees were constructed.

Results

Seven out of 18 wildcats were found positive to *Leishmania* spp. in ear skin; of them, only two were positive in spleen samples. . Based on the *hsp70* and *ITS1* sequences, one animal was found to be infected solely with *L. tropica* in ear skin samples, while two cats were found to be infected with *L. infantum* in both ear and spleen. Another animal was found to be co-infected with *L.*

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

infantum and *L. tropica* in ear skin. The *Leishmania* species could not be determined in three cats as the targeted *SSUrDNA* is only specific to the genus.

Conclusions

This is the first report of autochthonous *L. tropica* infection in the Iberian Peninsula. Health care professionals, including physicians, dermatologist and veterinarians must be aware of this for a correct diagnosis, treatment, and management of possible co-infections.

Introduction

Leishmaniasis is a global zoonotic disease transmitted by the bite of phlebotomine insects, with more than 1,000,000 new cases diagnosed annually in 92 endemic countries [(1)]. Clinical presentation in humans is variable and includes cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL), visceral (VL), and Post Kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). The disease is caused by several species of *Leishmania*, with *L. donovani* complex, *L. major* and *L. tropica* complex being the most frequent in Africa, Asia, southern Europe, South America, and the Middle East, while *L. mexicana* complex, *L. guyanensis* complex and *L. braziliensis* complex are the most diagnosed in the Americas. The cutaneous form of the disease is the most common and is responsible of the stigmatization and social isolation of thousands of people, particularly women, while VL is usually lethal without treatment and is caused by *L. donovani* in Africa and Europe, and *L. infantum* in southern Europe and the Americas. MCL is characterized by the destruction of mucous tissue of the nose, palate, and pharynx, and can severely affect the daily life of thousands of people [(2,3)]. Human leishmaniasis is more prevalent in low-income countries with displaced populations due to war, social or economic conflicts and is classified by WHO as a neglected tropical disease (NTD). This scenario makes early diagnosis and treatment of the disease, as well as the introduction of preventive measures, difficult (3)].

In Europe, VL is caused by *L. infantum* with both humans and dogs as target species. The infection is more prevalent in southern countries, such as Portugal, Spain, Italy, and Greece. Dogs are heavily affected by this zoonotic species [(4)] and are considered the main reservoir. Human infections mainly affect immunocompromised patients (such as those HIV+ or recipients of solid organs transplants) as well as occasional reports in elderly and children [(5)]. Several studies have stressed the paramount importance of wildlife in maintaining *Leishmania* infection [6,7]. Wildcats (*Felis silvestris*) are susceptible to the same pathogens as domestic cats and therefore could be potential reservoirs for the infection. However, studies conducted have been scarce [8–10], with a limited number of animals analysed in each study (n=4, n=3, n=4, respectively). The three studies identified *L. infantum* using a small fragment of kDNA or qPCR of the ITS2 regions.

Despite suitable bioclimatic conditions and available vectors for the anthroponotic *L. tropica* (*Phlebotomus sergenti*) and *L. major* (*P. papatasi*) [11,12], only *L. infantum* has been reported in the Iberian Peninsula [6,12,13]. However, *L. major* has been recently reported in a cat from Lisbon, Portugal [14]. Moreover, it is worth noting that *L. tropica* has been previously reported in Greece [15] and the three species (*L. infantum, L. tropica* and *L. major*) are present in Morocco [16], as well as in other countries bordering Europe [17]. Availability of a larger number of wildcats allowed us to identify the presence of *Leishmania* in various tissues and genetically characterize the samples.

Material and methods

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Animals, samples, and geographic area

Samples from 18 wild cats that were road killed during 2022 and 2023 in the Spanish provinces of Burgos, Valladolid, Soria, Ávila, Guadalajara, and Ciudad Real were analysed in this study.

The animals were transported to the wildlife recovery centres of Castilla y León and Castilla-La Mancha, systematic necropsies were performed, and the presence/absence of lesions annotated. A portion of the ear skin and the spleen were taken and frozen at -20°C for further processing. Date, age, sex, and locality (geographic coordinates where the dead animals were found) were included in the data base.

Maps

The map was created by taking as reference the maps of distribution in Europe of *Phlebotomus sergenti*, the main vector of *L. tropica*, in 2022 and 2023 [18], and the geographic locations of the wildcats analysed in this study. The AutoCAD program (Autodesk® Inc., the Landmark, San Francisco, CA, USA) was employed to observe the overlaps between the two maps.

DNA isolation

DNA was isolated from spleen (10 mg) and ear skin (20 mg) using the NZYTech Tissue gDNA isolation kit (NZYTech, Portugal) and following the manufacturer's instructions . DNA elution was conducted in 60 µL of elution buffer instead of 100 µL to increase DNA concentration. Positive and negative controls were used in each batch of the experiment. The positive control consisted of samples derived from *L. major* (clone V1: MHOM/IL/80/Friedlin) or *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) promastigotes in culture ($1x10^6$ promastigotes), while the negative control consisted of DNase-free water. DNA content was measured in a Multiskan™ GO microplate spectrophotometer with µDrop™ plates (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). DNA from cultures of *L. major* and *L. braziliensis* were obtained and used as internal controls for PCRs and sequencing.

PCR of Small subunit ribosomal RNA (SSU-rDNA), Internal Transcribed spacers-5.8 ribosomal DNA 1 (ITS1), and heat shock protein 70 (hsp70) targets

DNA samples from ear skin and spleen of the 18 cats were used for *Leishmania* DNA detection. DNA from different *Leishmania* species was also used as an internal control for PCR and sequencing: *L. major* (clone V1: MHOM/IL/80/Friedlin) and *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904). Only samples with good DNA quality (absorbance ratio at 260/280 nm > 1.7) were used for all PCRs. All methods have been previously described and adapted to the working conditions recommended by the enzyme manufacturer (Supreme NZYTaq II 2x Master Mix, NZYTech, Lisbon, Portugal).

Nested PCRs (nPCR) to amplify a 358 bp fragment of the *SSU-rDNA* target were performed using primers R221 (5´- GGTTCCTTTCCTGATTTACG-3´) and R332 (5´- GGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3´) for the outer section, and primers R223 (5´- TCCATCGCAACCTCGGTT-3´) and R333 (5´- AAAGCGGGCGCGGTGCTG-3´) for the inner section [19], following previously described conditions [20].

Primers L5.8S (5´- ACACTCAGGTCTGTAAAC-3´) and LITSR (5´- CTGGATCATTTTCCGATG-3´) were used for the outer section of the *ITS1* region and primers SAC (5´- CATTTTCCGATGATTACACC-3)´and VAN2 (5´- CGTTCTTCAACGAAATAGG -3´) were used for the inner section to amplify a fragment of 280-330 bp, as previously described [20,21].

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

The nPCR used for *hsp70* amplified a fragment of 741 bp and was based on the primers and methods previously described for phylogenetic purposes [14,22]. Briefly, external primers HSP70-F25 (5´-GGACGCCGGCACGATTKCT-3´) and HSP70-R1310 (5´-CCTGGTTGTTGTTCAGCCACTC-3´) were used at 0.8 µM each , and internal primers HSPF (5´-GACAACCGCCTCGTCACGTTC-3´) and HSPR (5´-GTCGAACGTCACCTCGATCTGC-3´) were used at 0.4 µM each. In the first PCR, 40 cycles of 94°C for 40 s, 61°C for 60 s and 72°C for 120 s were used, while in the second PCR, 40 cycles of 94°C for 40 s, 61°C for 60 s and 72°C for 60 s were used.

All PCR reactions were performed in 25 µL using 12.5 µL of Supreme NZYTaq II 2x Master Mix. An initial step of 95°C for 5 min to activate the enzyme, and a final elongation step of 72°C for 10 min to allow the elongation of PCR products were employed in all PCR reactions. In the first PCR, 5 µL of DNA was used, while in the second PCR reactions 5 µL of a 1:50 dilution from each first PCR product were employed for *hsp70*, while a 1:40 dilution of the first PCR product was used for SSU-rRNA and ITS1.

The results of the nPCR were visualized in 1% agarose gels stained with SYBR™ safe DNA gel stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) under UV light.

Sequencing and alignment

Samples containing the amplicons of the expected size were sent to the facilities of Macrogen Spain (Madrid, Spain)for Sanger sequencing. Samples were purified and sequenced using a DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD) and the ABI BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions. The resulting sequences were aligned using Molecular Evolutionary Genetics Analysis v.11 software (MEGA XI) [(23)] and FinchTV 1.4.0 software (Geospiza, Inc.; Seattle, WA, USA), manually checked, and subjected to BLAST analysis using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (National Library of Medicine, Rockville, MD, USA).

Only sequences with more than 150 bp that were clear in both directions were sent to GenBank for accession numbers.

Phylogenetic trees

Phylogenetic trees were constructed using the sequences obtained in the present study and other sequences available at GenBank. Trees for *hsp70* and *ITS1* are shown because *SSU-rDNA* target is a conserved region and only a difference of 1-2 bp was observed between the sequences obtained.

In all trees, a sequence from *Trypanosoma cruzi* was included as an out-group reference. In addition, other sequences of *Leishmania* spp. from GenBank and sequences from *L. infantum* and the above-mentioned species of *Leishmania* from cultures were included to verify similarity (*L. major,* and *L. braziliensis*). Sequences had a minimum length of 236 nucleotides for *ITS1* region and 635 nucleotides for *hsp70*. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method based on the Tamura–Nei model [24]. The tree with the highest log likelihood was displayed. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together was shown next to the branches. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying the Neighbour-Joining and BioNJ algorithms to a pairwise distance matrix estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach and selecting the topology with the superior log likelihood value. Trees were drawn to scale, with branch lengths measured based on the number of substitutions per site. The analysis included 13-18 nucleotide sequences,

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

depending on the tree. Codon positions included were 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. Evolutionary analyses were conducted via MEGA XI [23]. A bootstrap of 2000 replicates was used to assess the reliability of the trees.

Statistical analysis

A descriptive statistical analysis with absolute (n) and relative frequency of infection (%) was carried out, with a confidence level of 95%, using the free online tool WinEpi (Working in Epidemiology) and considering that the diagnostic techniques employed were perfect (nPCR of the *SSUrDNA*). Odds ratio analysis was used to analyse the risk factors "sex" and "*Leishmania* infection" [25].

Results

Detection and identification of Leishmania *spp. in wild cat*

Samples from ear skin and spleen of eighteen wildcats have been analysed in this study, except for the spleen of two animals that were in bad condition when the cats were found (Table 1). None of the animals displayed lesions comparable to those produced by *Leishmania* infections. Considering all the animals positive for *Leishmania* PCR, 38.89% (16.37-61.41%, 95% Confidence interval) were found to be infected. A non-significant higher proportion of infection was found in males (OR= 27.17, 95% CI 0.33, 2213.63), since only males were found infected, but we must consider that we obtained a smaller number of samples from females (n=3/18).

Table 1. Age, sex, geographical location, date of collection and *Leishmania* infection of the studied wildcats.

	Age	Sex	Date	Location	*Leishmania* infection
262	Adult	M	20-04-2022	Villagonzalo Pedernales (Burgos)	+
263	Adult	M	21-04-2022	Bonilla de la Sierra (Ávila)	+
268	Adult	M	22-06-2022	Sedano (Burgos)	+
272	Adult	M	13-07-2022	Cogeces de Íscar (Valladolid)	-
275	Adult	M	15-07-2022	Berlangas de Roa (Burgos)	+
276	Adult	M	15-07-2022	Torreblancos (Soria)	-
310	Adult	M	21-12-2022	Almazán (Soria)	-
317	Adult	M	24-02-2023	Temiño (Burgos)	-
318 *	Adult	M	13-03-2023	Castrillo de Riopisuerga (Burgos)	+
319	Adult	F	13-03-2023	Hermosilla (Burgos)	-
320	Adult	M	23-03-2023	Cubo de la Solana (Soria)	-
323	Adult	M	28-04-2023	Adradas (Soria)	+
365	Adult	M	08-09-2023	Cascajares de Bureba (Burgos)	+
366	Adult	M	08-09-2023	Martialay (Soria)	-
367	Adult	F	08-09-2023	Retuerta (Burgos)	-
375	Adult	M	05-10-2023	Fuencaliente (Ciudad Real)	-
376	Adult	F	05-10-2023	Pedrosa del Príncipe (Burgos)	-
378 *	Adult	nd	05-10-2023	Peralejo (Guadalajara)	-

*Spleen not analyzed. M: male; F: female. nd: not determined.

Seven of the eighteen animals were found positive by *Leishmania* PCR for SSU-rDNA. All were positive at the ear skin, and only two were also positive in spleen samples (Table 2).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Table 2. Results of end-point PCR using samples from ear skin and spleen and three targets for *Leishmania* DNA amplification. Sequences identities are identified with super index numbers (1-4).

Sample	Ear skin			Spleen		
	SSU-rDNA	*ITS1*	*hsp70*	*SSU-rDNA*	*ITS1*	*hsp70*
262	+	-	-	-	-	-
263	+	+[2]	+[4]	+	+[2]	+[4]
268	+	+[2]	+[3]	-	-	-
275	+	+[1]	+[3]	-	-	-
318	+	-	-	nd	nd	nd
323	+	+[2]	+[4]	+	+[2]	+[4]
365	+	-	-	-	-	-

nd: not determined. 1: *ITS1* sequence 100% identity with *L. tropica*; 2: *ITS1* sequence 100% identity with *L. infantum*; 3: *hsp70* sequence 99.86-100% identity with *L. tropica*; 4: *hsp70* sequence 99.24-100% identity with *L. infantum.*

Sequences and GenBank accession numbers

Nucleotide sequences from wildcats obtained in this study were deposited in the GenBank database under accession numbers PP389513-PP389521 for *SSU-rDNA*, PP177368-PP177373 for *ITS1*, and PP397157-PP397162 for *hsp70*. Sequences from *L. major* and *L. braziliensis* isolates were deposited in the GenBank database with accession numbers PP389522, PP389523, and PP389533.

Sequences obtained from *SSU-rDNA* had 295-327 bp and differ by only 1 or 2 nucleotide positions. Nine sequences were obtained from the analysed animals, seven from the ear skin and two from the spleen. Seven of the obtained sequences displayed 100% query coverage and 99.69-100% identity with other *L. infantum* sequences available at GenBank (acc. n MN757921, obtained from *Canis lupus*, Brazil). Sequences obtained from the ear skin of animals 365 and 323 showed 100% query coverage and 99.69-100% identity, respectively, with sequences from *L. major*, *L. enrietti, L. infantum, L. mexicana, L. guyanensis* or *L. tropica* (acc. n MT560279, MK737948, MK495994, KM061042, X53913, KF302745), being identical except one nucleotide.

ITS1 sequences of 236-247 bp were obtained from the ear skin of four animals (263, 268, 275, 323), two of which (263 and 323) also gave sequences when DNA from the spleen was used (Table 2). Three sequences displayed 100% query coverage and 100% identity with sequences from *L. infantum* (acc. n MT416168, samples from ear skin of animals 263, 268, and 323, and samples from spleen of animals 263 and 323), while one sequence (from ear skin of wildcat 275) displayed 100% query coverage and 100% identity with sequences from *L. tropica* (acc. n MH595857, isolate R24, Iran).

Sequences obtained from *hsp70* amplification yielded four sequences from the ear skin and two sequences from the spleen with 635-711 bp. Of these, four sequences showed 100% coverage and 99.24-100% identity with *L. infantum* (acc. n OR136937, strain MHOM/IT/99/ISS1898). The other two sequences (268 and 275 from ear skin) displayed 100% coverage and 99.86 and 100% identity, respectively, with *L. tropica* (acc. n LN907846, strain MHOM/IL/80/SINGER, and MK335938, voucher ISS3183) (Table 2). Double peaks were observed in three and five positions of sequences from the spleen of animal 323 and ear skin of animal 263, respectively, indicating mixed sequences.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Considering all sequences obtained with *SSUrDNA*, *ITS1* and *hsp70* targets, *L. tropica* tends to be better amplified in samples from ear skin than in samples from spleen. In one animal (275) sequences from the *ITS1* and *hsp70* targets showed 100% identity with *L. tropica*. Two animals displayed sequences compatible with *L. infantum* at ear skin and spleen (263 and 323), and another wildcat was positive only at ear skin with sequences compatible with *L. infantum* and *L. tropica* (268). Finally, in three animals (262, 318 and 365) the sequences could only by assigned to *Leishmania* genus because they were only positive for *SSUrDNA* (Table 2).

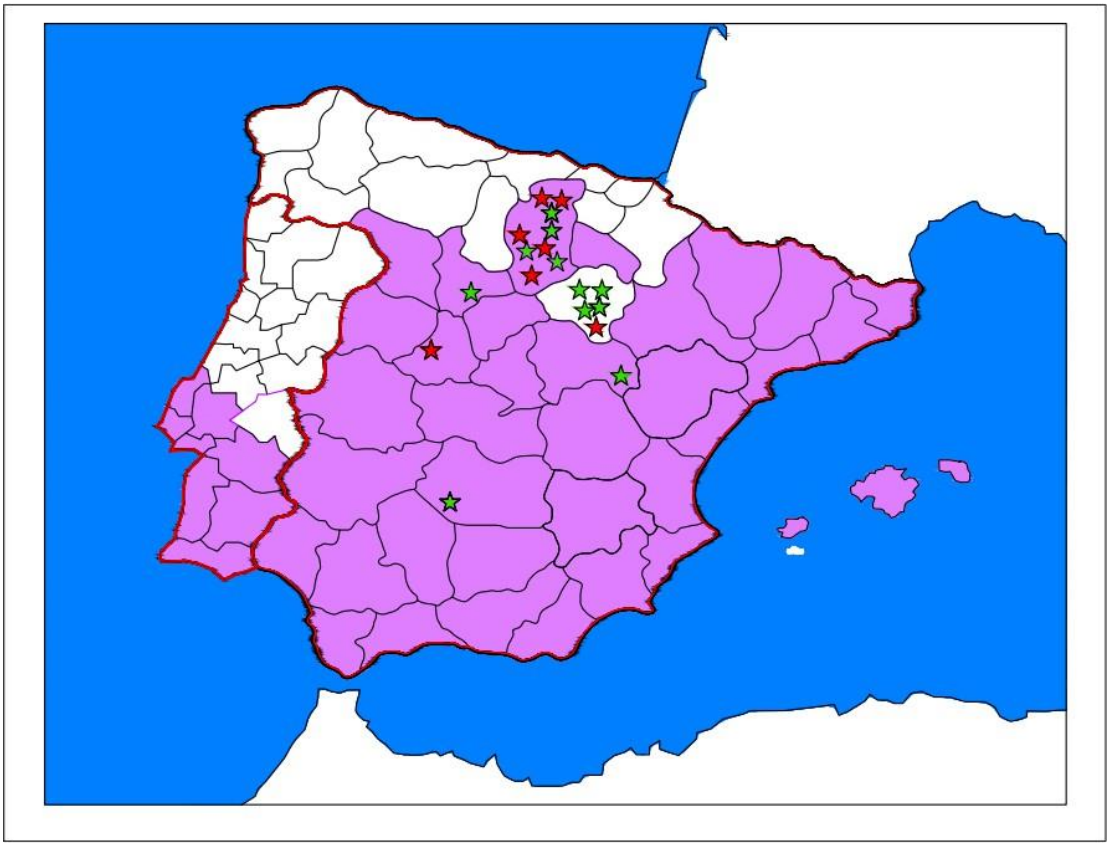


Figure 1. Map of the Iberian Peninsula. Fuchsia coloured area corresponds to the distribution of *Phlebotomus sergenti* in 2022 and 2023. Red stars indicate the detection and identification of *Leishmania* spp. by *hsp70* and *ITS1*sequences. Green stars indicate the absence of *Leishmania* spp. in the sampled cats.

Phylogenetic trees

Phylogenetic analysis of the sequences shows strong support for the clusters found with the two targets, in agreement with the percentage of identity of the obtained sequences. *ITS1* sequences from this study were grouped with *L. infantum* (samples 263, 268 and 323 from ear skin and samples 263 and 323 from spleen) or *L. tropica* (sample 275) (Figure 2).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

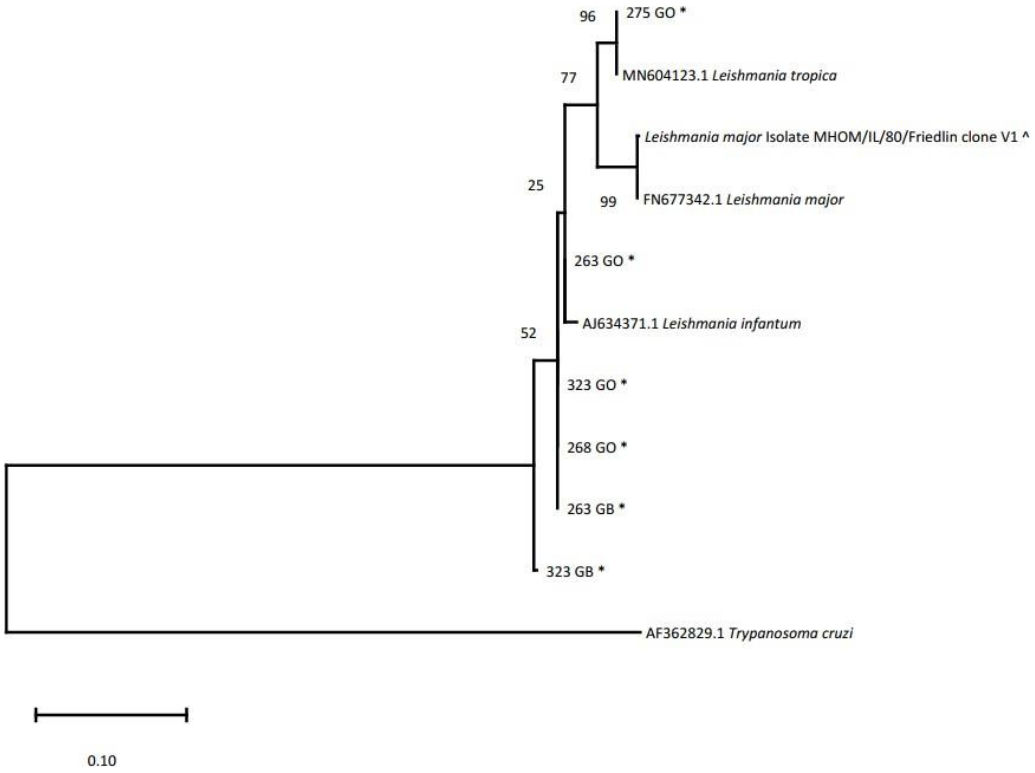


Figure 2. Phylogenetic tree of the *ITS1* region. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and Tamura-Nei model. The tree with the highest log likelihood (-841.79) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. This analysis involved 11 nucleotide sequences. There were a total of 292 positions in the final dataset. *****: Sequences from positive samples of this study. **^**: Sequences from isolates sequenced in the present study. GB: sample from spleen. GO: sample from ear skin.

In the phylogenetic tree generated with *hsp70* sequences obtained in the present study, two of them (samples 268 and 275 from ear skin) clustered with *L. tropica* and three of them (samples 263 and 323 from ear skin and 263 spleen) clustered with *L. infantum* sequences retrieved from GenBank (Figure 3). One of the *L. tropica* sequences was obtained from the same animal (275) that rendered *L. tropica ITS1* sequence, while the other *L. tropica hsp70* sequence was obtained from an animal (268) that rendered *L. infantum ITS1* sequence.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

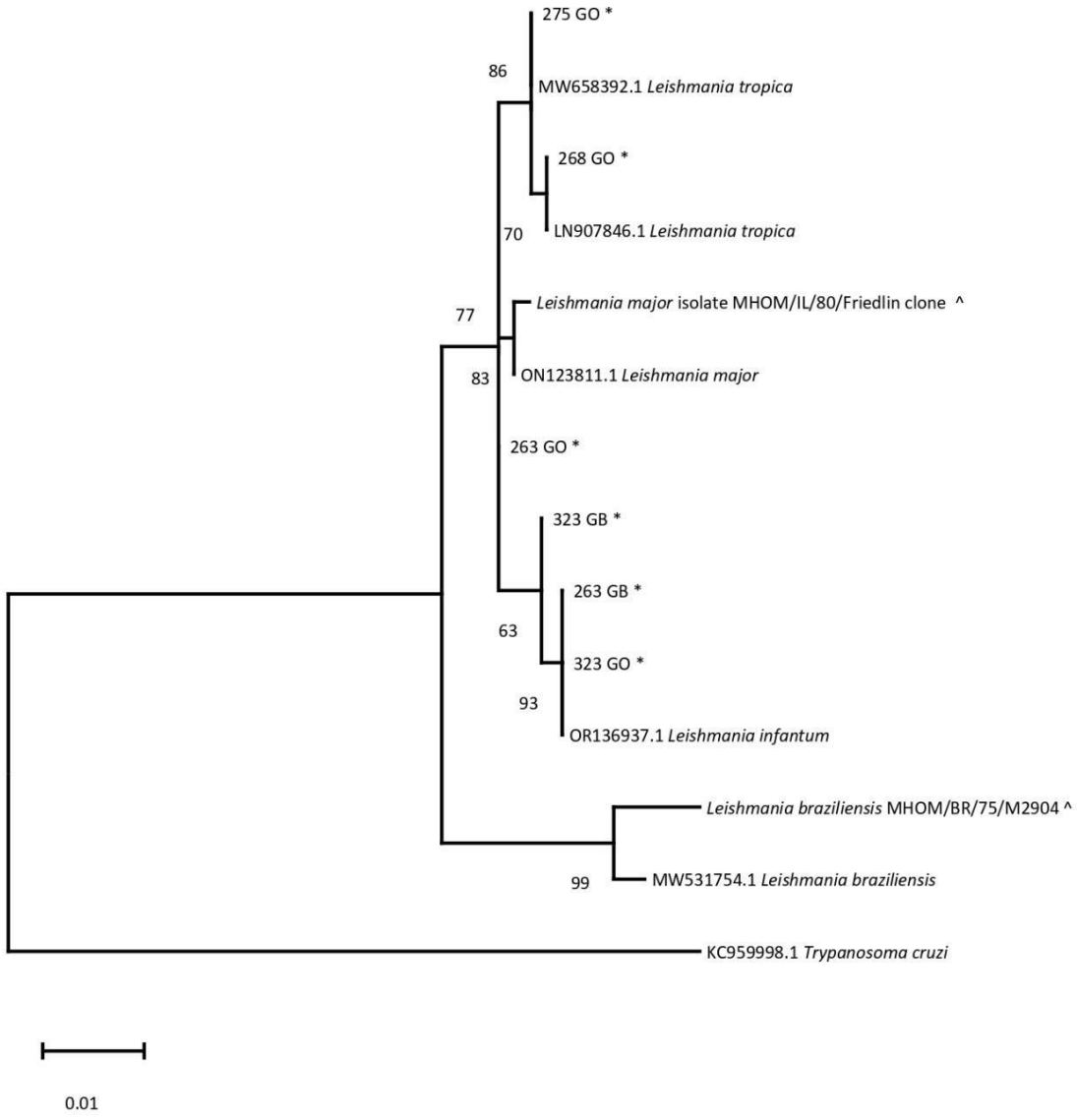


Figure 3. Phylogenetic tree of the *hsp70* region. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and Tamura-Nei model. The tree with the highest log-likelihood (-1328.37) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. This analysis involved 14 nucleotide sequences. There were a total of 635 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11. *****: Sequences obtained from positive samples of this study. **^**: Sequences from isolates sequenced in the present study. GB: sample from spleen. GO: sample from ear skin.

Discussion

In the present study, seven out of 18 wildcats (38.89%) were found positive to *Leishmania* infection, a value consistent with those found in previous studies [8,10] although lower than the infection prevalence reported by Oleaga et al. [9] with all three wildcats tested being positive for *Leishmania*. *L. infantum* is endemic in the Iberian Peninsula [12,13], but no infections of *L. tropica*

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

in autochthonous species have been reported. The risk of introduction of *L. tropica* in the Iberian Peninsula has been highlighted several times, considering the presence and distribution of the main vector, *P. sergenti*, and the identification in Spain of one genetic line of *P. sergenti* commonly found in Morocco [26,27] where CL by *L. tropica* is endemic [21,28,29]. Large areas in Europe are considered suitable for *L. tropica* [11] and hot spots for foci of *L. tropica* have been suggested [26].

The most common targets employed for detection of *Leishmania* spp. infection are *SSU-rDNA* and kDNA, with similar values of sensitivity [6]. However other targets are useful for phylogenetic studies and determination of *Leishmania* spp., such as *ITS1*, *cytB*, *g6pdh*, and *hsp70* [14,20–22,28,30,31]. In the present study, *ITS1* and *hsp70* have been employed to confirm the finding of *L. tropica* in autochthonous fauna, and sequences of *L. tropica* with *ITS1* and *hsp70* targets are reported. Sequences of *L. tropica* were detected in at least two wildcats positive to PCR with *hsp70* and/or *ITS1* targets, widely employed for phylogenetic studies. Our finding extends the reported presence of the species in Greece [32] and extends its distribution to the Iberian Peninsula for the first time.

Isolation of alive *Leishmania* was not feasible considering the source of material but it is also noteworthy than in our study ear skin samples displayed more positive results than spleen samples (n=7/18 *vs*. n=2/16). This finding is consistent with the fact that *L. tropica* infections are associated mainly with cutaneous clinical forms in humans, where parasite persistence is close to the site of natural infections transmitted by the sandfly, although the parasite can be also found less frequently associated with VL, mainly in immune suppressed people [33]. Imported cases of CL by *L. tropica* have been sporadically reported in Spain after travelling to Morocco [34] but no previous autochthonous cases have been reported in Spain or Portugal. Apparently, *L. tropica* is expanding its distribution and the main risk factor for the appearance of the disease is the presence of the vector [35]. It should be pointed out that some of the wildcats came from latitudes over 42º N (*e.g.* Pedrosa del Príncipe, N42°14'56.8") and during the last decade, *P. sergenti* has expanded to northern areas of the Iberian Peninsula, according to ECDC maps of distribution [18].

In endemic areas, such as Israel, domestic cats appear to be more susceptible to infection with *L. tropica* than dogs [36]. A study of stray cats in Turkey showed that all samples with *ITS1* amplification were infected with *L. tropica*, while only one was co-infected with *L. infantum* [37].Similarly, in the present study, while one animal showed infection by *L. tropica* only, another wildcat showed *hsp70* and *ITS1* sequences consistent with coinfection by *L. infantum* and *L. tropica*. Mixed infection with more than one *Leishmania* species have also been reported in other endemic areas, hosts and *Leishmania* species, such as in Brazil (*L. infantum* and *L. braziliensis*) in one dog [38] and 8/30 dogs [39], rodents (10% of *L. infantum* and *L. braziliensis*) [40], hedgehogs (*L. major* and *L. infantum*) in 8/12 animals and another co-infected with *L. tropica* [41], and human clinical cases [[42,43] of the New World. The possibility of hybridization between *Leishmania* species cannot be ruled out as *L. tropica* shows a higher rate of natural hybrid formation than other species [44]. However, to further investigate the existence of hybrids, isolates from infected animals are necessary [45,46], and in our study, isolates from these animals could not be obtained.

Conclusions

This is the first report of *L. tropica* infection in autochthonous wildlife in the Iberian Peninsula thus extending the presence of the species in continental Europe. The main vector of *L. tropica*

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

has been identified in Spain during the last decade and its distribution has increased northwards each year. There are no conclusive data on the zoonotic transmission of *L. tropica* and the actual spread of the infection to other species is not yet known and should be investigated. Our results support the sentinel value of wild species in the detection of not-previously reported infections. Moreover, the presence of *L. tropica* in Spain should be communicated to health professionals, including physicians, dermatologists, and veterinarians, considering that *L tropica* can produce both CL and VL in humans and pets. Awareness on the possibility of *L. tropica* infections and *L. infantum*/*L. tropica* coinfections is necessary to ensure appropriate diagnosis and management of clinical cases.

Ethical statement: The use of the samples for parasitological investigations was approved by regional authorisation of the Junta de Castilla y León, reference: "AB/is", File "AUES/CYL/001/2021" and of Castilla-La Mancha, reference: DGPFEN/SEN/avp_21_103_bis.

Funding statement: Research was partially funded by the UCM research group ICPVet.

Data availability: Sequences obtained in the present study have been deposited at GenBank Database under accession numbers: PP389513-PP389521 for *SSU-rDNA*, PP177368-PP177373 for *ITS1*, and PP397157-PP397162 for *hsp70*. Sequences of the *L. major* and *L. braziliensis* isolates are PP389522, PP389523, PP389533.

Ethical Committee

The employment of the samples for parasites investigation has been approved by permits of Junta de Castilla y León, reference: "AB/is", File "AUES/CYL/001/2021" and of Castilla-La Mancha, reference: DGPFEN/SEN/avp_21_103_bis.

Conflict of interest: None.

Authors' contributions:
MMB, IAC & MTG-M: conceptualization; IAC, PPM & MTG: methodology and formal analysis; MMB, PM & JC: collection of data and biological samples; IAC, MTG-M: writing the original draft; PMM, JC, IAC, MMB, MTG-M & JMA: interpretation of data; MMB & MTG-M: supervision; JMA, MMB & MTG-M: resources. All authors critically reviewed the manuscript, intellectually contribute to the content, and approved the final version.

References

1. https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1 [Internet]. WHO: health-topics/leishmaniasis.

2. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(3):1–40.

3. https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html [Internet]. 2023. WHO: neglected diseases, leishmaniasis.

4. Montoya A, Gálvez R, Checa R, Sarquis J, Plaza A, Barrera JP, et al. Latest trends in *L. infantum* infection in dogs in Spain, Part II: Current clinical management and control according to a national survey of veterinary practitioners. Parasit Vectors. 2020 Apr 21;13(1).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

5. Zacarias DA, Rolão N, de Pinho FA, Sene I, Silva JC, Pereira TC, et al. Causes and consequences of higher *Leishmania infantum* burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. Tropical Medicine and International Health. 2017 Jun 1;22(6):679–87.

6. Azami-conesa I, Gómez-Muñoz MT, Martínez-Díaz RA. A systematic review (1990–2021) of wild animals infected with zoonotic *Leishmania*. Vol. 9, Microorganisms. MDPI AG; 2021.

7. Cardoso L, Schallig H, Persichetti MF, Pennisi MG. New Epidemiological Aspects of Animal Leishmaniosis in Europe : The Role of Vertebrate Hosts Other than Dogs. 2021;1–46.

8. Del Río L, Chitimia L, Cubas A, Victoriano I, De la Rúa P, Gerrikagoitia X, et al. Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. Prev Vet Med. 2014;113(4):430–5.

9. Oleaga A, Zanet S, Espí A, Raquel M, Macedo P De, Gortázar C, et al. *Leishmania* in wolves in northern Spain : A spreading zoonosis evidenced by wildlife sanitary surveillance. Vet Parasitol [Internet]. 2018;255(January):26–31. Available from: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.015

10. Risueño J, Ortuño M, Pérez-Cutillas P, Goyena E, Maia C, Cortes S, et al. Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain. Vet Parasitol. 2018 Aug 15;259:61–7.

11. Cunze S, Kochmann J, Koch LK, Hasselmann KJQ, Klimpel S. Leishmaniasis in Eurasia and Africa: Geographical distribution of vector species and pathogens. R Soc Open Sci. 2019 May 1;6(5).

12. Berriatua E, Pérez-Cutillas P, González Vidal A, Briët O. European Centre for Disease Prevention and Control. The spatial relationship between the presence and absence of *Leishmania* spp. and leishmaniasis, and phlebotomine sand fly vectors in Europe and neighbouring countries. 2023; Available from: www.ecdc.europa.eu

13. Gálvez R, Montoya A, Cruz I, Fernández C, Martín O, Checa R, et al. Latest trends in *Leishmania infantum* infection in dogs in Spain, Part I: Mapped seroprevalence and sand fly distributions. Parasit Vectors. 2020 Apr 21;13(1).

14. Pereira A, Parreira R, Cristóvão JM, Castelli G, Bruno F, Vitale F, et al. Phylogenetic insights on *Leishmania* detected in cats as revealed by nucleotide sequence analysis of multiple genetic markers. Infection, Genetics and Evolution. 2020 Jan 1;77.

15. Frank K HMPFGARJ. *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* responsible for cutaneous leishmaniasis in Greece: sixteen autochthonous cases. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993;87(2):184–5.

16. Ait Kbaich M, Mhaidi I, Ezzahidi A, Dersi N, El Hamouchi A, Riyad M, et al. New epidemiological pattern of cutaneous leishmaniasis in two pre-Saharan arid provinces, southern Morocco. Acta Trop. 2017 Sep 1;173:11–6.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

17. Tunalı V, Özbilgin A. Knock, knock, knocking on Europe's door: Threat of leishmaniasis in Europe with a focus on Turkey. Vol. 4, Current Research in Parasitology and Vector-Borne Diseases. Elsevier B.V.; 2023.

18. https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/phlebotomine-maps [Internet]. 2023. European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Phlebotomine sandflies maps [internet]. Stockholm: ECDC; 2022, 2023. Available from:

19. Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, et al. Diagnosis A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immuno-deficiency virus. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2002;S185–9.

20. Azami-Conesa I, Sansano-Maestre J, Martínez-Díaz RA, Gómez-Muñoz MT. Invasive species as hosts of zoonotic infections: The case of American mink (*Neovison vison*) and *Leishmania infantum*. Microorganisms. 2021 Jul 1;9(7).

21. Echchakery M, Chicharro C, Boussaa S, Nieto J, Carrillo E, Sheila O, et al. Molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in rodent species from endemic cutaneous leishmaniasis areas in Morocco. Parasit Vectors. 2017;10(1):1–8.

22. Van Der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Esbroeck M Van, et al. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics [Internet]. Available from: www.eurosurveillance.orghttp://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20543

23. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Mol Biol Evol. 2021 Jul 1;38(7):3022–7.

24. Tamura K& NM (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution, 10, 512–526. Mol Biol Evol. 1993;10:512–26.

25. Ignacio de Blas. http://www.winepi.net/. Win Epi: Working in Epidemiology.

26. Barón SD, Morillas-Márquez F, Morales-Yuste M, Díaz-Sáez V, Gállego M, Molina R, et al. Predicting the risk of an endemic focus of *Leishmania tropica* becoming established in south-western Europe through the presence of its main vector, *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917. Parasitology. 2013;140(11):1413–21.

27. Merino-Espinosa G, Corpas-López V, Callejón-Fernández R, Porcel-Rodríguez L, Díaz-Sáez V, Gállego M, et al. Differential ecological traits of two *Phlebotomus sergenti* mitochondrial lineages in southwestern Europe and their epidemiological implications. Tropical Medicine and International Health. 2016 May 1;21(5):630–41.

28. El Kacem S, Ait Kbaich M, Daoui O, Charoute H, Mhaidi I, Ejgha R, et al. Multilocus sequence analysis provides new insight into population structure and genetic diversity of *Leishmania tropica* in Morocco. Infection, Genetics and Evolution. 2021;september:104932.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

29. Saik IEI, Benlabsir C, Fellah H, Lemrani M, Riyad M. Transmission patterns of *Leishmania tropica* around the Mediterranean basin: Could Morocco be impacted by a zoonotic spillover? Vol. 16, PLoS Neglected Tropical Diseases. Public Library of Science; 2022.

30. Mohammadpour I, Hatam GR, Handjani F, Bozorg-Ghalati F, Pourkamal D, Motazedian MH. *Leishmania* cytochrome b gene sequence polymorphisms in southern Iran: Relationships with different cutaneous clinical manifestations. BMC Infect Dis. 2019 Jan 29;19(1).

31. Fernández-Arévalo A, Ballart C, Muñoz-Basagoiti J, Basarte L, Lobato G, Arnau A, et al. Autochthonous and imported tegumentary leishmaniasis in Catalonia (Spain): Aetiological evolution in the last four decades and usefulness of different typing approaches based on biochemical, molecular and proteomic markers. Transbound Emerg Dis. 2022 May 1;69(3):1404–18.

32. Frank C HMPFGARJ. *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* responsible for cutaneous leishmaniasis in Greece: sixteen autochthonous cases. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993;87(2).

33. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Vol. 27, Medical and Veterinary Entomology. 2013. p. 123–47.

34. Knöpfel N, Noguera-Morel L, Azorin D, Sanz F, Torrelo A, Hernández-Martín A. Cutaneous *Leishmania tropica* in children: report of three imported cases successfully treated with liposomal amphotericin B. Vol. 32, Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. e8–10.

35. Gijón-Robles P, Abattouy N, Merino-Espinosa G, El Khalfaoui N, Morillas-Márquez F, Corpas-López V, et al. Risk factors for the expansion of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania tropica*: Possible implications for control programmes. Transbound Emerg Dis. 2018 Dec 1;65(6):1615–26.

36. Baneth G, Nachum-Biala Y, Adamsky O, Gunther I. *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* infection in dogs and cats in central Israel. Parasit Vectors. 2022 Dec 1;15(1).

37. Can H, Döşkaya M, Özdemir HG, Şahar EA, Karakavuk M, Pektaş B, et al. Seroprevalence of Leishmania infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of I˙zmir, Turkey. Exp Parasitol. 2016 Aug 1;167:109–14.

38. Madeira MF, Schubach A, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, et al. Mixed infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006 May;100(5):442–5.

39. Alves Souza N, Souza Leite R, de Oliveira Silva S, Groenner Penna M, Figueiredo Felicori Vilela L, Melo MN, et al. Detection of mixed *Leishmania* infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. Acta Trop. 2019 May 1;193:12–7.

40. Ferreira E de C, Cruz I, Cañavate C, de Melo LA, Pereira AAS, Madeira FAM, et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. BMC Vet Res. 2015 Mar 20;11(1).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.03.16.585353; this version posted March 16, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

41. Souguir-Omrani H, Chemkhi J, Fathallah-Mili A, Saadi-BenAoun Y, BelHadjAli I, Guizani I, et al. *Paraechinus aethiopicus* (Ehrenberg 1832) and *Atelerix algirus* (Lereboullet 1842) hedgehogs: Possible reservoirs of endemic leishmaniases in Tunisia. Infection, Genetics and Evolution. 2018 Sep 1;63:219–30.

42. Shirian S, Oryan A, Hatam GR, Daneshbod Y. Mixed mucosal leishmaniasis infection caused by *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. J Clin Microbiol. 2012 Nov;50(11):3805–8.

43. Badirzadeh A, Mohebali M, Sabzevari S, Ghafoori M, Arzamani K, Seyyedin M, et al. Case Report: First coinfection report of mixed *Leishmania infantum*/*Leishmania major* and human immunodeficiency virus-acquired immune deficiency syndrome: Report of a case of disseminated cutaneous Leishmaniasis in Iran. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2018;98(1):122–5.

44. Louradour I, Ferreira TR, Ghosh K, Shaik J, Sacks D. In Vitro Generation of *Leishmania* Hybrids. Cell Rep. 2020 Apr 14;31(2).

45. Ozbilgin A, Culha G, Zeyrek FY, Töz S, Gündüz C, Kurt Ö, et al. Cutaneous and visceral tropisms of *Leishmania tropica*/*Leishmania infantum* hybrids in a murine model: First report of hybrid *Leishmania* strains isolated in Turkey. International Journal of Infectious Diseases. 2012 Jun;16:e165.

46. Bruno F, Castelli G. Genomic and epidemiological evidence for the emergence of a putative *L. donovani*/*L. infantum* hybrid with unusual epidemiology in Northern Italy. Available from: https://doi.org/10.1101/2023.08.09.552585

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Caracterización del desarrollo y proliferación de células del sistema inmune en ratones deficientes en ICAP-1

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Yaiza Rodríguez García

DIRECTOR

Joaquín Teixidó Calvo

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

Caracterización del desarrollo y proliferación de células del sistema inmune en ratones deficientes en ICAP-1

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Yaiza Rodríguez García

DIRECTOR

Joaquín Teixidó Calvo

AGRADECIMIENTOS

MUCHÍSIMAS GRACIAS a todos los que han hecho posible esta Tesis Doctoral:

A mi director el Dr. Joaquín Teixidó, por ofrecerme realizar la Tesis en tu laboratorio y haberme permitido formar parte de tu grupo durante tantos años. Gracias por tu voto de confianza, por la cercanía con la que nos tratas siempre, por dirigirme y guiarme en la Tesis Doctoral y por ser un ejemplo a seguir como jefe.

A mi tutora de la Universidad Complutense, Nieves Olmo López, por orientarme y ayudarme con la gestión de los trámites universitarios. Gracias por la rapidez con la que siempre has respondido y tu amabilidad. Al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades por concederme la beca FPU para la realización de la presente Tesis.

Agradecer también a la Dra. Kristin Hogquist, por darme la oportunidad de realizar la estancia Doctoral en su laboratorio. Gracias a los integrantes del laboratorio "Jamequist" por la calidez con la que me han acogido durante estos meses, por todo lo que me han enseñado, sus aportaciones y por resolver mis dudas. En especial a Michael y Adriana, me llevo un pedacito de Puerto Rico y de Minnesota conmigo.

A todas las personas que han colaborado con nosotros (Daniel Bouvard, Aldo Borroto, Balbino Alarcón, Patricia Fuentes, Marisa Toribio, Lola Alonso…), que nos han ofrecido sus consejos y sus recomendaciones, así como reactivos y anticuerpos. Al servicio de citometría, a Pedro Lastres y en especial a Patricia Yagüe, por ofrecerme toda la ayuda técnica y experimental que he necesitado con la citometría de flujo y con los largos procesos de *cell-sorting.* A los integrantes del animalario: a Carol, por ayudarme en la capacitación de experimentación animal y con la gestión de las colonias; A Arantxa y Marta, por continuar con el cuidado de los ratoncitos en los últimos años; A Angélica, María y Paco por ayudarme con las inyecciones. Agradecer a Maite y Gema del Servicio de Microscopía Confocal por su ayuda con el manejo del Sp5. A Luisa Botella por acompañarme durante las irradiaciones de ratones. A Marta Menéndez por ayudarme con los experimentos de senescencia y llevar siempre una sonrisa puesta.

A mis antiguas compañeras Silvia y Nohemí, por acompañarme desde el principio, gracias por enseñarme todo sobre ICAP-1, por enseñarme lo que es un ambiente ideal de trabajo y el verdadero trabajo en equipo. Gracias por introducirme en este proyecto, espero haber sabido seguir el relevo y dejar bien alto el 141. Gracias por los planes juntas, las meriendas de Navidad, y sobre todo, por estar disponibles siempre que os he necesitado y por permanecer a mi lado durante estos años a pesar de la distancia. Agradecer también a Lucía, por ser un referente y acompañarme el primer año de Tesis. Gracias a las tres por enseñarme tanto, no solo profesionalmente, sino también sobre la vida.

A mis actuales compañeras: Valeria, que llegaste prácticamente al principio de esta etapa. Gracias por acompañarme con tu alegría y sonrisa, por ayudarme con los experimentos en los comienzos y por todas esas charlas en las que descubrimos que aun siendo distintas tenemos muchas cosas en común. Gracias por confiar en mí, por tenerme siempre en cuenta y por el cariño que me has dado. Ana Paula y Marta, gracias por haberme acompañado durante estos años, por ayudarme experimentalmente cuando estaba desbordada y por ayudarme a gestionar la colonia de ratones. Gracias a las tres, por vuestro apoyo y comprensión, tanto dentro como fuera del laboratorio, por vuestras risas y por seguir haciendo del 141 un lugar maravilloso. A Miguel y a Ingrid, por formar equipo ICAP-1 conmigo y contribuir al avance de este proyecto con su sudor y esfuerzo. Gracias por las risas, las bromas y por hacer de mi último año un momento tan especial a vuestro lado. A todos los que han pasado por el laboratorio: Nacho, Rubén, Andrea, Albertaq, Sara…Gracias por regalarnos un pedacito de vuestra esencia.

Muchísimas gracias a Laura, vales un millón de maxi-atardeceres juntos. Por todas nuestras conversaciones, tanto las profundas como las absurdas. Gracias por arroparme siempre con tu alegría, y por todo el cariño que me diste cuando estuve en EEUU. Como decíamos, el regalo más importante es la gente que te quiere, y sé que contigo me llevo un regalo inmenso como es tu amistad. Por muchos más años disfrutando de tu espontaneidad. Muchísimas gracias a Patri, mi amiga de aventuras por EEUU, por los cafecitos y por todos los planes que hemos realizado juntas, desde Ikono hasta disfrazarnos por Ávila. Muchas gracias a Diego por su buen rollo, que te voy a decir Flouchuchausen, citometrí-A. También agradecer a Javi, Alberto, Laura Cuesta y Rocío, así como el resto de integrantes del 007 y el 302, por formar esta pequeña familia en el CIB. Gracias a Álvaro, por tus risas y los *brunchs*. Agradecida a todos vosotros por todos los momentos que hemos vivido juntos, por los viajes, por las comidas y los planes que hemos compartido.

A mis padres y a mi hermano, por aguantar todos mis momentos de ansiedad, por ser mi refugio, mi lugar seguro y proporcionarme siempre esa confianza que a veces a mí me falta. Por creer en mi más que nadie, por ser el apoyo más grande que tengo y por darme alas, os lo debo todo a vosotros. A Javi, por ser mi compañero de vida, y por acompañarme una vez más durante estos cuatro años en este proyecto, por darme siempre los momentos de paz y de risas que necesito y por estar siempre al pie del cañón cuando lo he necesitado. A Gema, después de casi 20 años juntas has estado en los momentos más importantes de mi vida y este no iba a ser una excepción. Simplemente gracias por estar siempre a mi lado. A mis amigos de lo mejorcito, Ana Pavía, Ana Santos, Eddie, Sara, Mario, Eva, y sobre todo a Pili e Irene, por haber pasado las tres juntas y a la vez por esta etapa tan difícil. Es bonito haberos conocido durante la Universidad y terminar con vosotros la etapa académica. A vosotros os agradezco haber sido un pilar tan esencial durante todos estos años, por haber sido apoyo, diversión y reflexión, y sobre todo, por seguir compartiendo la vida juntos. Como bien decimos siempre, el sentimiento más grande que una persona puede sentir en la vida es la gratitud, por ello simplemente:

¡Gracias!

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS 1
SUMMARY 11
RESUMEN 15
INTRODUCCIÓN 19
I. DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS: PAPEL DE LAS INTEGRINAS Y SU REGULACIÓN POR ICAP-1 21
1. **El sistema inmune** 21
2. **Desarrollo linfoide** 21
2.1. Desarrollo de linfocitos T 22
2.1.1. Desarrollo de timocitos *single positive* 23
2.1.2. El factor de transcripción Runx3 25
2.1.3. Maduración de los timocitos T SP 25
2.2. Desarrollo de linfocitos B 27
2.2.1. Maduración de linfocitos B en el bazo 29
2.3. Señalización a través del TCR y de correceptores 32
2.4. Señalización por BCR y correceptores 34
3. **Migración linfocitaria hacia los órganos linfoides secundarios** 37
3.1. Quimioquinas implicadas en el tráfico linfoide 38
3.1.1. Eje CCR7/CCL19/CCL21 38
3.1.2. Eje CXCR4/CXCL12 38
3.1.3. Los receptores CXCR5 y S1PR1 en el tráfico linfocitario 39
3.2. Integrinas 40
4. **Regulación de la actividad de las integrinas** 41
4.1. La integrina α4β1 43
4.2. Estructura y función de ICAP-1 43
II. EL MIELOMA MÚLTIPLE Y MICRORNAS 45
1. **Epidemiología y características del mieloma múltiple** 45
2. **Origen y causas del MM** 46
3. **Interacción de las células de MM con el microambiente de la médula ósea** 46
4. **MicroRNAs: Estructura y función** 48
4.1. Papel de los microRNAs en mieloma múltiple 49
OBJETIVOS 51
MATERIALES Y MÉTODOS 55
Líneas celulares y muestras de pacientes 57
Reactivos y anticuerpos 57
Ratones 60
Citometría de flujo 61
Purificación de linfocitos mediante selección negativa y *cell sorting* 62
Western blotting 63
Fraccionamiento celular 63
Proliferación celular *in vitro* 63
Análisis de ciclo celular 64
Estimulación celular *in vitro* 64
Detección de la activación de $CD3_{\varepsilon}$ mediante el anticuerpo APA1/1 65
Ensayos de detección de Notch2 intracelular 65
Análisis de la proliferación celular *in situ* mediante detección de Ki67 por inmunofluorescencia 65

Ensayos de β-Galactosidasa 66
Detección de la apoptosis *in situ* mediante la técnica TUNEL 66
Ensayos de apoptosis *in vitro* 67
Ensayos de quimiotaxis 67
Inmunización T-independiente y ELISA 68
Ensayos de adhesión celular a FN-H89 68
Extracción de RNA para ensayos de RT-qPCR 69
Secuenciación de RNA de células MZB de bazo 71
Transfección transitoria mediante electroporación 71
Nucleofección de líneas celulares de MM 72
Ensayos de RT-qPCR de miRNAs 72
Secuenciación de miRNAs y análisis de datos 72
Análisis estadístico 73

RESULTADOS 75

1. Papel de ICAP-1 en el desarrollo de órganos linfoides primarios. 77
1.1. La ausencia de ICAP-1 no afecta al desarrollo de células madre y progenitoras hematopoyéticas, ni a la linfopoyesis B 77
1.2. Alteración del desarrollo de timocitos $CD8^+$ en ratones ICAP-$1^{-/-}$ 78
1.3. La deficiencia en el desarrollo de las células SP $CD8^+$ en ratones ICAP-$1^{-/-}$ es intrínseca de los timocitos 80
1.4. Papel de ICAP-1 en la maduración de los timocitos SP $CD8^+$ 82
1.5. Los timocitos SP $CD8^+$ en ratones ICAP-$1^{-/-}$ muestran una reducción de la expresión de *Runx3* 84

2. Papel de ICAP-1 en la maduración y función de linfocitos de órganos linfoides secundarios. 86
2.1. Distribución de células T periféricas en ratones deficientes en ICAP-1 86
2.2. Análisis de la proliferación y apoptosis de células T en bazos de ratones ICAP-$1^{-/-}$ 90
2.3. Análisis de la activación de linfocitos T deficientes en ICAP-1 96
2.4. Análisis de la expresión de moléculas de migración en linfocitos T de ratones deficientes en ICAP-1 98
2.5. Distribución de células B periféricas en ratones deficientes en ICAP-1 101
2.6. Análisis de la proliferación y apoptosis de células B en bazos de ratones ICAP-$1^{-/-}$ 105
2.7. Las células B de ratones deficientes en ICAP-1 muestran alteraciones en sus respuestas a estimulación 115
2.8. Análisis transcriptómicos de células MZB deficientes en ICAP-1 118
2.9. Expresión alterada de genes reguladores de la transcripción en células MZB de ratones ICAP-$1^{-/-}$ 120
2.10. Expresión de receptores linfocitarios y moléculas de señalización en células MZB deficientes en ICAP-1 122
2.11. Expresión de moléculas de migración y posicionamiento en linfocitos B de ratones deficientes en ICAP-1 126
2.12. Los bazos de ratones deficientes en ICAP-1 muestran una inducción de senescencia 132

3. Regulación de la expresión de miRNAs en la adhesión dependiente de la integrina α4β1 en células de mieloma múltiple. 134
3.1. Análisis diferencial de la expresión de miRNAs en células de MM adheridas a ligandos de α4β1 134
3.2. Aumento de expresión de miR-324-5p y miR-331-3p en células de MM tras adhesión a ligandos de la integrina α4β1 136
3.3. La inducción de la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p tras adhesión dependiente de α4β1 es dependiente de la activación de PI3K/Akt y ERK1/2 137

DISCUSIÓN 139

1. Papel de ICAP-1 en el desarrollo de los timocitos. 141

2. Papel de ICAP-1 en la maduración y función de linfocitos de órganos linfoides secundarios. 142

2.1. Distribución, proliferación y activación de linfocitos T periféricos en ratones deficientes en ICAP-1 142
2.2. Distribución y proliferación de linfocitos B periféricos en ratones ICAP-1$^{-/-}$ 144
2.3. Las células B de ratones ICAP-1$^{-/-}$ muestran alteraciones en su activación y en la expresión de moléculas de señalización y de receptores linfocitarios 146
2.4. La ausencia de ICAP-1 causa alteraciones en la expresión de moléculas reguladoras de la transcripción implicadas en el desarrollo de células MZB 147
2.5. La falta de ICAP-1 causa una alteración de la expresión de moléculas de migración y posicionamiento de linfocitos B 149
3. Regulación de la expresión de miRNAs en la adhesión dependiente de la integrina α4β1 en células de mieloma múltiple. 151
CONCLUSIONES 153
BIBLIOGRAFÍA 157
ANEXOS 189

ANEXO I: Rodríguez-García, Y., De Jesús Santos, A. P., Guerrero Moreno, M., Menéndez-García, M., García de Lacoba, M., Hurtado-Borrás, M., Aragón-Sanz, I., O'Loghlen, A., Teixidó, J. (2024). Lack of ICAP-1 causes defective proliferation and maturation of mouse spleen B cells. *European Journal of Immunology* (En revisión). 193

ANEXO II: Rodríguez-García, Y., Martínez-Moreno, M., Alonso, L., Sánchez-Vencells, A., Arranz, A., Dagà-Millán, R., Sevilla-Movilla, S., Valeri, A., Martínez-López, J., Teixidó, J. (2023). Regulation of miRNA expression by α4β1 integrin-dependent multiple myeloma cell adhesion. *EJHaem*, 4(3): 631–638. Doi: 10.1002/jha2.756. 231

ANEXO III: Sevilla-Movilla, S., Fuentes, P., Rodríguez-García, Y., Arellano-Sánchez, N., Krenn, P. W., de Val, S. I., Montero-Herradón, S., García-Ceca, J., Burdiel-Herencia, V., Gardeta, S. R., Aguilera-Montilla, N., Barrio-Alonso, C., Crainiciuc, G., Bouvard, D., García-Pardo, A., Zapata, A. G., Hidalgo, A., Fässler, R., Carrasco, Y. R., Toribio, M. L., Teixidó, J. (2022). ICAP-1 loss impairs CD8$^+$ thymocyte development and leads to reduced marginal zone B cells in mice. *European Journal of Immunology*, 52(8): 1228–1242. Doi: 10.1002/eji.202149560. 241

ANEXO IV: García-Ortiz, A., Rodríguez-García, Y., Encinas, J., Maroto-Martín, E., Castellano, E., Teixidó, J., Martínez-López, J. (2021). The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. *Cancers*, 13(2): 217. Doi: 10.3390/cancers13020217. 259

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de linfocitos T en el timo. 23
Figura 2. Desarrollo de los timocitos SP CD4$^+$ y CD8$^+$. 24
Figura 3. Maduración de timocitos SP. 26
Figura 4. Desarrollo de linfocitos B en la MO. 28
Figura 5. Estructura del bazo. 29
Figura 6. Células B transicionales y maduras del bazo. 31
Figura 7. Señalización celular tras activación del TCR. 33
Figura 8. Señalización dependiente de BCR. 35
Figura 9. Estructura de los LNs. 37
Figura 10. Regulación del tráfico de las células FOB y MZB por S1PR1 y CXCR5. 40
Figura 11. Familia de las integrinas. 41
Figura 12. Modelo de activación de las integrinas. 42
Figura 13. Estructura de ICAP-1α. 44
Figura 14. Microambiente de la MO en MM. 47
Figura 15. Formación de miRNAs y mecanismo de acción. 49
Figura 16. La linfopoyesis de células B en médula ósea no está afectada en ratones ICAP-1$^{-/-}$. 77
Figura 17. Poblaciones CD19$^+$ y B220$^+$ en MO. 78

Figura 18. Celularidad del timo en ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 78
Figura 19. Análisis de la población de timocitos DN. 79
Figura 20. Distribución de las poblaciones de timocitos DP y SP. 79
Figura 21. Expresión de ICAP-1 en subpoblaciones de timocitos. 80
Figura 22. Análisis de las poblaciones inmaduras y maduras CD8^{+} en timo. 80
Figura 23. Distribución de las poblaciones cTECs y mTECs en timo. 81
Figura 24. Análisis de poblaciones de timocitos en ratones quimeras. 82
Figura 25. La ausencia de ICAP-1 causa una maduración deficiente de los timocitos SP CD8^{+}. 83
Figura 26. Análisis de la expresión de CD3 en los timocitos SP y DP. 84
Figura 27. Reducción de la expresión de *Runx3d* en timocitos SP CD8^{+} en ratones ICAP-1$^{-/-}$. 85
Figura 28. Expresión endógena y transfectada de ICAP-1 en células Jurkat. 86
Figura 29. Comparación de la celularidad en bazos de ratones control y deficientes en ICAP-1. 87
Figura 30. Distribución de los linfocitos T CD4^{+} y CD8^{+} en bazo. 87
Figura 31. Distribución de los linfocitos T CD4^{+} y CD8^{+} en LNs. 88
Figura 32. Cuantificación de las poblaciones CD4^{+} y CD8^{+} en ratones quimeras. 89
Figura 33. Distribución de células CD8^{+} *naive*, memoria central y memoria efectora en bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 90
Figura 34. Análisis de la proliferación *in situ* de linfocitos CD4^{+} y CD8^{+}. 91
Figura 35. Análisis de la apoptosis *in situ* de linfocitos CD4^{+} y CD8^{+}. 92
Figura 36. Análisis de la proliferación *in vitro* de linfocitos T CD3^{+}. 93
Figura 37. Análisis del ciclo celular de linfocitos T estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. 93
Figura 38. Análisis de la proliferación *in vitro* de linfocitos T CD4^{+} y CD8^{+}. 94
Figura 39. Análisis de la apoptosis *in vitro* de células CD3^{+} de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 95
Figura 40. Cuantificación de la apoptosis *in vitro* de células CD3^{+} de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 95
Figura 41. Análisis del marcaje de linfocitos CD3^{+} con el anticuerpo anti-CD3$_{\varepsilon}$ APA1/1. 96
Figura 42. Análisis de la activación de Akt y ERK1/2 tras estimulación de linfocitos CD3^{+}. 97
Figura 43. Análisis de la expresión de CD69 en linfocitos T estimulados. 97
Figura 44. Expresión de CD5 en linfocitos CD4^{+} y CD8^{+} de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 98
Figura 45. Expresión de CXCR4 en linfocitos CD4^{+} y CD8^{+} de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 99
Figura 46. Expresión de CXCR4 en linfocitos T de LNs de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 99
Figura 47. Expresión de CCR7 en linfocitos CD4^{+} y CD8^{+} de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 100
Figura 48. Expresión de S1PR1 en linfocitos T de LNs de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 100
Figura 49. Expresión de CXCR5 en linfocitos T de LNs de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 101
Figura 50. Análisis de las células B inmaduras B220^{+}CD93^{+} en bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 102
Figura 51. Estrategia de *gating* de las poblaciones de linfocitos B transicionales y maduros en bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 103
Figura 52. Cuantificación de las poblaciones transicionales y maduras de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 103
Figura 53. Análisis de los folículos de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 104
Figura 54. Cuantificación de las poblaciones CD19^{+}, FOB y MZB en bazos de ratones quimeras. 105
Figura 55. Análisis de la proliferación *in situ* de linfocitos CD19^{+}. 106
Figura 56. Análisis de la distribución de la proliferación en folículos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 106
Figura 57. Análisis *in situ* de la apoptosis de linfocitos B CD19^{+}. 107
Figura 58. Análisis de la distribución de la apoptosis *in situ* en folículos de bazo. 108
Figura 59. Análisis de apoptosis *in vitro* de células B CD19^{+} de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$

e ICAP-1$^{-/-}$. 109
Figura 60. Cuantificación de la apoptosis *in vitro* de células CD19^{+} de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 109
Figura 61. Análisis de la producción de IgM e IgG tras inmunización T-independiente en ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 110
Figura 62. Generación de blastos de linfocitos B de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ tras proliferación en presencia de anti-IgM+IL-4. 111
Figura 63. Proliferación de linfocitos B en presencia de αIgM+IL-4. 111
Figura 64. Cuantificación de la proliferación *in vitro* de linfocitos B en presencia de αIgM+IL-4. 112
Figura 65. Análisis del ciclo celular de linfocitos B estimulados con anti-IgM+IL-4. 112
Figura 66. Generación de blastos de linfocitos B de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ tras proliferación en presencia de anti-CD40+IL-4 o LPS. 113
Figura 67. Proliferación de linfocitos B en presencia de αCD40+IL-4 o LPS. 114
Figura 68. Cuantificación de la proliferación *in vitro* de linfocitos B en presencia de αCD40+IL-4 o LPS. 114
Figura 69. Análisis de la expresión de CD69 y CD86 en células B tras estimulación con anti-IgM. 115
Figura 70. Expresión de CD69 y CD86 en células B tras estimulación con anticuerpos anti-CD40 o LPS. 116
Figura 71. Cuantificación de la expresión de CD69 y CD86 en células B tras estimulación con anticuerpos anti-CD40 o LPS. 117
Figura 72. Activación de Akt y ERK1/2 en linfocitos B tras estimulación con anti-IgM. 118
Figura 73. Análisis de la expresión subcelular de ICAP-1 en linfocitos B CD19^{+}. 118
Figura 74. *Cell sorting* de células MZB y FOB de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 119
Figura 75. Análisis del RNAseq de células MZB. 119
Figura 76. Análisis comparativo de la expresión de genes reguladores de la transcripción en células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 120
Figura 77. Expresión de Notch2 en linfocitos B transicionales y maduros de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 121
Figura 78. Expresión diferencial de *Klf2* y *Zfp36l1* en células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 121
Figura 79. Reducción de la expresión de *Ebf1*, *Pax5* y *Ets1* en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$. 122
Figura 80. Análisis de la expresión de genes de receptores linfocitarios en células MZB. 123
Figura 81. Expresión de BAFFR en linfocitos B de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 123
Figura 82. Análisis comparativo de la expresión de CD19 en linfocitos B de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 124
Figura 83. Análisis de la expresión de CD40 y CD1d en linfocitos B de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 124
Figura 84. Expresión de genes implicados en señalización celular y apoptosis en células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 125
Figura 85. Distribución de poblaciones de células B en sangre periférica de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 126
Figura 86. Distribución de células B en LNs de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 127
Figura 87. Análisis de la expresión diferencial de genes de adhesión y migración en células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 127
Figura 88. Análisis de la expresión de S1PR1 en células FOB y MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 128
Figura 89. Expresión de CXCR5 en linfocitos FOB y MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 128
Figura 90. Análisis de la expresión de S1PR1 y CXCR5 en linfocitos de LNs de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 129
Figura 91. Quimiotaxis de linfocitos FOB y MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ en respuesta a CXCL13. 129
Figura 92. Expresión de CXCR4 en linfocitos B de bazo y LNs de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e

ICAP-1$^{-/-}$. 130
Figura 93. Expresión de β1, β2 y α4 en linfocitos B de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. 131
Figura 94. Expresión de genes de adhesión y migración en células MZB. 132
Figura 95. Análisis de senescencia en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$. 133
Figura 96. Análisis de coexpresión de actividad β-Galactosidasa y de LaminB1. 133
Figura 97. Adhesión de células de MM dependiente de la integrina α4β1. 134
Figura 98. Secuenciación de miRNAs en células NCI-H929, MM.1S y U266 en suspensión y adheridas a FN-H89. 135
Figura 99. Inducción de la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p tras adhesión de células de MM mediada por α4β1. 137
Figura 100. Expresión de miR-324-5p y miR-331-3p en muestras de MO de pacientes con MM. 137
Figura 101. Señalización celular requerida para el aumento de expresión de miRNAs tras adhesión de células de MM dependiente de α4β1, e identificación del módulo miR-324-5p-*SMO* regulado por dicha adhesión. 138
Figura 102. Modelo de la actividad de ICAP-1 en linfocitos de bazo. 150

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos conjugados, primarios y secundarios empleados en citometría de flujo. 57
Tabla 2. Anticuerpos empleados en *Western blotting*. 59
Tabla 3. Anticuerpos conjugados, primarios y secundarios empleados en ensayos de inmunofluorescencia. 59
Tabla 4. Ciclos de PCR para el genotipado de los ratones ICAP-1. 60
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para el genotipado de los ratones ICAP-1. 60
Tabla 6. Condiciones de inmunofluorescencia para la detección de la proliferación *in situ*. 66
Tabla 7. Condiciones de inmunofluorescencia para ensayos TUNEL. 67
Tabla 8. Programa de ciclos empleados durante el análisis de expresión de mRNAs por qPCR. 69
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de qPCR. 70
Tabla 10. Secuencias de oligonucleótidos de miRNAs utilizados en la qPCR. 72
Tabla 11. Expresión diferencial de miRNAs en células de MM dependiente de la adhesión mediada por α4β1. 136

ABREVIATURAS

A

ACK *Ammonium-Chloride-Potassium,* amonio-cloruro-potasio
ADAM-10 *A Metalloproteinase and Desintegrin-10*, metaloproteinasa A y disintegrina-10
ADAP *Adhesion and degranulation-promoting adaptor protein*, proteína adaptadora promotora de degranulación y adhesión
Ago *Argonaute protein*, proteína argonauta
Aiolos *Ikaros family zinc finger protein 3 (IKZF3)*, proteína de dedos de zinc 3 de la familia Ikaros
AIRE *Autoimmune regulator*, regulador autoinmune
Akt *Protein kinase B*, proteína quinasa B
ANOVA *Analysis of variance*, análisis de varianza
APC *Allophycocyanin*, aloficocianina
APCs *Antigen presenting cells*, células presentadoras de antígeno
APRIL *A Proliferation inducing ligand*, ligando A inductor de proliferación
ATP *Adenosine triphosphate*, adenosina trifosfato

B

BAFF *B-cell activating factor*, factor activador de células B
BAFFR *BAFF receptor*, receptor de BAFF
Bcl-2 *B-cell lymphoma 2*, linfoma 2 de células B
Bcl-xl *B-cell lymphoma-extra-large*, linfoma de células B extragrande
BCMA *B cell maturation antigen*, antígeno de maduración de células B
BCR *B cell receptor*, receptor de células B
Blnk *B cell linker protein*, proteína de enlace de células B
BM *Bone marrow*, médula ósea
BRAF *B-rapid accelerated fibrosarcoma oncogene*, oncogén B de fibrosarcoma rápidamente acelerado
BrdU *5-bromo-2'-deoxyuridine*, 5-bromo-2-desoxiuridina
BSA *Bovine serum albumin*, albúmina de suero bovino
Btk *Bruton's tyrosine kinase*, tirosina quinasa de Bruton

C

CAM-DR *Cell adhesion mediated drug resistance*, resistencia a fármacos mediada por adhesión celular
CaMKII *Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II*, proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+}/calmodulina
CAR-T *Chimeric antigen receptor T-cells*, células T con receptor de antígeno quimérico
Cas-L *Crk-associated substrate lymphocyte type*, sustrato de linfocito de tipo asociado a Crk
Casp3 *Caspase 3*, caspasa 3
CBFβ *Core binding factor β*, factor de unión nuclear β
CBMSO Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
CCK8 *Cell counting kit-8*, kit de recuento celular 8
CCM1 *Cerebral Cavernous Malformation 1 protein*, proteína de malformación cavernosa cerebral 1
CCND1-3 *Cyclin D1-3*, ciclina D1-3
CCR1-7 *CC-chemokine receptor 1-7*, receptor de quimioquinas CC 1-7
CD- *Cluster of differentiation*, clúster de diferenciación
CD1d *Cluster of differentiation 1d*, clúster de diferenciación 1d
Cdc42 *Cell Division Cycle 42 protein*, proteína de división del ciclo celular 42
CDKN2 *Cyclin dependent kinase inhibitor 2,* inhibidor dependiente de quinasa de ciclina 2
cDNA *Complementary deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

	complementario
CIB-MS	Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas
CLP	*Common lymphoid progenitor*, progenitor linfoide común
CNB	Centro Nacional de Biotecnología
CNIC	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CNS	*Conserved noncoding sequence*, secuencias conservadas no codificantes
CS-1/FN	Fragmento de la fibronectina que contiene la región CS-1
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c-Src	*Avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*, homólogo del oncogén viral del sarcoma aviar (Schmidt-Ruppin A-2)
Ct	*Cycle threshold*, umbral de ciclos
cTECs	*Cortical thimic epithelial cells*, células epitaliales tímicas corticales
CTL	*Cytotoxic T lymphocyte*, linfocito T citotóxico
CTLA-4	*Cytotoxic T lymphocyte antigen-1*, antígeno 1 de linfocito T citotóxico
CTV	*Cell Tracer Violet*, trazador celular violeta
CUEDC2	*CUE domain containing protein 2*, proteína 2 que contiene el dominio CUE
CXCL12, 13	*C-X-C motif chemokine receptor ligand*, ligando 12 o 13 del receptor de quimioquinas con motivo C-X-C
CXCR-	*C-X-C motif chemokine receptor*, receptor de quimioquinas con motivo C-X-C

D

DAPI	*4′,6-diamidino-2-phenylindole*, 4',6-diamidino-2-fenilindol
DCs	*Dendritic cells*, células dendríticas
DEG	*Differential expressed genes*, genes de expresión diferencial
DLL-1, 4	*Delta-like ligand 1 or 4*, ligandos similares a delta 1 o 4
DN	*Double negative cells*, células doblemente negativas
DNA	*Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico (ADN)
dNTPs	*Deoxynucleotide triphosphates*, desoxinucleótidos trifosfato
DP	*Double positive cells,* células dobles positivas $CD4^+CD8^+$
DTT	*Dithiothreitol*, ditiotreitol
Dtx1	Deltex-1
dUTP	*Deoxyuridine triphosphate*, deoxiuridina trifosfato

E

E2A	*E-protein 2A*, proteína E 2A
Ebf1	*Early B cell factor 1*, factor temprano de células B 1
ECM	*Extracellular matrix*, matriz extracelular
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid***,** ácido etilendiaminotetraacético
EGF	*Epidermal growth factor*, factor de crecimiento epidérmico
Egr1	*Early growth response 1*, respuesta de crecimiento temprana 1
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EMM	*Extramedullary multiple myeloma*, mieloma múltiple extramedular
ERK1/2	*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*, quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares
Ets1	*Erythroblast transformation specific proto-oncogene 1 transcription factor*, factor de transcripción del protooncogén de transformación específica de eritroblastos 1

F

FACS	*Fluorescent activated cell sorting*, clasificación celular activada por fluorescencia

Fas-L *Factor of apoptosis stimulating ligand*, ligando del factor estimulador de la apoptosis
FBS *Fetal bovine serum*, suero fetal bovino
FC *Fold change*, cambio relativo
FDC *Follicular dendritic cell*, célula dendrítica follicular
FDR *False Discovery Rate*, tasa de falsos descubrimientos
FGF3 *Fibroblast growth factor*, factor de crecimiento fibroblástico
FITC *Fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína
FN *Fibronectin*, fibronectina
FN-H89 Fragmento recombinante de la fibronectina que contiene la región CS-1
FOB *Follicular B cells*, células B foliculares
FPKM *Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions base pairs sequenced*, fragmentos de secuencia transcrita por kilobase por millones de pares de bases secuenciadas
FRCs *Fibroblastic reticular cells*, células reticulares fibroblásticas

G

GAPDH *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GATA3 *GATA sequence binding protein 3*, proteína 3 de unión a la secuencia GATA
GC *Germinal centre*, centro germinal
GFP *Green fluorescent protein*, proteína fluorescente verde
Gli *Glioma*
gMFI *Geometric mean fluorescence intensity*, intensidad de fluorescencia media geométrica
GO *Gene Ontology*, ontología de genes
GPCR *Chemokine-occupied G-protein coupled receptors*, receptores acoplados a proteínas G ocupadas por quimioquinas
Gpr174 *G protein-coupled receptor 174*, receptor acoplado a proteína G 174
Gpx4 *Glutathione peroxidase 4*, glutation peroxidasa 4
Grb2 *Growth factor receptor-bound protein 2*, Proteína 2 ligada a receptores de factores de crecimiento
GRCm38 *Genome reference consortium Mus musculus version 38*, versión 38 del consorcio de genoma de referencia de *Mus musculus*
GST *Gluthation sulphur transferase*, transferasa de azufre a glutatión
GTP *Guanosine triphosphate*, guanosina trifosfato
GTPasa *Guanosine triphosphatase*, trifosfatasa de guanosina

H

HEPES *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-Piperazinetanosulfónico
Hes1, 5 *Hairy and Enhancer of Split 1 or 5*, potenciador y piloso de la división 1 o 5
HEVs *High endotelial venules*, vénulas altas endoteliales
Hh *Hedgehog pathway*, vía de señalización Hedgehog
HPSCs *Hematopoietic stem progenitor cells*, células madre progenitoras hematopoyéticas
HRP *Horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano
HSA *Heat stable antigen*, antígeno termoestable
HSCs *Hematopoietic stem cells*, células madre hematopoyéticas

I

ICAM-1 *Intercellular adhesion molecule 1*, molécula de adhesión intercelular 1
ICAP-1 *Integrin cytoplasmic-domain associated protein 1*, proteína 1 asociada al dominio citoplásmica de la integrina

Id2	*Inhibitor of DNA binding 2*, inhibidor de unión a ADN 2
IFN	*Interferon*, interferón
Ig	*Immunoglobulin*, inmunoglobulina
IgH	*Immunoglobulin heavy chain*, cadena pesada de inmunoglobulina
IgL	*Immunoglobulin light chain*, cadena ligera de inmunoglobulina
Ikzf3	*Ikaros family zinc finger protein 3 (IKZF3)*, proteína de dedos de zinc 3 de la familia Ikaros
IL-	*Interleukin*, interleucina
IL-7R	*Interleukin 7 receptor*, receptor 7 de la interleucina 7
IP	*Propidium iodide*, Ioduro de propidio
ISP	*Immature single positive cells*, células inmaduras simples positivas
ITAM	*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, motivo de activación basado en inmunoreceptor de tirosina
Itg	*Integrin*, integrina
ITIM	*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*, motivo de inhibición basado en inmunoreceptor de tirosina
Itk	*IL-2 inducible T cell kinase*, quinasa de células T inducible por IL-2

J

JAK	*Janus kinase*, quinasa Janus
JNK	*c-Jun N-terminal kinases*, quinasas N-terminales de c-Jun

K

kDa	Kilo Dalton
KEGG	*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, enciclopedia Kyoto de genes y genomas
Klf2	*Krüppel-like Factor 2*, factor 2 similar a Krüppel
KRAS	*Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*, homólogo del oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten
Krit1	*K-rev interaction trapped 1 protein*, proteína de interaccion K-rev atrapada 1

L

LacZ	*Lactose operon*, operón lactosa
LAT	*Linker for the activation of T cells*, enlazador de activación de células T
LCK	*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*, proteína tirosina quinasa específica de linfocito
LFA-1	*Lymphocyte function-associated antigen 1*, antígeno asociado a función linfocítica 1
LN	*Lymph node*, nódulo linfático
LPS	*Bacterial lipopolysaccharide*, lipopolisacárido bacteriano de *Escherichia coli*
LSK	Lin, Sca-1, c-Kit
Lyn	*Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase*, proteína novel tirosina quinasa similar a *Lck/Yes*

M

M1	*Mature cells type 1*, células maduras de tipo 1
M2	*Mature cells type 2*, células maduras de tipo 2
Maf	*Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene homolog*, oncogén homólogo del fibrosarcoma musculo-aponeurótico
MAPK	*Mitogen-Activated Protein Kinases,* proteínas quinasas de activación
MCL-1	*Myeloid cell leukemia-1*, leucemia de célula mieloide 1
MDR1	*Multidrug resistance protein 1*, proteína de resistencia a múltiples fármacos 1

MFI *Mean fluorescence intensity*, intensidad media de fluorescencia
MGUS *Monoclonal gammopathy of undetermined significance*, gammapatía monoclonal de significado indeterminado
MHC-I, II *Major histocompatibility complex I or II*, complejo mayor de histocompatibiloidad de tipo I o II
MIDAS *Metal ion-dependent adhesion site*, sitio de adhesión dependiente de iones metálicos
MiRISC *microRNA-induced silencing complex*, complejo de silenciamiento inducido por microRNA
MiRNA *MicroRNA*, microARN
MM Mieloma múltiple
MNT *Mature naive T cells*, células T novatas maduras
MO Médula ósea
MOMA *Monocyte to macrophage differentiation associated protein*, proteína asociada a diferenciación de monocitos a macrófagos
MPP *Multipotent progenitors*, progenitores multipotentes
mRNA *Messenger ribonucleic acid,* ácido ribonucleico mensajero
MRP *Multidrug resistance associated protein 1*, proteína asociada a resistencia de múltiples fármacos 1
mTECs *Medular thymic epithelial cells*, células epitaliales tímicas medulares
mTOR *Mammalian target of rapamycin*, diana en mamíferos de rapamicina
MYB *Myeloblastosis aviar virus oncogen*, oncogén del virus de mieloblastosis aviar
Myc *Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*, homólogo del oncogén viral de mielocitomatosis aviar
MZ *Marginal zone*, zona marginal
MZB *Marginal zone B cells*, células B de la zona marginal
Mzb1 *Marginal zone B and B-1 cell-specific protein*, proteína especifica de células de la zona marginal y B-1

N

Nck *Non-catalytic region of tyrosine kinase*, región no catalítica de la tirosina quinasa
Nedd9 *Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9*, precursor neural 9 expresado celular regulado a la baja en el desarrollo
NF-kB *Nuclear factor kB*, factor nuclear kB
NGS *Normal goat serum*, suero normal de cabra
NGS *Next Generation sequencing*, secuenciación de próxima generación
NK *Natural killer cell*, célula asesina natural
NLS *Nuclear localization signal*, señal de localización nuclear
Nm23-H2 *Nucleoside diphosphate kinase protein*, proteína nucleósido difosfato quinasa
Notch1, 2 *Neurogenic locus notch homolog protein 1 or 2*, proteína homóloga del locus neurogénico Notch 1 o 2
Notch2-ICD *Notch2 intracellular domain*, dominio intracelular de Notch2
NPLY Secuencia Asn-Pro-Leu-Tyr
NPxY Secuencia Asn-Pro-x-Tyr
NRAS *Neuroblastoma Rat Sarcoma viral oncogene homolog*, homólogo del oncogén viral de sarcoma de neuroblastoma de rata

O

O.D *Optical density*, densidad óptica
OLS *Secondary lymphoid organs*, órganos linfoides secundarios
OncomiR *Oncogenic microRNA*, microARN oncogénico
ORA *Over-representation analysis*, análisis de sobre representación

P

p53 *Tumor supressor protein p53*, proteína supresora tumoral p53
PALS *Periarteriolar lymphoid sheath*, vaina linfoide periarteriolar
Pax5 *Paired box protein 5*, proteína de caja emparejada 5
Pb *Base pairs*, pares de bases
PBS *Phosphate buffered saline*, tampón fosfato salino
PCR *Polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa
PD-1 *Programmed death-1 protein*, proteína de muerte programada 1
PD-L1 *Programmed death-1 protein ligand*, ligando de proteína de muerte programada 1
PE *Phycoerythrin*, ficoeritrina
PE-Cy7 *Phycoerythrin-Cyanine 7 tandem*, tándem ficoeritrina-cianina 7
pEGFP *Plasmid enhanced green fluorescent protein*, plásmido de proteína fluorescente verde mejorada
PerCP-Cy5.5 *Peridinin-chlorophyll-protein complex cyanine 5.5*, complejo peridinina-clorofila-proteína cianina 5.5
PFA *Paraformaldehyde*, paraformaldehído
PI3K *Phosphoinositide 3-kinase*, fosfatidilinositol 3-quinasa
PKA *Protein kinase A*, proteína quinasa A
PKC *Protein kinase C*, proteína quinasa C
PLC *Phospholipase C*, fosfolipasa C
pMHC *Peptide major histocompatibility complex*, péptido en el complejo mayor de histocompatibilidad
Pre-BCR *BCR precursor*, precursor de BCR
Pre-miRNA *Precursor microRNA,* microARN precursor
Pre-MZB *Pre-marginal zone B cells*, células precursoras de células B de la zona marginal
Pre-TCR *TCR precursor*, precursor de TCR
Pri-miRNA *Primary microRNA*, microARN primario
PSGL1 *P-selectin glicoprotein 1*, glicoproteína 1 de P-selectina
PTB *Phosphotyrosine binding domain*, dominio de unión a fosfotirosina
Ptch1 *Patched 1*
PTEN *Phosphatase and Tensin Homolog*, homólogo de fosfatasa y tensina
PVDF *Polyvinylidene difluoride*, difluoruro de polivinilideno

Q

qPCR *Quantitative polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

R

Rac *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*, sustrato de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras
Rad Unidad de dosis absorbida de radiación ionizante
RAG *Recombination Activating Gene*, gene de activación de recombinación
RAN-GTP *Ras-related nuclear protein-guanosine triphosphate*, proteína nuclear asociada a Ras guanosina trifosfato
RANKL *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*, ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B
Rap1 *Ras-related protein 1*, proteína relacionada con Ras 1
Ras *Rat sarcoma*, sarcoma de rata
Rb *Retinoblastoma*, retinoblastoma
RBP-Jk *Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*,

	proteína de unión a la señal de recombinación para la región J de la cadena kappa de inmunoglobulina
RGD	*Arginylglycylaspartic acid sequence*, secuencia de ácido arginil glicil aspártico
Rgs13	*Regulator of G-protein signaling 13*, proteína reguladora de señalización de proteínas G 13
RNA	*Ribonucleic acid*, ácido ribonucleico (ARN)
RNAseq	*RNA sequencing*, secuenciación de ARN
RNU44	*Small nucleolar RNA 44*, RNA nucleolar pequeño
RORγt	*Retinoic acid-related orphan receptor gamma thymus-specific isoform*, isoforma específica del timo del receptor huérfano gamma relacionado con ácido retinoico
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI-1640	*Roswell Park Memorial Institute medium*, medio Instituto Conmemorativo Parque Roswell
RT	*Room temperature,* temperatura ambiente
RTE	*Recent thymic emigrants*, emigrantes recientes de timo
RT-qPCR	*Real time quantitative polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
Runx1, 3	*Runt-related transcription factor 1 or 3*, factor de transcripción 1 o 3 relacionado con Runt
Runx3d	*Distal Runt-related transcription factor 3*, factor de transcripción 3 relacionado con Runt distal

S

S1P	*Spinghosine-1-phosphate*, esfingosina-1-fosfato
S1PR1, 3	*Spinghosine-1-phosphate receptor 1 or 3*, receptor de esfingosina-1 o 3-fosfato
SA-β-Gal	*Senescence-associated β-galactosidase activity*, actividad β-galactosidasa asociada a senescencia
SAM68	*RNA-binding protein Src-associated in mitosis of 68 kD*, proteína de union a ARN de 68 kD asociada a Src en mitosis
Sca-1	*Stem cell antigen-1*, antígeno de células madre 1
SD	*Standard deviation*, desviación estándar
SDF-1	*Stromal cell-derived factor 1*, factor derivado de células del estroma 1
SDS	*Sodium dodecyl sulfate*, dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	*Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, electrophoresis de gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico
SEM	*Standard error of the mean*, error estándar de la media
SH2, 3	*Src-homology 2 or 3 domains*, dominios homólogos de Src 2 o 3
siRNA	*Silencing RNA*, ARN de silenciamiento
SLP-65, 76	*(SH)2 domain–containing leukocyte phosphoprotein of 65 or 76 kDa*, fosfoproteína leucocitaria de 65 o 76 kDa que contiene dominios SH2
SM	*Semimature cells*, células semimaduras
SMM	*Smoldering multiple myeloma*, mieloma múltiple incipiente
SMO	*Smoothened*
Smurf1	*Smad ubiquitination regulatory factor 1*, factor 1 de regulación de la ubiquitinación de Smad
SOCS1	*Suppresor of cytokine signalling 1*, supresor de señalización de citoquinas 1
SP	Sangre periférica
SP	*Single positive cells,* células simples positivas $CD4^+$ o $CD8^+$
Src	*Sarcoma tyrosine kinase*, tirosina quinasa de sarcoma
STAT3, 5	*Signal transducer and activator of transcription 3 or 5*, transductor de señal y activador de transcripción 3 o 5
SWAP-70	*Switch-associated protein 70*, proteína 70 asociada a interruptor
Syk	*Spleen-associated tyrosine kinase*, tirosina quinasa asociada a bazo

T

T1, 2, 3	*Transitional 1, 2 or 3 B cells*, células B transicionales 1,2 o 3
TAOK	*Thousand and one kinase*, quinasa mil uno
T-bet	*T-box expressed in T cells*, caja-T expresada en células T
TBP	*TATA sequence Binding Protein*, proteína de unión a la secuencia TATA
TBS	*Tris-buffered saline*, tampón salino Tris
Tcf3	*T cell factor 3*, factor 3 de células T
T_{CM}	*T central memory cells*, células T memoria centrales
TCR	*T cell receptor*, receptor de células T
TdT	*Terminal deoxynucleotidyl transferase*, enzima terminal deoxinucleotidil transferasa
TEC	*Thymic epithelial cells*, células epitaliales tímicas
T_{EM}	*T effector memory cells*, células T memoria efectoras
Th	*T helper lymphocyte*, linfocito T ayudante
ThPOK	*T-helper-inducing POZ/Krüppel-like factor*, factor similar a POZ/Krüppel inductor de célula T ayudante
TLR4	*Toll-like receptor 4*, receptor de tipo Toll 4
TNF	*Tumor necrosis factor*, factor de necrosis tumoral
Tnfsrf13c	*TNF superfamily member 13c*, miembro 13c de la superfamilia de TNF
TNP-BSA	*2,4,6-Trinitrophenyl-BSA,* 2,4,6-Trinitrofenil-BSA
TNP-Ficoll	*2,4,6-Trinitrophenyl-ficoll,* 2,4,6-Trinitrofenil-ficoll
Treg	*T regulatory cell*, célula T reguladora
T_{RM}	*T resident memory cells*, células T memoria residentes
TS-miR	*Tumoral supressor microRNA*, microARN supresor tumoral
t-SNE	*t-Distributed stochastic neighbor embedding*, incrustación estocástica de vecinos distribuida en t
TUNEL	*TdT dependent dUTP–biotin nick end labeling staining*, tinción de dUTP-biotina etiquetado en el extremo de la muesca dependiente de TdT

U

UTR	*Untranslated region*, región no traducida

V

Vav1	*Vav guanine nucleotid exchange factor 1*, factor 1 de intercambio de nucleótido de guanina vav
VCAM-1	*Vascular cell adhesion molecule 1,* molécula de adhesión celular vascular 1
VEGF	*Vascular endothelial growth factor,* factor de crecimiento endotelial vascular
VLA-4	*Very late antigen 4*, antígeno muy tardío 4

Z

ZAP-70	*Zeta chain associated protein quinase of 70 kDa*, proteína 70 kDa asociada a la cadena zeta del TCR
Zfp36l1	*Zinc finger protein 36 like-1*, proteína de dedos de zinc 36 similar 1

SUMMARY

INTRODUCTION

After the early stages of differentiation in the bone marrow (BM), T lymphoid progenitors lodge in the thymus, where they complete their differentiation and maturation. On the other hand, B lymphocytes migrate as immature cells to the spleen, completing in this organ their differentiation and maturation to FOB or MZB cells. The α4β1 integrin is expressed in T and B lymphocytes, and plays important roles during lymphoid development as well as in the migration of lymphocytes to sites of inflammation. α4β1 can be activated by activator proteins such as talin or kindlin-3, which interact with the cytoplasmic domain of β1 subunits of integrins. Instead, α4β1 activation is inhibited by ICAP-1, a protein that competes with talin or kindlin-3 for binding to the aforementioned β1 domain, resulting in inhibition of cell adhesion. Additionally, ICAP-1 contains a nuclear localization sequence that enables its translocation to the nucleus, suggesting its potential involvement in gene regulation. All these data raise the possibility that ICAP-1 could regulate lymphocyte development and function.

Multiple myeloma (MM) is characterized by the uncontrolled expansion of malignant plasma cells in the BM. The α4β1-mediated adhesion of MM cells to the BM microenvironment promotes their survival and the progression of MM. MicroRNAs control tumor progression, acting as activators or suppressors at different stages of the tumoral process. The role of α4β1-mediated MM cell adhesion in regulating microRNA expression has not been studied.

OBJECTIVES

- Role of ICAP-1 in thymocyte development.
- Role of ICAP-1 in the maturation and function of lymphocytes in secondary lymphoid organs.
- Regulation of miRNAs expression upon α4β1 integrin-dependent adhesion of multiple myeloma cells.

RESULTS

In the first objective, we demonstrated that thymi of ICAP-1-null mice exhibit a reduction of SP $CD8^+$ $TCR\alpha\beta^+$ cells at the SM, M1 and M2 maturation stages. The reduction of SP $CD8^+$ thymocytes directly correlated with a decreased expression of Runx3, a transcription factor required for the development of SP $CD8^+$ thymocytes.

In the second objective, we showed that $CD4^+$ and $CD8^+$ cells from spleens of ICAP-$1^{-/-}$ mice exhibit reduced proliferation and apoptosis *in situ*. Similarly, ICAP-1-deficient $CD3^+$ cells, particularly $CD8^+$ cells, displayed diminished *in vitro* proliferation in response to anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, which correlated with a lower percentage of $CD3^+$ cells in the G2/M phase of the cell cycle. Spleens from ICAP-$1^{-/-}$ mice showed a reduction of MZB lymphocytes associated with an increase in the frequency of the pre-MZB cell population. Furthermore, ICAP-1-deficient $CD19^+$ B lymphocytes exhibited reduced Ki67 labeling and decreased *in situ* apoptosis. Likewise, ICAP-1-deficient FOB and MZB cells showed impaired *in vitro* proliferation in response to different stimuli. Additionally, the reduced proliferation of ICAP-1-deficient spleen $CD19^+$ B cells was associated with a lower percentage of these cells in the G2/M phase of the cell cycle. Notably, the absence of ICAP-1 in MZB cells translated into a deficiency of the Notch2 pathway, a protein required for MZB cell differentiation, which correlated with increased expression of *Klf2*. Furthermore, MZB cells from ICAP-$1^{-/-}$ spleens expressed reduced levels of *Blnk* and *Gpr174*, which might represent a mechanism linked to the reduced expression of CD86 in these cells after stimulation with anti-IgM. In

addition, ICAP-1-deficient FOB and MZB cells showed lower expression of S1PR1 and CXCR5 than control cells, and defective chemotaxis towards CXCL13, the CXCR5 ligand. Finally, spleens of ICAP-1$^{-/-}$ mice exhibited an induction of senescence compared to control spleens.

In the third objective, we identified the differential expression of 40 miRNAs between MM cells in suspension and adhered via α4β1, including miR-324-5p and miR-331-3p. These miRNAs showed heterogeneous expression in MM patients at diagnosis. Silencing the α4 subunit of α4β1 resulted in a reduction of both MM cell adhesion and expression of miR-324-5p and miR-331-3p. Inhibition of the MAPK and PI3K/Akt pathways reduced α4β1-mediated adhesion of MM cells, as well as the expression of miR-324-5p and miR-331-3p. Finally, miR-324-5p silencing in MM cells adhered to α4β1 ligands caused an increase in *SMO* expression of the Hedgehog pathway.

CONCLUSIONS

The absence of ICAP-1 alters the maturation of SP CD8^{+} thymocytes, resulting in a decrease in their frequency in thymus. Deficiency of SP CD8^{+} thymocytes in ICAP-1$^{-/-}$ thymi correlates with reduced expression of *Runx3*. Lack of ICAP-1 causes inhibition of proliferation and apoptosis of T and B lymphocytes, which is associated with the induction of senescence in spleens of these mutant mice. The reduction of MZB cells in ICAP-1-deficient spleens correlates with an increased proportion of pre-MZB cells, suggesting an altered transition from pre-MZB to MZB stage. MZB cells from ICAP-1-null spleens show a marked reduction in the expression of Notch2, a protein required for MZB cell development, which might constitute one of the mechanisms responsible for the deficit of the MZB cells. Additionally, the lack of ICAP-1 causes a reduction in the expression of S1PR1 and CXCR5 in FOB and MZB cells, which is associated with a defective chemotaxis towards CXCL13.

α4β1-mediated adhesion of MM cells results in increased expression of miR-324-5p and miR-331-3p, a response which is dependent on PI3K/Akt and ERK1/2 activation. Increased expression of miR-324-5p represses *SMO* expression of the Hedgehog pathway.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Tras las primeras etapas de diferenciación en la médula ósea (MO), los progenitores linfoides T se alojan en el timo, donde completan su diferenciación y maduración, mientras que los linfocitos B migran como células inmaduras hacia el bazo, finalizando en este órgano su diferenciación y maduración a células FOB o MZB. La integrina α4β1 se expresa en linfocitos T y B, y juega un importante papel durante el desarrollo linfoide, así como en la migración de los linfocitos a lugares de inflamación. La activación de α4β1 puede ser positivamente regulada por proteínas activadoras como talina o kindlin-3, las cuales interaccionan con el dominio citoplásmico de las subunidades β1 de las integrinas. Por otra parte, la activación de α4β1 se inhibe por ICAP-1, una proteína que compite con talina y kindlin-3 por la unión al citado dominio de β1, lo que se traduce en la inhibición de adhesión celular. ICAP-1 contiene asimismo una secuencia de localización nuclear que permite su translocación al núcleo, lo que sugiere su posible implicación en regulación génica. Todos estos datos abren la posibilidad de que ICAP-1 pudiera regular el desarrollo y función linfocitaria.

El mieloma múltiple (MM) se caracteriza por la expansión incontrolada de células plasmáticas malignas en la MO. La adhesión mediada por α4β1 de las células de MM al microambiente medular favorece su supervivencia y la progresión del MM. Los microRNAs controlan la progresión tumoral, actuando como activadores o supresores en diferentes etapas del proceso tumoral. El papel de la adhesión de células de MM mediada por α4β1 en la regulación de la expresión de los microRNAs no ha sido estudiado.

OBJETIVOS

- Papel de ICAP-1 en el desarrollo de los timocitos.
- Papel de ICAP-1 en la maduración y función de linfocitos de órganos linfoides secundarios**.**
- Regulación de la expresión de miRNAs en la adhesión dependiente de la integrina α4β1 en células de mieloma múltiple.

RESULTADOS

En el primer objetivo, mostramos que los timos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ presentan una reducción de la población de células SP CD8^{+} TCRαβ^{+} en los estadíos de maduración SM, M1 y M2. La reducción de los timocitos SP CD8^{+} correlacionó con una disminución de la expresión de Runx3, un factor de transcripción requerido para el desarrollo de los timocitos SP CD8^{+}.

En el segundo objetivo, mostramos que las células CD4^{+} y CD8^{+} de bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ presentan una reducción de la proliferación y de la apoptosis *in situ*. Asimismo, las células CD3^{+} deficientes en ICAP-1 y especialmente las células CD8^{+}, mostraron una reducción de su proliferación *in vitro* en respuesta a anti-CD3 y anti-CD28, lo que correlacionó con un menor porcentaje de células CD3^{+} en la fase G2/M del ciclo celular. Los bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ mostraron una reducción de linfocitos MZB asociada a un incremento de la frecuencia de la población celular pre-MZB. Además, los linfocitos B CD19^{+} deficientes en ICAP-1 mostraron un marcaje reducido de Ki67 y una disminución de la apoptosis *in situ*. Asimismo, las células FOB y MZB deficientes en ICAP-1 mostraron una proliferación alterada en respuesta a diferentes estímulos. Adicionalmente, la reducción de la proliferación de células CD19^{+} de bazos ICAP-1$^{-/-}$ se asoció con un menor porcentaje de estas células en la fase G2/M del ciclo celular. Notablemente, la ausencia de ICAP-1 en las células MZB se tradujo en una deficiencia de la vía de Notch2, proteína requerida para la diferenciación de células MZB, lo que correlacionó con un aumento de la expresión de *Klf2*.

Adicionalmente, las células MZB de bazos ICAP-1$^{-/-}$ mostraron una reducción de la expresión de *Blnk* y *Gpr174*, lo que podría asociarse con la reducida expresión de CD86 tras estimulación de estas células con anti-IgM. Asimismo, las células FOB y MZB deficientes en ICAP-1 mostraron una baja expresión de S1PR1 y CXCR5, y una quimiotaxis deficiente hacia CXCL13, el ligando de CXCR5. Finalmente, los bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ mostraron una inducción de senescencia en comparación con los bazos control.

En el tercer objetivo, identificamos la expresión diferencial de 40 miRNAs entre células de MM en suspensión y células de MM adheridas mediante α4β1, entre ellos, miR-324-5p y miR-331-3p. Estos miRNAs mostraron una expresión heterogénea en pacientes de MM a diagnóstico. El silenciamiento de la subunidad α4 de α4β1 se tradujo en una reducción tanto de la adhesión de células de MM como de la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p. La inhibición de las vías de las MAPK y PI3K/Akt redujo la adhesión mediada por α4β1 de las células de MM, así como la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p. Finalmente, el silenciamiento de miR-324-5p en células de MM adheridas a ligandos de α4β1 causó un aumento de la expresión de *SMO* de la vía *Hedgehog*.

CONCLUSIONES

La ausencia de ICAP-1 altera la maduración de los timocitos SP CD8^{+}, lo que se traduce en una disminución de su frecuencia en timo. El déficit de timocitos SP CD8^{+} en timos ICAP-1$^{-/-}$ correlaciona con la expresión reducida de *Runx3*. La falta de ICAP-1 causa una inhibición de la proliferación y de la apoptosis de linfocitos T y B, lo que se asocia a la inducción de senescencia en los bazos de los ratones mutantes. La reducción de las células MZB en bazos ICAP-1$^{-/-}$ correlaciona con un aumento de la proporción de células pre-MZB, sugiriendo una alteración en la transición del estadío pre-MZB a MZB. Las células MZB de bazos ICAP-1$^{-/-}$ muestran una marcada reducción de la expresión de Notch2, una proteína requerida para el desarrollo de células MZB, lo que probablemente constituiría uno de los mecanismos responsables del déficit de células MZB. Adicionalmente, la falta de ICAP-1 causa una reducción de la expresión de los receptores S1PR1 y CXCR5 en células FOB y MZB, lo que se asocia con un defecto en su quimiotaxis hacia CXCL13.

La adhesión mediada por α4β1 de células de MM se traduce en un aumento de la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p, respuesta que depende de la activación de las vías PI3K/Akt y ERK1/2. El incremento de expresión de miR-324-5p reprime la expresión de *SMO* de la vía *Hedgehog*.

INTRODUCCIÓN

I. DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS: PAPEL DE LAS INTEGRINAS Y SU REGULACIÓN POR ICAP-1

1. El sistema inmune

El sistema inmune comprende un conjunto de órganos, tejidos, células y moléculas encargados de proteger al organismo frente a daños y agentes infecciosos. El sistema inmune se clasifica en dos tipos: sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo, dependiendo del tipo de respuesta generada, su duración y las moléculas implicadas (Murphy & Weaver, 2017; Abbas *et al.*, 2018). El sistema inmune innato genera una respuesta rápida (Murphy & Weaver, 2017), y se compone de las barreras físicas, como las células epiteliales de las mucosas y los fagocitos, y de las barreras químicas como las defensas proteicas antimicrobianas y el sistema del complemento (Murphy & Weaver, 2017; Abbas *et al.*, 2018). Entre los fagocitos se encuentran los neutrófilos (Mantovani *et al.*, 2011), las células NK, los macrófagos, las células dendríticas (DCs), y los eosinófilos y basófilos (Murphy & Weaver, 2017). El sistema inmune adaptativo lo componen los linfocitos T y B. Los linfocitos T generan una respuesta inmune celular, mientras que los linfocitos B generan predominantemente respuestas humorales, mediante la producción de anticuerpos. Asimismo, las células B pueden activar a los linfocitos T actuando como células presentadoras de antígeno (APC) (Abbas *et al.*, 2018). Los linfocitos reconocen antígenos mediante sus receptores de células T (TCR), o receptores de células B (BCR), generándose linfocitos efectores encargados de generar respuestas específicas de prolongada duración. Posteriormente, éstos se diferencian a células memoria, las cuales son responsables de la inmunidad a largo plazo, dividiéndose rápidamente tras una segunda exposición a un antígeno previamente conocido (Murphy & Weaver, 2017). Los macrófagos y las células DCs actúan como mediadores entre el sistema inmune innato y el adaptativo, liberando citoquinas inflamatorias y quimioquinas para atraer a los linfocitos a los sitios de infección. Su función principal es la de actuar como células APC para el desencadenamiento de la respuesta inmune adaptativa (Murphy & Weaver, 2017; Abbas *et al.*, 2018).

2. Desarrollo linfoide

La diferenciación de las poblaciones inmunes y sanguíneas tiene lugar mediante la hematopoyesis (Takizawa *et al.*, 2012; Jagannathan-Bogdan & Zon, 2013; Laurenti & Göttgens, 2018; Pinho & Frenette, 2019). Tras el nacimiento, la hematopoyesis transcurre en la médula ósea (MO), un órgano linfoide primario de los huesos planos (Murphy & Weaver, 2017; Abbas *et al.*, 2018). El nicho de la MO está constituido por células estromales, células endoteliales, osteoblastos, células reticulares productoras de CXCL12 (Nagasawa, 2006; Takizawa *et al.*, 2012; Pinho & Frenette, 2019), y un parénquima irrigado por vasos sanguíneos de endotelio fenestrado (Itkin *et al.*, 2016; Pinho & Frenette, 2019). Las células hematopoyéticas más primitivas son las células madre hematopoyéticas (HSCs; Lin^-, $Sca\text{-}1^+$, $c\text{-}Kit^+$, $CD34^-$), las cuales son multipotentes, quiescentes y con capacidad de autorrenovación. Las células HSCs se diferencian y dividen formando las HSCs pluripotentes (HPSCs), las cuales a su vez se diferencian a células madre progenitoras multipotentes (MPPs; Lin^-, $Sca\text{-}1^+$, $c\text{-}Kit^+$, $CD34^+$) sin capacidad de autorrenovación (Kondo *et al.*, 2003; Abbas *et al.*, 2018). Las células MPPs engloban cuatro subtipos distintos: las células MPP1 ($CD135^-CD150^+CD48^-$), que carecen de capacidad de autorrenovación pero son altamente proliferativas; las células MPP2 ($CD135^-CD150^+CD48^+$), que son mitóticamente activas y capaces de diferenciarse hacia linajes tanto linfoides como mieloides; las células MPP3 ($CD135^-CD150^-CD48^+$), que se diferencian hacia el linaje mieloide; y las células MPP4 ($CD135^+CD150^-CD48^+$), que muestran un sesgo hacia el linaje linfoide (Kiel *et al.,* 2005; Wilson *et al.,* 2008; Cabezas-Wallscheid *et al.*, 2014). Las células MPP, principalmente MPP2 y MPP4, se diferencian al progenitor común linfoide (CLP)($Lin^-c\text{-}Kit^{low}Sca\text{-}1^{low}CD34^+$), a partir del cual se forman los linfocitos T, B y NK (Kondo *et al.*, 1997; Cabezas-Wallscheid *et al.*, 2014; Abbas *et al.*, 2018).

2.1. Desarrollo de linfocitos T

Tras la generación de progenitores linfoides T en la MO, éstos migran al timo a través de vasos sanguíneos localizados en las uniones córtico-medulares tímicas (Abbas *et al.*, 2018; Kumar *et al*., 2018; Ashby & Hogquist, 2023). En el timo tiene lugar el proceso del desarrollo de los linfocitos T (Carpenter & Bosselut, 2010; Kumar *et al*., 2018; Ashby & Hogquist, 2023). Los progenitores linfoides T expresan los receptores de quimioquinas CCR9 y CCR7, los cuales interaccionan con las quimioquinas CCL25, y con CCL19 o CCL21, respectivamente, que son producidas por el estroma tímico, facilitando su entrada en el timo (Scimone *et al.*, 2006; Zhang & Bhandoola, 2014). Asimismo, la unión de PSGL1 a su ligando P-selectina expresado por células endoteliales contribuye a la entrada de estos progenitores en el timo (Scimone *et al.*, 2006; Zhang & Bhandoola, 2014). El timo es un órgano linfoide primario bilobulado situado detrás del esternón (Boehm *et al*., 2014; Abbas *et al.*, 2018). Cada lóbulo está compuesto por una región externa denominada córtex, la cual contiene células epiteliales corticales (cTECs), y una región interna denominada médula, compuesta por células estromales, DCs y células epiteliales medulares (mTECs) (Moran & Hogquist, 2012; Abramson & Anderson, 2017; Ashby & Hogquist, 2023). Las poblaciones cTEC y mTEC juegan un papel crítico durante los procesos de selección positiva y negativa, al proporcionar antígenos propios durante la diferenciación de los timocitos (Ashby & Hogquist, 2023). Tras su migración al timo, las células progenitoras quedan retenidas en el córtex por la interacción de CXCR4 con su ligando CXCL12 expresado por las células cTECs (Plotkin *et al.*, 2003; Ashby & Hogquist, 2023). A su vez, la unión de Notch1 con sus ligandos expresados en las células estromales y epiteliales, contribuye al compromiso de linaje y diferenciación de células T mediante la represión de genes de diferenciación mieloide y de células B (Radtke *et al*., 1999; Radtke *et al*., 2010).

En las primeras etapas de diferenciación, los timocitos del córtex carecen de la expresión de los correceptores CD4 y CD8, por lo que se les denomina dobles negativos (DN) (Ashby & Hogquist, 2023). Durante esta fase se inicia el reordenamiento del locus del TCR en los timocitos DN para generar TCR específicos (Krangel, 2009; Kreslavsky *et al*., 2010). Existen cuatro subtipos de timocitos DN de acuerdo con la expresión de CD44 y de CD25. Las células DN1 ($CD44^+CD25^-$) se diferencian a células DN2 ($CD44^+CD25^+$), y éstas a células DN3 ($CD44^-CD25^+$) (Godfrey *et al*., 1993; Ceredig & Rolink, 2002). En este punto se activan las recombinasas RAG que reordenan los genes β del receptor TCR (Mombaerts *et al*., 1992; Shinkai *et al*., 1992). El TCRβ se asocia con la cadena invariante pTα formando el pre-TCR, el cual se asocia con CD3. El correcto reordenamiento del pre-TCR es verificado mediante un punto de control denominado selección β, generando una cadena TCRβ funcional (Michie & Zúñiga-Pflücker, 2002; von Boehmer, 2005; Mallis *et al*., 2015; Dutta *et al*., 2021). En este punto, la señalización del pre-TCR junto con la dependiente de Notch1 y de CXCR4, inducen la activación de PI3K, lo que contribuye a la supervivencia de los timocitos (Ciofani & Zúñiga-Pflücker, 2005; Janas *et al.*, 2010; Trampont *et al*., 2010). Los timocitos DN3 que superan la selección β se diferencian a células DN4 ($CD44^-CD25^-$), las cuales presentan capacidad proliferativa (Godfrey *et al*., 1993; Ceredig & Rolink, 2002), y es en esta fase en la que tiene lugar el reordenamiento de los genes α del TCR (Carpenter & Bosselut, 2010). Dicho reordenamiento finaliza en los timocitos del córtex que aún no han entrado en el proceso de selección positiva (Hogquist *et al*., 2015; Ashby & Hogquist, 2023). Estos timocitos constituyen las células simples positivas inmaduras (ISP), las cuales comienzan a expresar el correceptor CD8, a la vez que reprimen la expresión de *Cd4* mediante la actividad de Runx1 y Runx3 (Petrie *et al.,* 1990; Taniuchi *et al*., 2002; Kohu *et al*., 2005; Xiong *et al*., 2011). Tras independizarse de la señalización dependiente de Notch1 (Fiorini *et al.*, 2009; Xiong *et al*., 2011), los timocitos ISP activan la expresión de *Cd4* para formar las células dobles positivas (DP), las cuales expresan simultáneamente los correceptores CD4 y CD8, un receptor TCRαβ funcional, y carecen de la expresión de CD69 (Singer *et al.*, 2008; Ashby & Hogquist, 2023).

Las células cTEC son las responsables de presentar los pMHC durante el proceso de selección de los TCR funcionales en el córtex (Ashby & Hogquist, 2023). Las cTECs se

requieren para el procesamiento de antígenos propios y la formación de pMHC, lo cual depende de la actividad de la subunidad β5t catalítica de su proteasoma y de la catepsina-L (Nakagawa *et al*., 1998; Murata *et al.*, 2007; Moran & Hogquist, 2012). Debido a la diversidad generada por el reordenamiento aleatorio de los genes de las cadenas del TCR, la mayoría de los timocitos DP presentan TCRs incapaces de reconocer las moléculas pMHC (Carpenter & Bosselut, 2010; Ashby & Hogquist, 2023). Esto se traduce en una falta de señalización desde el TCR, causando la muerte de estas células por ausencia de estimulación (*death by neglect*) durante el proceso de selección positiva (Carpenter & Bosselut, 2010; Moran & Hogquist, 2012; Ashby & Hogquist, 2023). Por el contrario, los timocitos DP que reconocen con baja afinidad los pMHC presentados por las cTEC, señalizan a través del TCR y son seleccionados positivamente (Moran & Hogquist, 2012; Ashby & Hogquist, 2023), mostrando un fenotipo TCRβ^{high} (Hogquist *et al.*, 2015). Asimismo, los timocitos DP del córtex están sujetos a un proceso de selección negativa, en el que se mantiene la tolerancia central hacia antígenos propios del timo. Los timocitos DP cuyos TCR reconocen pMHC propios en cTEC con excesiva afinidad, generando una señalización fuerte desde el TCR, son eliminados por apoptosis en la deleción clonal (Moran & Hogquist, 2012; Breed *et al.*, 2019; Ashby & Hogquist, 2023). Los timocitos DP supervivientes son los que posteriormente se diferenciarán a células simples positivas (*single positive*; SP), de forma dependiente de la señalización del TCR tras reconocimiento de los complejos MHC en la selección positiva (Singer *et al.*, 2008; Ashby & Hogquist, 2023) (**Figura 1**).

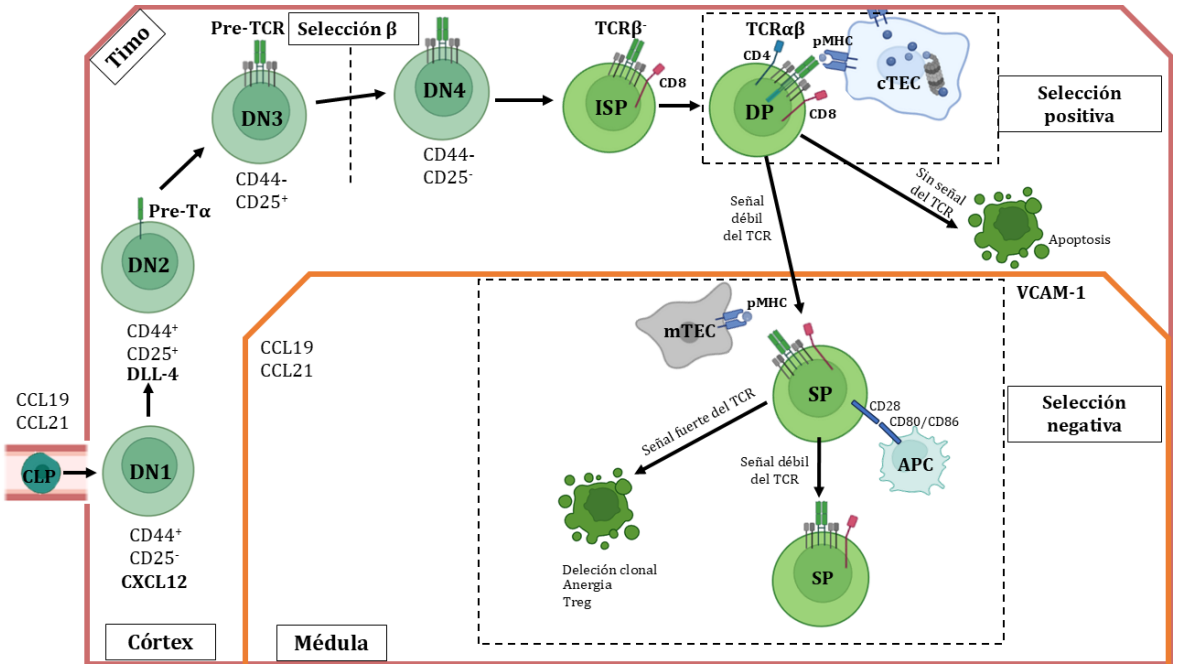


Figura 1. Desarrollo de linfocitos T en el timo. Estadíos de diferenciación desde la llegada de las células CLP en el timo, su posterior alojamiento en el córtex, y la migración de los timocitos a la médula. Esta diferenciación incluye los procesos de selección positiva y negativa por reconocimiento de pMHC presentes en células cTECs y mTECs. Se representan asimismo las quimioquinas del microambiente tímico (Ashby & Hogquist, 2023).

2.1.1. Desarrollo de timocitos *single positive*

El compromiso de linaje hacia linfocitos SP CD4$^+$ o CD8$^+$ transcurre durante la selección positiva por señalización dependiente del TCR (Singer *et al.*, 2008; Ashby & Hogquist, 2023). El modelo de selección secuencial cinético es el más aceptado para explicar el proceso de generación de los timocitos SP, el cual establece que la diferenciación hacia estos timocitos depende de la fuerza y duración de la señalización desde el TCR (Singer *et al.*, 2008; Steier *et al.*, 2024). En dicho modelo se propone que todos los timocitos DP se dirigen hacia el linaje CD4$^+$ tras una primera ola de señalización desde el TCR, lo que se conoce como *CD4 audition*, y que se traduce en un aumento de expresión de genes diana de activación del

TCR, entre los que se incluye el CD69 (Steier *et al.*, 2024). Las primeras diferencias detectables durante la especificación hacia los linajes CD4⁺ o CD8⁺ aparecen tras la inducción de la expresión de GATA3 en los timocitos DP destinados a ser SP CD4⁺ (Steier *et al.*, 2024). GATA3 es un factor de transcripción importante para la diferenciación, desarrollo y supervivencia de células SP CD4⁺ (Singer *et al.*, 2008). Por un lado, GATA3 se une a elementos reguladores de *Cd8* (Landry *et al.*, 1993; Ellmeier *et al.*, 1999) y reprime a Runx3, un factor de transcripción requerido para la diferenciación hacia el linaje SP CD8⁺ (Xiong *et al.*, 2013). Por otro lado, GATA3 induce la expresión de ThPOK, un factor de transcripción crítico para la diferenciación hacia timocitos SP CD4⁺ al incrementar la expresión de *Cd4* (He *et al.*, 2005; Singer *et al.*, 2008; Carpenter & Bosselut, 2010) (**Figura 2**). Asimismo, ThPOK suprime la expresión de Runx3 de manera dependiente de SOCS1 (Singer *et al.*, 2008; Luckey *et al.*, 2014). En consecuencia, en este estadío se genera una población de timocitos CD4⁺CD8^{low} (Singer *et al.*, 2008; Steier *et al.*, 2024) (**Figura 2**). Al final de la *CD4 audition*, si el TCR de estos timocitos continúa interaccionando con los complejos MHC-II, se produce una señal fuerte y prolongada por la coestimulación ejercida por el correceptor CD4, cuyos niveles en membrana son altos. Dicha señalización continúa incrementando los niveles de GATA3 y de ThPOK, y este último mantiene el aumento de la expresión de *Cd4* y reprimiendo la de *Cd8* (Singer *et al.*, 2008; Steier *et al.*, 2024). Todos estos circuitos regulatorios contribuyen al cese de la expresión del correceptor CD8 en membrana y al continuo aumento de los niveles de CD4, lo que permite la diferenciación hacia el linaje de timocitos SP CD4⁺ (Steier *et al.*, 2024). (**Figura 2**).

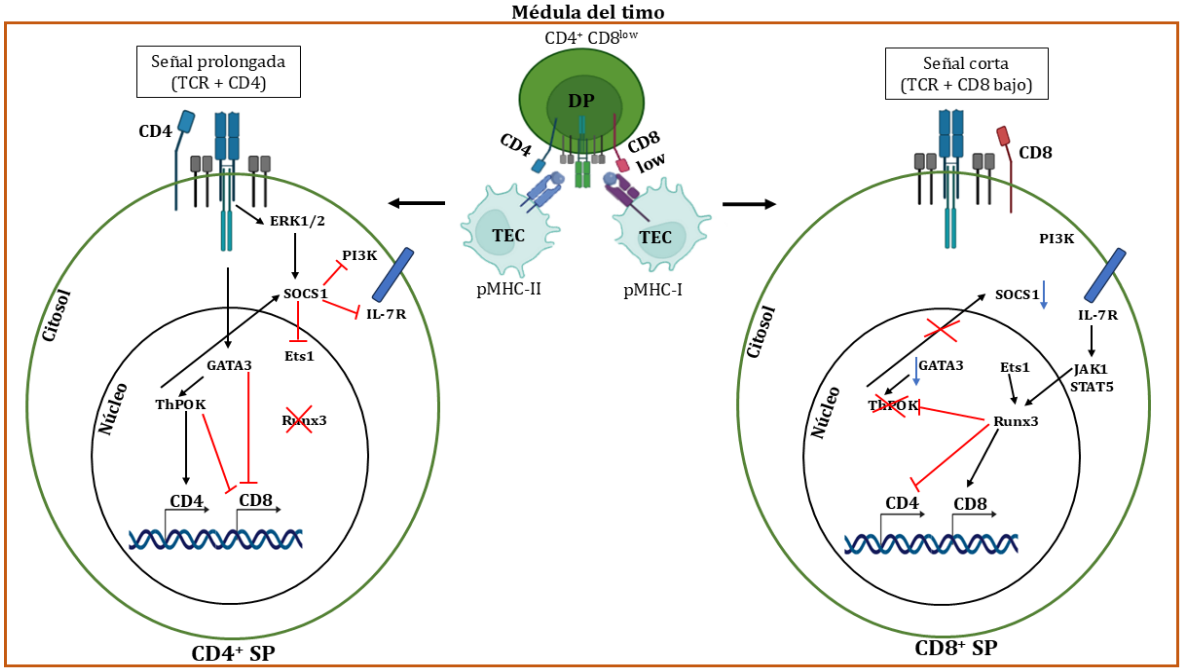


Figura 2. Desarrollo de los timocitos SP CD4⁺ y CD8⁺. Las células CD4⁺CD8^{low} reconocen péptidos propios presentados en complejos MHC-I o MHC-II. Dependiendo de la duración de la señal recibida y los correceptores implicados, se diferencian hacia células SP CD4⁺ o SP CD8⁺ (Singer *et al.*, 2008; Steier *et al.*, 2024).

Por el contrario, la interacción del TCR de las células CD4⁺CD8^{low} con el complejo MHC-I durante la selección positiva en el timo, genera una primera ola de señalización (*CD4 audition*) fallida y el cese de la señalización del TCR. Esto es debido a la baja coestimulación ejercida por CD8 a causa de sus reducidos niveles en membrana, generando una señalización del TCR corta y débil, que se traduce en una serie de cambios transcripcionales que permiten redirigir el fenotipo celular hacia el linaje CD8⁺ (Singer *et al.*, 2008; Carpenter & Bosselut, 2010; Kimura *et al.*, 2016; Steier *et al.*, 2024). Estos cambios incluyen la disminución de la expresión de los reguladores maestros del linaje CD4⁺: GATA3, ThPOK y SOCS1, lo que permite la reducción de expresión de *Cd4* (Singer *et al.*, 2008; Carpenter & Bosselut, 2010). Además, la disminución de SOCS1 en células CD4⁺CD8^{low} reactiva la expresión de IL-7R, requerida para la diferenciación de las células SP CD8⁺ (Singer *et al.*, 2008; McCaughtry *et al.*,

2012; Steier *et al.*, 2024). Todos estos cambios permiten que las células $CD4^+CD8^{low}$ adquieran un fenotipo transitorio similar a las células DP, con bajos niveles de expresión de CD4 y CD8. Seguidamente, estas células con un fenotipo DP transitorio experimentan una segunda ola de señalización a través de su TCR por interacción con el complejo MHC-I. Debido a esta doble señalización, la diferenciación de las células hacia el linaje SP $CD8^+$ requiere más tiempo que la diferenciación hacia timocitos SP $CD4^+$ (Steier *et al.*, 2024). Esta segunda ola de señalización permite la especificación hacia el linaje SP $CD8^+$, ya que las células aumentan la expresión de *Cd8* mientras reprimen por completo la expresión de *Cd4* (Taniuchi *et al*., 2002; Ehlers *et al*., 2003; Woolf *et al*., 2003; Kohu *et al*., 2005; Steier *et al.*, 2024) (**Figura 2**, derecha). Durante la especificación del linaje de $CD8^+$ aumentan los niveles de Runx3 (Singer *et al.*, 2008; Carpenter & Bosselut, 2010). El incremento de expresión de *Runx3* es promovido tanto por el factor de transcripción Ets1 como por la señalización de citoquinas (Zamisch *et al.*, 2009; Steier *et al.*, 2024). La señalización IL-7/IL-7R activa las proteínas JAK1 y STAT5, promueve la expresión de *Runx3* e incrementa la transcripción de *Cd8* (Park *et al*., 2007; Takada & Jameson, 2009; McCaughtry *et al*., 2012; Kimura *et al.*, 2016). Asimismo, Runx3 silencia la expresión de *Cd4* y reinicia la transcripción de *Cd8*, lo que se conoce como "reversión del correceptor" (Sato *et al.*, 2005; Singer *et al.*, 2008; Carpenter & Bosselut, 2010; Steier *et al.*, 2024). Además, Runx3 refuerza el linaje $CD8^+$ mediante la represión de ThPOK (Setoguchi *et al.*, 2008). Finalmente, la señalización IL-7/IL-7R promueve la maduración de los timocitos SP $CD8^+$. Así, los ratones deficientes en la señalización IL-7/IL-7R muestran números reducidos de linfocitos T $CD8^+$ maduros (Tani-ichi *et al*., 2013) (**Figura 2**, derecha).

2.1.2. El factor de transcripción Runx3

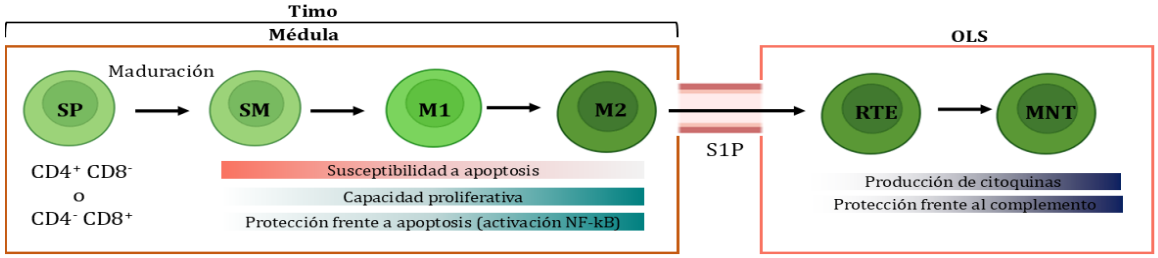
Runx3 forma parte de una familia de factores de transcripción (Runx1-3) que comparten el dominio de homología Runt, que constituye una secuencia de unión al DNA conservada entre especies (Levanon & Groner, 2004; Ito *et al*., 2015; Mevel *et al*., 2019). Los miembros de esta familia forman complejos heterodiméricos estables con CBFβ en el núcleo, lo cual aumenta su afinidad por el DNA y facilita la apertura de la cromatina para la transcripción génica. Las proteínas Runx desempeñan importantes papeles en la diferenciación y en la regulación de la proliferación de diferentes tipos celulares. Por ejemplo, Runx3 actúa como regulador negativo de la proliferación, y participa en la diferenciación de los timocitos (Levanon & Groner, 2004; Ito *et al*., 2015; Mevel *et al*., 2019). Los ratones *knock-out* para Runx3 mueren en etapas embrionarias y postnatales, mientras que la deleción condicional de Runx3 genera un déficit de timocitos SP $CD8^+$ (Mevel *et al*., 2019). Aunque Runx3 se expresa en timocitos DN, su expresión es máxima en las células DP de la médula del timo y en timocitos $CD8^+$ tras selección y durante su maduración (Woolf *et al*., 2003; De Bruijn & Speck, 2004; Levanon & Groner, 2004; Kohu *et al*., 2005). La mayor parte de Runx3 expresado en timo y bazo procede de la transcripción de su promotor proximal P2. Sin embargo, a partir del promotor distal P1 se genera un transcrito de mayor tamaño que es específico de timocitos $CD8^+$, denominado Runx3 distal (*Runx3d*) (Bangsow *et al*., 2001; Chung *et al*., 2007).

2.1.3. Maduración de los timocitos T SP

Los timocitos SP $CD4^+$ o $CD8^+$ resultantes de la selección positiva aumentan la expresión de CCR7, lo que les permite migrar hacia la médula del timo en respuesta a las quimioquinas CCL21 y CCL19 generadas por las mTECs (Ueno *et al*., 2004; Hogquist *et al.*, 2015; Ashby & Hogquist, 2023). Los timocitos SP experimentan una segunda ronda de selección negativa en la médula, eliminándose los timocitos SP autorreactivos mediante deleción clonal (Moran & Hogquist, 2012; Breed *et al.*, 2019; Ashby & Hogquist, 2023). La deleción clonal genera un estado de "no respuesta" frente a antígenos propios expresados constitutivamente, conservando únicamente los timocitos con una señalización débil del TCR pero suficiente para su supervivencia (Green *et al*., 2003; Smith-Garvin *et al.*, 2009; Moran &

Hogquist, 2012). En la médula, las mTECs, DCs convencionales y plasmacitoides, y una pequeña proporción de células B tímicas, exponen antígenos propios y coestimulan a los timocitos mediante la unión de los receptores CD80 o CD86 con su ligando CD28 expresado en los timocitos SP. A su vez, las células mTECs expresan el regulador autoinmune AIRE (Moran & Hogquist, 2012; Klein *et al.,* 2014; Breed *et al.*, 2019; Ashby & Hogquist, 2023). AIRE es un factor de transcripción que se une a elementos represores del DNA, desreprimiendo la expresión de genes propios que normalmente se encuentran silenciados en las células del timo. Esto permite que las células mTECs expresen antígenos de otras células del organismo y mimeticen sus características, generando tolerancia a lo propio (Anderson *et al.*, 2002; Mathis & Benoist, 2009).

Las células SP del primer estadío de maduración en la médula se conocen como células semimaduras (SM), las cuales expresan altos niveles de TCRβ, disminuyen gradualmente la expresión de CD69 y CD24, a la vez que aumentan la expresión de CD62L y del antígeno leucocitario del complejo MHC, denominado Qa2 en ratón (Ramsdell *et al.*, 1991; Kishimoto & Sprent, 1997; Hogquist *et al.*, 2015). Las células SM son aún susceptibles de sufrir apoptosis tras estimulación del TCR (Kishimoto & Sprent, 1997; Hogquist *et al.*, 2015). Posteriormente, estas células transicionan hacia células maduras de tipo 1 (M1), las cuales incrementan la expresión de MHC-I (Hogquist *et al.,* 2015), y adquieren capacidad proliferativa y protección frente a la apoptosis por la activación de la vía canónica de NF-kB, que previene la muerte celular y favorece la supervivencia (Hogquist *et al.,* 2015; Xing *et al.,* 2016). Las células M1 continúan su maduración formando los timocitos maduros de tipo 2 (M2), que expresan MHC-I pero no CD69 (Hogquist *et al.*, 2015). Estos timocitos incrementan la expresión de CCR7 a la vez que inhiben la de CXCR4 (Takahama, 2006), y aumentan los niveles del factor de transcripción *Krüppel-like factor 2* (Klf2), el cual induce la expresión de S1PR1 y CD62L, facilitando la migración de los timocitos maduros desde el timo a la periferia (Bai *et al*., 2007; Carpenter & Bosselut, 2010; Takada *et al.*, 2011; Hogquist *et al.*, 2015). Una vez que estas células SP maduras salen del timo a la periferia, se denominan emigrantes tímicos recientes (RTE) (Hogquist *et al.*, 2015). Las células RTE aún muestran una capacidad reducida de producción de citoquinas, generando menores niveles de IL-2 e IFN-γ que las células T *naive* maduras (MNT) de los órganos linfoides secundarios (OLS) (Boursalian *et al.*, 2004; Berkley *et al.*, 2013; Hogquist *et al.*, 2015). A medida que las células RTE migran a los OLS, maduran hasta formar las células MNT, aumentando su capacidad de producción de citoquinas como IL-2 para su proliferación tras estimulación antigénica del TCR (Hogquist *et al.*, 2015). Además, las células MNT incrementan la expresión de IL-7R que interacciona con la IL-7 liberada por las células fibroblásticas reticulares (FRCs) y estromales de los OLS, la cual activa la vía Akt y la expresión de Bcl-2 para la supervivencia de estas células en los OLS (Takada & Jameson, 2009; Carpenter & Bosselut, 2010; Tani-ichi *et al.*, 2013) (**Figura 3**).



	SM	M1	M2	RTE	MNT
TCRβ	+	+	+	+	+
CD69	+	+	-	-	-
MHC-I	-	+	+	+	+
CD24	++++	+++	++	+	-
Qa2	-	-	+	++	+++
Bcl-2	+	+	+	+	+
CCR7	-/+	+	+	+	+
IL-7Rα	-	-/+	+	+	++
KLF2	-	-/+	+	+	+
CD62L	-	-	+	+	+
S1PR1	-	-	+	+	+

Figura 3. Maduración de timocitos SP. Se muestran las etapas de maduración de timocitos SP CD4+ o

$CD8^+$ en la médula del timo. SM (timocitos semimaduros), M1 (maduros de tipo 1), M2 (maduros de tipo 2), RTE (emigrantes tímicos recientes), MNT (células T *naive* maduras). En la tabla se muestran los cambios de expresión de receptores en cada una de las etapas de maduración (Adaptada de Hogquist *et al.*, 2015).

En la periferia, los linfocitos T *naive* ($CD44^{low}CD62L^{high}CCR7^{high}$) presentan un estado de reposo y quiescencia, y migran a los OLS en búsqueda de antígenos. Estas células sobreviven en los OLS por las señales tónicas que reciben a través del TCR tras interacción con pMHC propios de las células estromales, y por la señalización dependiente de IL-7 (Takada & Jameson, 2009; Sprent & Surh, 2011). En los OLS, los TCR de las células *naive* interaccionan con los antígenos presentados por MHC de las células APC (Takada & Jameson, 2009), produciéndose tres procesos diferentes que conllevan su diferenciación (Kaech & Cui, 2012; Kumar *et al.*, 2018). En una primera fase, estas células se dividen rápidamente en respuesta a IL-2 liberada por las APC, y se diferencian a células efectoras de vida corta (Zhang & Bevan, 2011; Kaech & Cui, 2012; Kumar *et al.*, 2018). La respuesta efectora ejercida por los linfocitos SP $CD4^+$ y $CD8^+$ es distinta. Las células $CD8^+$ representan linfocitos T citotóxicos (CTL) que liberan granzima B y perforina para la eliminación de células infectadas y células tumorales (Zhang & Bevan, 2011; Kaech & Cui, 2012; Jameson & Masopust, 2018). Por otro lado, los linfocitos $CD4^+$ *helper* (Th) se diferencian a distintos tipos de células efectoras tras estimulación del TCR y la coestimulación de su receptor CD28 por parte de las APC. Esta diferenciación depende de la liberación de las citoquinas IL-12, IL-4 o IL-6 por las APC, las cuales regulan la expresión de los factores de transcripción T-bet, GATA3 o RORγt en las células Th, para la diferenciación a células Th1, Th2 o Th17 respectivamente (Pepper & Jenkins, 2011; Sallusto, 2016). Asimismo, los linfocitos $CD4^+$ foliculares expresan CD40L, que junto con la liberación de IL-4 promueven la expansión de las células B en los centros germinales (GC), generándose células B memoria y plasmáticas (Grewal & Flavell, 1998; Masopust & Schenkel, 2013; Sallusto, 2016). Tras la eliminación del patógeno por las respuestas efectoras, tiene lugar la segunda fase conocida como "muerte celular inducida por activación", que consiste en la apoptosis de la mayoría de las células efectoras inducida por Fas-L y TNF. La apoptosis de las células efectoras tiene por objetivo evitar respuestas exacerbadas y mantener la homeostasis celular (Ahmed & Gray, 1996; Green *et al.*, 2003; Woodland & Kohlmeier, 2009). Las células efectoras $CD4^+$ y $CD8^+$ supervivientes se diferencian a células memoria, lo que constituye la última fase. Las células memoria $CD4^+$ y $CD8^+$ son células de larga vida, con capacidad de autorrenovación, proporcionando inmunidad a largo plazo, y generando respuestas efectoras rápidas ante niveles bajos de antígeno tras una segunda exposición al mismo (Seder & Ahmed, 2003; Woodland & Kohlmeier, 2009; Jameson & Masopust, 2018; Kumar *et al.*, 2018). Podemos distinguir dos poblaciones de células $CD4^+$ y $CD8^+$ memoria. En primer lugar, las células T memoria centrales (T_{CM}) ($CD62L^{high}CCR7^{high}$) se generan por una señalización débil del TCR, y recirculan por los OLS y MO. En segundo lugar, las células T memoria efectoras (T_{EM}) ($CD62L^{low}CCR7^{low}IL\text{-}7R\alpha^{low}$) generadas tras una señalización fuerte del TCR, conservan su función efectora, por lo que se localizan en sangre y en las zonas de linfocitos T del bazo, recirculando por los tejidos periféricos y actuando como primera línea de defensa frente a patógenos. Las células $CD4^+$ forman con mayor frecuencia células memoria T_{CM} mientras que las células memoria T_{EM} derivan mayormente de las células $CD8^+$ (Seder & Ahmed, 2003; Woodland & Kohlmeier, 2009; Pepper & Jenkins, 2011; Kaech & Cui, 2012; Sathaliyawala *et al.*, 2013; Jameson & Masopust, 2018). Por otra parte, la población de células T memoria residentes (T_{RM}) ($CD62L^{high}CD103^{high}CD69^{high}$) deriva principalmente de células $CD8^+$. Estas células se localizan en los tejidos y lugares de entrada de patógenos, presentan escasa capacidad de recirculación, y generan respuestas muy rápidas (Seder & Ahmed, 2003; Kaech & Cui, 2012; Sathaliyawala *et al.*, 2013; Jameson & Masopust, 2018; Kumar *et al.*, 2018).

2.2. Desarrollo de linfocitos B

Los linfocitos B generan respuestas inmunes humorales mediante la producción y secreción de anticuerpos (Batista & Harwood, 2009). El desarrollo de los linfocitos B en

ratones tras el nacimiento tiene lugar a partir de las células MPP de la MO, principalmente MPP2 y MPP4, que luego se diferencian hacia las células CLP. Estas últimas son las precursoras de las células pre-pro-B con un fenotipo CD45R/B220^{+}CD43^{+}CD24/HSA^{low}CD19^{-} (Li *et al*., 1996a; Kondo *et al.*, 1997; Hardy & Hayakawa, 2001). Las células pre-pro-B se diferencian a células pro-B, las cuales continúan expresando CD43 (Hardy & Hayakawa, 2001). Para el programa específico de diferenciación de células B intervienen factores de transcripción como E2A y Ebf1 (Lin & Grosschedl, 1995; Bain *et al.*, 1997; Kwon *et al.,* 2008). E2A promueve la expresión de Ebf1, el cual induce la expresión de *Pax5*. E2A y Ebf1 desempeñan papeles directos en la expresión de genes específicos del linaje de células B, mientras que Pax5 reprime la expresión de genes de linajes alternativos, reforzando el compromiso de linaje de células B (Nutt *et al.*, 1999; Nutt & Kee, 2007; György *et al*., 2012; Revilla-i-Domingo *et al*., 2012; Miyai *et al.*, 2018). Pax5 es un factor de transcripción que se expresa de manera exclusiva en el linaje B, desde las células pro-B hasta las células maduras de la periferia (Fuxa & Busslinger, 2007), donde interacciona con complejos remodeladores de la cromatina, activando o reprimiendo la expresión de genes. Pax5 se une a los *enhancer* de Igα, induce la expresión de CD19 y el reordenamiento y recombinación de las cadenas IgH (Nutt *et al*., 1997; Maier *et al*., 2003; Revilla-i-Domingo *et al*., 2012). Ebf1 es importante para la señalización de Igα y regula de manera indirecta la expresión de Aiolos (Sigvardsson *et al.,* 2002; György *et al*., 2012), el cual comienza a expresarse en células pro-B (Wang *et al.*, 1998).

Cuando las células pro-B proliferan se diferencian a células pre-B grandes, que reordenan los genes de la región variable de las cadenas IgH y forman el pre-BCR al que se asocian las proteínas accesorias Igα e Igβ. Las células pre-B grandes proliferan por la señalización del pre-BCR y de IL-7R, y se diferencian a células pre-B pequeñas, las cuales reordenan las cadenas ligeras de inmunoglobulina (IgL) para su combinación con las cadenas IgH del pre-BCR (Hardy & Hayakawa, 2001; Herzog *et al.*, 2009). Las células pre-B pequeñas se encuentran en reposo (Ma *et al.*, 2010), formando las células B inmaduras de la MO (HSA^{high}IgM^{high}IgD^{low}B220^{low}) que expresan el BCR (Allman & Pillai, 2008; Wang *et al.*, 2020), el cual reconoce antígenos propios en las células de los tejidos. Si su BCR reconoce los antígenos con alta afinidad, la célula inmadura muere por apoptosis en la deleción clonal de la selección negativa para evitar una respuesta autorreactiva y generar tolerancia. Por el contrario, si la afinidad no es tan elevada, la célula entra en un estado de anergia o de no respuesta, o bien reordena las cadenas IgL de su BCR en un proceso denominado edición del receptor (Nossal, 1994; Hardy & Hayakawa, 2001). Las células B inmaduras que no son autorreactivas continúan su maduración en el bazo, atravesando una serie de estadíos transicionales (Allman & Pillai, 2008; Pillai & Cariappa, 2009) (**Figura 4**).

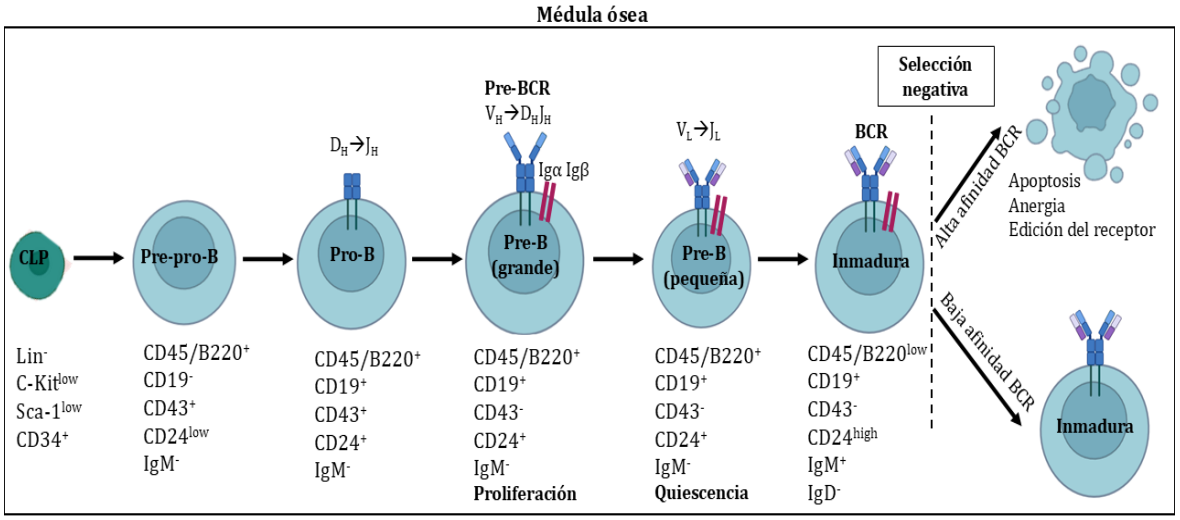


Figura 4. Desarrollo de linfocitos B en la MO. Etapas de diferenciación desde las células progenitoras CLP, hasta los linfocitos B inmaduros emigrantes. Se representan los reordenamientos de las cadenas del BCR y los marcadores expresados por las células (Hardy & Hayakawa, 2001; Nagasawa, 2006).

2.2.1. Maduración de linfocitos B en el bazo

El bazo actúa como reservorio y lugar de reciclaje y eliminación de eritrocitos, y se encarga de concentrar antígenos procedentes de la sangre (Mebius & Kraal, 2005; Abbas *et al.*, 2018). El bazo está formado por una cápsula fibrosa externa y es irrigado por las arteriolas centrales, por donde entran las células inmunes. El parénquima esplénico lo conforman la pulpa roja, constituida por eritrocitos, células APC y células plasmáticas, y la pulpa blanca, formada por linfocitos que rodean las arteriolas. En los ratones, los linfocitos T forman una vaina linfoide periarteriolar (PALS) que rodea a la arteriola central del folículo y la zona marginal (MZ) situada en la parte externa del folículo de células B (Mebius & Kraal, 2005; Batista & Harwood, 2009; Mueller & Germain, 2009). Los linfocitos T se encuentran embebidos en una red de FRCs y DCs, las cuales secretan CCL19, CCL21, IL-7 y BAFF, mientras que los linfocitos B se disponen formando los folículos, en el interior de los cuales se localizan los GC junto con células dendríticas foliculares (FDCs). En el exterior del folículo se encuentra la MZ con DCs intercaladas (Mebius & Kraal, 2005; Batista & Harwood, 2009; Mueller & Germain, 2009; Abbas *et al.*, 2018) y separada del centro folicular mediante una red de macrófagos metalofílicos (Mebius & Kraal, 2005; Mueller & Germain, 2009; Borges *et al.*, 2015). Los linfocitos y antígenos entran en el bazo por medio de la sangre que circula a través de las arteriolas centrales del folículo. La sangre atraviesa el seno de la MZ y libera los antígenos a la pulpa roja donde son capturados por una red de macrófagos, DCs y células B de la MZ (Mebius & Kraal, 2005; Batista & Harwood, 2009; Mueller & Germain, 2009), así como por los macrófagos metalofílicos de la MZ (Borges *et al.*, 2015). Tras la activación de los linfocitos T, éstos migran hacia la pulpa blanca, entrando en contacto con las FRCs y las células B (Murphy & Weaver, 2017; Abbas *et al.*, 2018; Chauveau *et al.,* 2020) (**Figura 5**).

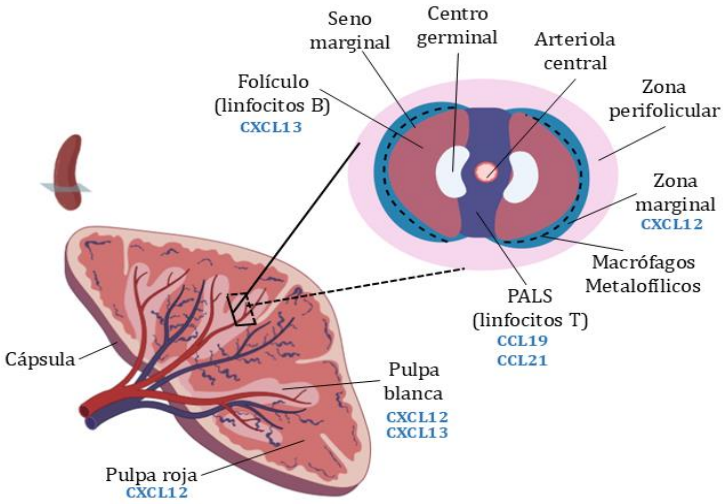
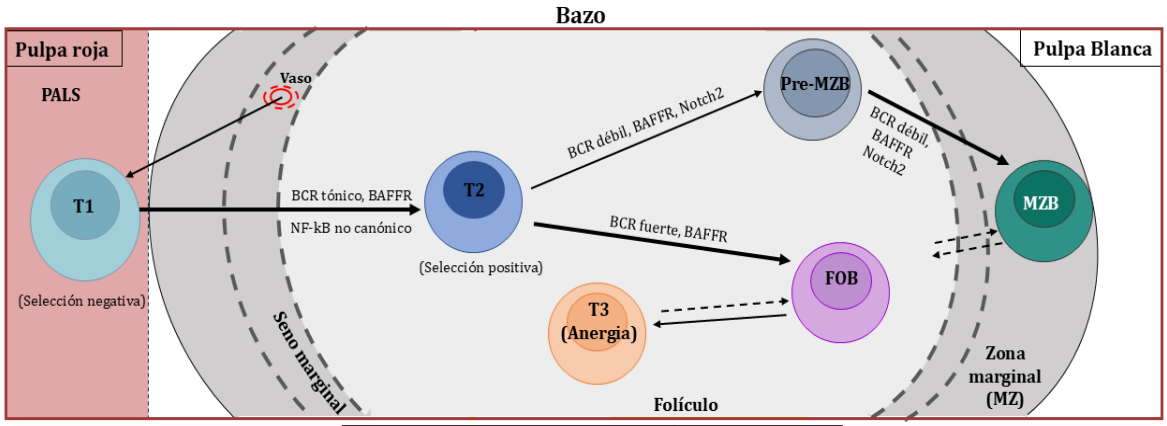


Figura 5. Estructura del bazo. Organización de los linfocitos en la estructura de un bazo. En azul se indican las quimioquinas expresadas (Mebius & Kraal, 2005; Murphy & Weaver, 2017; Abbas *et al*., 2018).

Las células B inmaduras del bazo proceden de la MO y expresan el marcador CD93/AA4 y elevados niveles de CD24 (HSA) (Allman *et al.*, 2001; Allman & Pillai, 2008). La primera población transicional se conoce como T1 ($CD24^{high}CD21/35^{-}CD23^{-}IgM^{high}IgD^{low/-}$) (Loder *et al.*, 1999; Allman *et al.*, 2001; Srivastava *et al*., 2005). Los linfocitos B T1 migran al folículo del bazo en respuesta a CXCL13, requieren señales tónicas de BCR y señalización dependiente de BAFFR para su supervivencia (Pillai & Cariappa, 2009), y se localizan en los PALS (Loder *et al.*, 1999). En esta región interaccionan con antígenos de la sangre, de manera que las células que reconozcan antígenos propios con gran afinidad mediante su BCR mueren por apoptosis (Su & Rawlings, 2002). Las células T1 restantes prosiguen su diferenciación hacia células transicionales T2. Estas células ($CD21/35^{-}CD23^{+}IgM^{high}IgD^{low}$) se localizan en el interior del folículo, adyacentes a las células B maduras (Loder *et al.*, 1999; Srivastava *et al.*, 2005; Pillai & Cariappa, 2009). Las células T2 que reconocen antígenos presentados por células FDCs con una afinidad adecuada del BCR, escapan de la apoptosis y son seleccionadas positivamente. La población celular T2 es mitóticamente más activa que la población T1, y prolifera rápidamente en respuesta a señalización por BCR y BAFF (Su & Rawlings, 2002).

BAFF es crítico para la supervivencia, desarrollo y mantenimiento de las células B, y cuyo principal receptor en células B es BAFFR (Schiemann *et al*., 2001; Shulga-Morskaya *et al*., 2004). BAFF es expresado por las células mieloides (Rolink & Melchers, 2002), mientras que BAFFR se expresa en linfocitos B inmaduros T2 y en estadíos de maduración posteriores (Thompson *et al*., 2001; Pillai & Cariappa, 2009). El módulo BAFF/BAFFR, junto con la señalización desde el BCR que activa a la tirosina quinasa Btk, promueve la supervivencia y proliferación de las células B transicionales y maduras (Su & Rawlings, 2002; Pillai & Cariappa, 2009). Asimismo, la señalización BAFF/BAFFR activa las vías no canónica y canónica de NF-kB, la cuales son esenciales para la supervivencia de los linfocitos B transicionales y maduros, respectivamente (Mackay & Schneider, 2009; Pillai & Cariappa, 2009). Las células inmaduras T2 se diferencian hacia las células precursoras B de la MZ (pre-MZB; CD93/AA4^{low}CD21/35^{high}CD23^{+}IgM^{high}IgD^{high}) (Loder *et al.*, 1999; Srivastava *et al*., 2005; Allman & Pillai, 2008). Estas células residen en el interior del folículo, pero migran a la MZ a medida que responden a gradientes de esfingosina-1-fosfato (S1P), y señalizan a través del eje Notch2/*Delta-like 1* (DLL-1) para diferenciarse en células B de la zona marginal (MZB) (Pillai & Cariappa, 2009; Tan *et al.*, 2009). Las células pre-MZB reconocen principalmente antígenos capturados en sangre de manera T-independiente, y expresan CD1d, un receptor de antígenos lipídicos (Srivastava *et al*., 2005; Pillai & Cariappa, 2009). Las células T2 pueden asimismo diferenciarse hacia las células maduras foliculares (FOB) (Loder *et al.*, 1999; Allman & Pillai, 2008; Pillai & Cariappa, 2009).

Las células FOB tienen un fenotipo IgM^{low}IgD^{high}CD21^{med}CD23^{+} (Allman & Pillai, 2008; Pillai & Cariappa, 2009), y constituyen la población mayoritaria de células B maduras en la periferia (Boothby *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020). Las células FOB se localizan en los folículos adyacentes a las zonas de linfocitos T, donde interaccionan con los linfocitos T CD4^{+} *helper* para la formación de los GC, para desarrollar respuestas T-dependientes y para la generación de células B memoria y anticuerpos de alta afinidad tras la recombinación de clase e hipermutación somática (Allman & Pillai, 2008; Pillai & Cariappa, 2009; Boothby *et al*., 2019). Las células FOB tienen capacidad de migrar hacia la MZ del folículo, pero debido a su baja expresión de integrinas, no quedan retenidas sino que son arrastradas rápidamente por el flujo sanguíneo hacia la pulpa roja del bazo y la circulación periférica (Lu & Cyster, 2002; Arnon *et al.*, 2013). Las células FOB tienen capacidad de recirculación, y desde la sangre migran de nuevo a los OLS, tanto a los nódulos linfáticos (LNs) como bazo. Estas células llegan al bazo a través de las fenestraciones de las vénulas de la pulpa roja y atraviesan la MZ hacia los folículos (Pillai & Cariappa, 2009). Asimismo, las células FOB son capaces de recircular a un nicho de la MO, conocido como nicho perisinusoidal de células B maduras (Allman & Pillai, 2008; Pillai & Cariappa, 2009). Las células FOB requieren la señalización dependiente de BAFF y una señalización intermedia-fuerte desde el BCR mediada por Btk, con suficiente avidez por el antígeno para generar la activación de las células FOB y su proliferación (Allman & Pillai, 2008; Pillai & Cariappa, 2009; Wang *et al.*, 2020). Algunos estudios indican que las células FOB pueden derivar a la población anérgica T3 (CD21/35^{low}CD23^{+}IgM^{low}IgD^{high}) (Allman *et al.*, 2001; Allman & Pillai, 2008) (**Figura 6**).



	B inmaduras				B maduras	
	T1	T2	T3	Pre-MZB	FOB	MZB
CD24	High	High	High	Low	+	+
CD93	+	+	+	-/low	-	-
IgM	High	High	Low	High	Low	High
IgD	-/Low	Low	High	High	High	Low/-
CD21	-/Low	-/Low	Low	High	Med	High
CD23	-	+	+	+	+	-
CD1d	-/Low	-/Low	-/Low	+/High	-/Low	+/High
CD62L	-	+	+	-	+	-

Figura 6. Células B transicionales y maduras del bazo. Las células B inmaduras procedentes de la MO completan su proceso de maduración en el bazo, atravesando una serie de estadíos transicionales (T1, T2, pre-MZB). Finalmente forman las células maduras FOB y MZB. Se indican las señales requeridas para su diferenciación, los compartimentos tisulares y los receptores expresados en la superficie de las células (Pillai & Cariappa, 2009; Wang *et al*., 2020).

Las células MZB constituyen el 5-10% de las células B del bazo (Boothby *et al.*, 2019), y presentan el fenotipo $IgM^{high}IgD^{low}CD21^{high}CD23^{-}$ (Martin & Kearney, 2002; Pillai *et al.*, 2005). Estas células proporcionan principalmente una rápida respuesta inmune durante el reconocimiento de patógenos en sangre independiente de células T (como por ejemplo LPS). Sin embargo, las células MZB también pueden contribuir a respuestas dependientes de células T, dado que, al contrario que las células FOB, expresan altos niveles de MHC-II, por lo que presentan actividad presentadora de antígenos a los linfocitos T $CD4^{+}$ (Song & Cerny, 2003; Allman & Pillai, 2008; Cerutti *et al.*, 2013). Asimismo, la alta expresión del receptor del complemento CD21 (*Cr2*) en las células MZB facilita el transporte de inmunocomplejos a los folículos para la presentación antigénica a las células FOB, con el fin de desencadenar respuestas T-dependientes (Pillai *et al.*, 2005; Allman & Pillai, 2008; Cerutti *et al.*, 2013). Al igual que las células pre-MZB, las células MZB expresan CD1d (Roark *et al.*, 1998; Martin & Kearney, 2002). Tras la interacción con patógenos, las células MZB expresan anticuerpos IgM de baja afinidad, diferenciándose posteriormente a plasmablastos, y seguidamente a células plasmáticas, participando tanto en respuestas T-independientes como T-dependientes (Martin *et al.*, 2001; Song & Cerny, 2003; Pillai *et al.*, 2005; Cerutti *et al.*, 2013).

Las células MZB residen en la MZ del bazo, una localización exterior de la pulpa blanca del bazo entre el seno marginal y la pulpa roja (Martin & Kearny, 2002; Mebius & Kraal, 2005; Pillai *et al.*, 2005). Los macrófagos y DCs de la MZ capturan antígenos, los cuales pueden activar las células MZB (Mebius & Kraal, 2005; Mueller & Germain, 2009). El desarrollo de las células MZB requiere su migración hacia el seno marginal y su retención en esta localización hasta que son activadas (Pillai & Cariappa, 2009). En roedores, las células MZB son sésiles y no recirculan hacia sangre periférica, pero pueden migrar entre la MZ y los folículos para la presentación de antígenos a las células FOB (Allman & Pillai, 2008; Cinamon *et al.*, 2008; Pillai & Cariappa, 2009). Esta migración está regulada por S1PR1 y CXCR5 expresados en la membrana de las células MZB, los cuales son receptores para S1P (*sphingosine-1-phosphate*) y CXCL13, respectivamente (Cinamon *et al.*, 2004; Cyster & Schwab, 2012). S1P retiene a las células MZB en la MZ, mientras que CXCL13, expresada por

las FDCs, estimula la migración de las células MZB hacia los folículos (Cinamon *et al.*, 2008; Cyster & Schwab, 2012; Arnon *et al.*, 2013; Cyster & Allen, 2019). Las integrinas αLβ2 y α4β1 (VLA-4) contribuyen asimismo a la retención de las células MZB en la MZ, a través de la interacción con sus ligandos ICAM-1 y VCAM-1, respectivamente, expresados por células estromales (Lu & Cyster, 2002). Las células MZB activadas disminuyen su adhesión a ligandos de integrinas de la MZ, y migran hacia la pulpa roja del bazo o bien se diferencian a células plasmáticas de vida corta (Martin & Kearny, 2002; Allman & Pillai, 2008; Cerutti *et al*., 2013).

El desarrollo de las células MZB requiere principalmente la activación de tres vías de señalización: la dependiente de BCR, la estimulada tras la interacción BAFF/BAFFR, y la originada tras la regulación génica promovida por Notch2 (Pillai & Cariappa, 2009; Cerutti *et al.*, 2013). La supervivencia de la población transicional T2 depende de la señalización a través del BCR y de la generada por el módulo BAFF/BAFFR. Así, la activación de las vías clásica y alternativa de NF-kB *downstream* de BCR y BAFFR tiene un efecto cooperativo para la supervivencia de las células T2 y para su diferenciación hacia células FOB y MZB. Como ya se ha mencionado, se ha propuesto que una señalización intermedia-fuerte del BCR promueve la formación de las células FOB, pero al mismo tiempo se inhibe la generación de células MZB por acción de Btk, la cual bloquea la actividad inductora de Notch2 para la diferenciación de las células MZB (Martin & Kearny, 2000; Cariappa *et al*., 2001; Wen *et al*., 2005; Pillai & Cariappa, 2009; Cerutti *et al.*, 2013). Para la generación de las células MZB desde la población T2 se requiere una señalización débil y tónica desde el BCR y con baja actividad de Btk, formándose la población pre-MZB, la cual es altamente sensible a la estimulación por Notch2 (Pillai & Cariappa, 2009). Así, la unión de Notch2 de células pre-MZB con su ligando DLL-1 en células endoteliales se traduce en la formación de células MZB (Saito *et al.*, 2003; Hozumi *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2020).

Notch2 pertenece a la familia Notch, cuyos miembros son proteínas transmembrana tipo 1 con dominios extracelulares que contienen repeticiones *EGF-like*, y que están implicadas en comunicaciones intercelulares que regulan diversos procesos de diferenciación. Notch2 se une a las proteínas Delta-1 (DLL-1), Jagged-1 y Jagged-2, tras lo cual es proteolíticamente procesado por ADAM-10, y su región intracelular se transloca al núcleo formando un complejo con RBP-Jk, lo que se traduce en activación de la transcripción (Radtke *et al.*, 2010). Notch2 se expresa en células MZB y es requerido para su desarrollo (Saito *et al.*, 2003; Witt *et al*., 2003). Su ligando principal en las células MZB es DLL-1, el cual se expresa en la superficie de las células endoteliales de las vénulas de la pulpa roja del bazo y del seno marginal, en fibroblastos del folículo y en DCs (Hozumi *et al*., 2004; Santos *et al*., 2007; Pillai & Cariappa, 2009; Tan *et al*., 2009). Al igual que Notch2, DLL-1 es requerido para una eficiente generación de las células MZB (Hozumi *et al*., 2004).

2.3. Señalización a través del TCR y de correceptores

Los linfocitos T reconocen antígenos presentados por moléculas MHC de APC mediante el TCR (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Zhu *et al*., 2011; Brownlie & Zamoyska, 2013). Este reconocimiento es necesario durante la timopoyesis para establecer la tolerancia central mediante la selección positiva y negativa (Carpenter & Bosselut, 2010; Cho & Sprent, 2018), y para inducir la diferenciación de los timocitos (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Brownlie & Zamoyska, 2013; Kimura *et al.*, 2016). La unión de baja afinidad del TCR con péptidos propios en complejos MHC se traduce en una señalización tónica en linfocitos T *naive* periféricos, lo que es esencial para su supervivencia (Seddon & Zamoyska, 2002; Takada & Jameson, 2009; Brownlie & Zamoyska, 2013). Tras activación, el TCR se asocia a CD3, el cual contiene largas cadenas citoplasmáticas que dimerizan. Las cadenas CD3ζ y CD3ε contienen motivos de activación ITAM, que son dominios de tirosinas susceptibles de fosforilación por tirosín quinasas (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Brownlie & Zamoyska, 2013; Cantrell, 2015). En reposo, los dominios ITAM se encuentran plegados en la membrana plasmática, lo que resulta inaccesible para las quinasas. Tras la activación, se produce un cambio conformacional que

expone los dominios ricos en tirosinas a la fosforilación por parte de proteínas tirosín quinasas (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Brownlie & Zamoyska, 2013). Estas proteínas pertenecen a la familia de Src quinasas, las cuales requieren la fosforilación de sus dominios catalíticos para ejercer su actividad quinasa (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Brownlie & Zamoyska, 2013), y para proporcionar las señales tónicas de supervivencia para los linfocitos T (Seddon & Zamoyska, 2002). Previamente a la fosforilación de los dominios ITAM, la cadena CD3ε experimenta un cambio conformacional tras activación del TCR, mediante el cual expone sus dominios ricos en prolinas y recluta a la proteína adaptadora Nck que contiene dominios SH_3 (Gil *et al.*, 2002; Risueño *et al.*, 2005; Smith-Garvin *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2014).

La familia de las Src quinasas incluye a LCK, la cual es específica de linfocitos y fosforila los dominios ITAM de la cadenas CD3ε y CD3ζ asociadas a TCR en linfocitos *naive,* para la tolerancia de antígenos propios (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Brownlie & Zamoyska, 2013). Tras la activación, LCK se une a los correceptores CD4 y CD8 y los aproxima al TCR para su señalización (Veillette *et al.*, 1988; Artyomov *et al.*, 2010). La fosforilación de los dominios ITAM por LCK genera sitios de acoplamiento para proteínas adaptadoras con dominios SH_2 y para el reclutamiento de miembros de la familia Syk como ZAP-70 (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Brownlie & Zamoyska, 2013). ZAP-70 es una proteína tirosín quinasa con dominios SH_2 que se expresa en linfocitos T, NK y algunas células B inmaduras (Wang *et al.*, 2010; Au-Yeung *et al.*, 2018), y es requerida tras la señalización del pre-TCR para la generación de los timocitos DP (Palacios & Weiss, 2007). En condiciones de reposo, ZAP-70 se localiza en el citoplasma en una conformación autoinhibida (Wang *et al.*, 2010; Au-Yeung *et al.*, 2018). Tras la estimulación del TCR, esta forma autoinhibida se desestabiliza por autofosforilación o por fosforilación dependiente de LCK, de manera que ZAP-70 se activa y fosforila a otras proteínas adaptadoras como Vav1 o SLP-76 (Bubeck-Wardenburg *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2010; Brownlie & Zamoyska, 2013). En conjunto, la actividad de proteínas adaptadoras y de señalización estimula segundos mensajeros que regulan el reordenamiento del citoesqueleto de actina, incrementa la afinidad de las integrinas por sus ligandos, y controla la activación transcripcional y funciones efectoras del linfocito. Adicionalmente, su actividad estimula la vía PI3K/Akt y la vía de las MAP quinasas, favoreciendo la supervivencia y la proliferación (Na *et al.*, 2003; Smith-Garvin *et al.*, 2009; Brownlie & Zamoyska, 2013; Cantrell, 2015) (**Figura 7**).

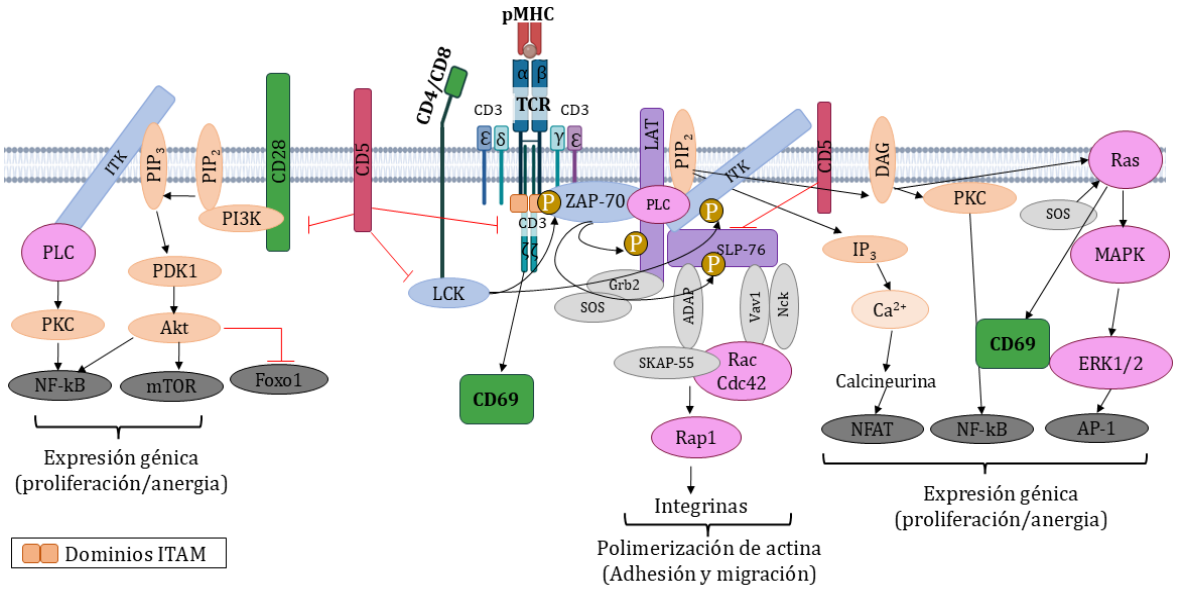


Figura 7. Señalización celular tras activación del TCR. La estimulación del TCR promueve la activación de proteínas Src que fosforilan los dominios ITAM del TCR/CD3. Esta fosforilación recluta a proteínas adaptadoras, que a su vez, activan las vías PI3K/Akt, MAPK/ERK1/2 y NF-kB, así como a las integrinas. Todo ello contribuye a la supervivencia, proliferación, migración y adhesión de los linfocitos T (Brownlie & Zamoyska, 2013).

Entre las respuestas generadas tras la activación del TCR se encuentra la inducción de la expresión del receptor de quimioquinas CCR7, y la de CD69 (Testi *et al*., 1994; Sallusto *et al.*, 1999). CD69 se expresa tras activación del TCR, por lo que actúa como un marcador de la selección positiva durante la timopoyesis, así como en linfocitos T activados (Testi *et al*., 1994; Cibrián & Sánchez-Madrid, 2017). CD69 es regulado por factores de transcripción como Runx1, y por miembros de la familia NF-kB (Testi *et al*., 1994; Cibrián & Sánchez-Madrid, 2017; Fontela *et al*., 2019). La inducción de la expresión de CCR7 dependiente de la señalización del TCR tiene lugar especialmente en los timocitos DP durante su selección positiva (Yin *et al.*, 2007). La unión de CCR7 con sus ligandos CCL19 y CCL21 es esencial para la migración de timocitos en desarrollo desde la corteza a la médula del timo (Ueno *et al.*, 2004), y para la migración de los linfocitos T *naive* a los LNs (Masopust & Schenkel, 2013).

La señal primaria del TCR genera una activación incompleta e insuficiente del linfocito para generar una respuesta efectora. Para una completa activación, se requiere una doble señalización con señales coestimuladoras (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Zhu *et al*., 2011). Esto es debido a que los timocitos modifican su umbral de activación para ser seleccionados negativamente y generar tolerancia a lo propio (Carpenter & Bosselut, 2010; Cho & Sprent, 2018). En el caso de los linfocitos T, éstos requieren señales más prolongadas que los linfocitos B para su completa activación (Batista *et al.*, 2007). Entre las señales coestimuladoras, es crítica la coestimulación mediada por la interacción entre CD28 de los linfocitos T con sus ligandos CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) expresados en células APC, lo que promueve la activación de la vía NF-kB para la supervivencia celular, la liberación de IL-2 para la proliferación, o la inducción de Vav1 para la activación del TCR (Lane, 1997; Smith-Garvin *et al.*, 2009; Zhu *et al*., 2011). La estimulación del CD28 es esencial para la selección negativa y la deleción clonal en timo (Breed *et al.*, 2019; Ashby & Hogquist, 2023). Existen también señales inhibitorias cuyo objetivo es limitar la activación de los linfocitos T y así evitar respuestas negativas (Pérez-Villar *et al.*, 1999; Smith-Garvin *et al.*, 2009; Zhu *et al*., 2011). Entre ellos se encuentra CD5 (Voisinne *et al*., 2018), una glicoproteína que contiene un dominio citoplasmático con abundantes tirosinas, y dominios ITAM e ITIM susceptibles de fosforilación por Src quinasas (Huang *et al.*, 1987; Pérez-Villar *et al.*, 1999; Tabbekh *et al*., 2013; Voisinne *et al*., 2018). CD5 forma un complejo junto a TCR/CD3 y los correceptores CD4 y CD8 en las sinapsis inmunes, donde se asocia a las proteínas LCK y Fyn, a las cuales inhibe mediante fosforilación (Beyers *et al.*, 1992; Burgess *et al.*, 1992; Tabbekh *et al*., 2013; Voisinne *et al*., 2018). La activación del complejo TCR/CD3 conduce a la fosforilación de las tirosinas de los dominios ITAM de CD5 (Tabbekh *et al*., 2013; Voisinne *et al*., 2018), y por ello, la señal dependiente de CD5 es proporcional a la interacción de alta avidez de TCR con los pMHC y a la intensidad de la señalización tras dicho acoplamiento (Cho & Sprent, 2018; Voisinne *et al*., 2018). La fosforilación de CD5 actúa como lugar de unión de proteínas inhibidoras de la señalización de TCR, como ubiquitin ligasas, y asimismo, recluta y retiene proteínas como ZAP-70, impidiendo su actuación sobre el complejo TCR (Tabbekh *et al*., 2013). CD5 se expresa en niveles bajos en timocitos DN e incrementa su expresión tras la selección positiva, especialmente en células $CD4^+$ (Azzam *et al*., 1998). Su expresión se mantiene en niveles elevados en periferia para la tolerancia a antígenos propios, ya que su función consiste en aumentar el umbral de activación, inhibiendo la activación linfocitaria (Azzam *et al*., 1998; Tabbekh *et al*., 2013; Henderson *et al*., 2015; Cho & Sprent, 2018). Por ello, se expresa principalmente en células *naive* y de memoria (Tabbekh *et al*., 2013; Cho & Sprent, 2018), y se ha detectado asimismo en células T $CD8^+$ periféricas anérgicas expuestas crónicamente a antígenos (Stamou *et al.*, 2003).

2.4. Señalización por BCR y correceptores

El receptor BCR está formado por una cadena pesada (IgH) y una cadena ligera (IgL) con estructuras de IgD o IgM en membrana, y se asocia de manera no covalente con Igα (CD79a) e Igβ (CD79b) (Hombach *et al.*, 1990; Kurosaki, 1997). CD79a y CD79b presentan motivos ITAM susceptibles de fosforilación mediada por miembros de la familia de las Src

quinasas tales como Lyn, Fyn, Syk y Btk, transduciendo señales desde el pre-BCR o del BCR (Law *et al.*, 1993; Flaswinkel & Reth, 1994; Kurosaki, 1997; Kurosaki, 2002). Estas quinasas son las primeras en activarse y promueven la unión de otras proteínas que contienen dominios SH_2 y SH_3 (Kurosaki, 1997; Kurosaki, 2002; Dal Porto *et al.*, 2004). De esta forma reclutan y fosforilan moléculas adaptadoras como Grb2 o Blnk e intermediarios de señalización como Vav1, PLC o PI3K (Dal Porto *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2008).

La proteína quinasa Lyn aproxima los dominios ITAM de CD79a y CD79b mediante su fosforilación, lo que se traduce en activación de la tirosina quinasa Syk, la cual fosforila de nuevo a Lyn (Kurosaki, 1997; Kurosaki, 2002; Dal Porto *et al.*, 2004). Syk, a su vez, media la activación de la GTPasa Rap1, la cual promueve la activación de las integrinas, favoreciendo la adhesión celular y diferenciación de células B (Batista *et al.*, 2007). Syk es clave en la transducción de señal desde el BCR en la selección positiva y señalización de células B inmaduras (Turner *et al.*, 1997), ya que fosforila a Blnk, responsable de la activación de las proteínas PLC, Vav1, Grb2 y Nck (Fu *et al.*, 1998; Dal Porto *et al.*, 2004). Blnk es requerida para la activación y desarrollo de las células B (Hayashi *et al.*, 2000), y una vez fosforilada, se asocia a los dominios SH_2 de la tirosina quinasa Btk (Hashimoto *et al.*, 1999). Btk se expresa en linfocitos B en todas sus etapas de diferenciación exceptuando células plasmáticas, pero no se expresa en linfocitos T o células mieloides (de Weers *et al.*, 1993). Btk se activa tras la señalización mediada por BCR, es necesaria para el desarrollo de células B y recluta, fosforila y activa a PLC, elevando el calcio intracelular tras estimulación (Khan *et al.*, 1995; Hashimoto *et al.*, 1999; Kurosaki, 2002). PLC contribuye a la activación de la vía PI3K/Akt y de la vía de las MAP quinasas, lo que promueve la proliferación celular (Kurosaki, 1997; Kurosaki, 2002; Niiro & Clark, 2002; Oh-Hora *et al.,* 2003; Aiba *et al.,* 2004). La señalización desde el BCR activa proteínas intermediarias como Vav1 y Grb2, las cuales regulan a las proteínas Rac implicadas en la remodelación del citoesqueleto de actina, e incrementan la actividad de la vía PI3K/Akt y la estimulación de las MAP quinasas, respectivamente (Kurosaki, 2002; Niiro & Clark, 2002; Dal Porto *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2010) (**Figura 8**).

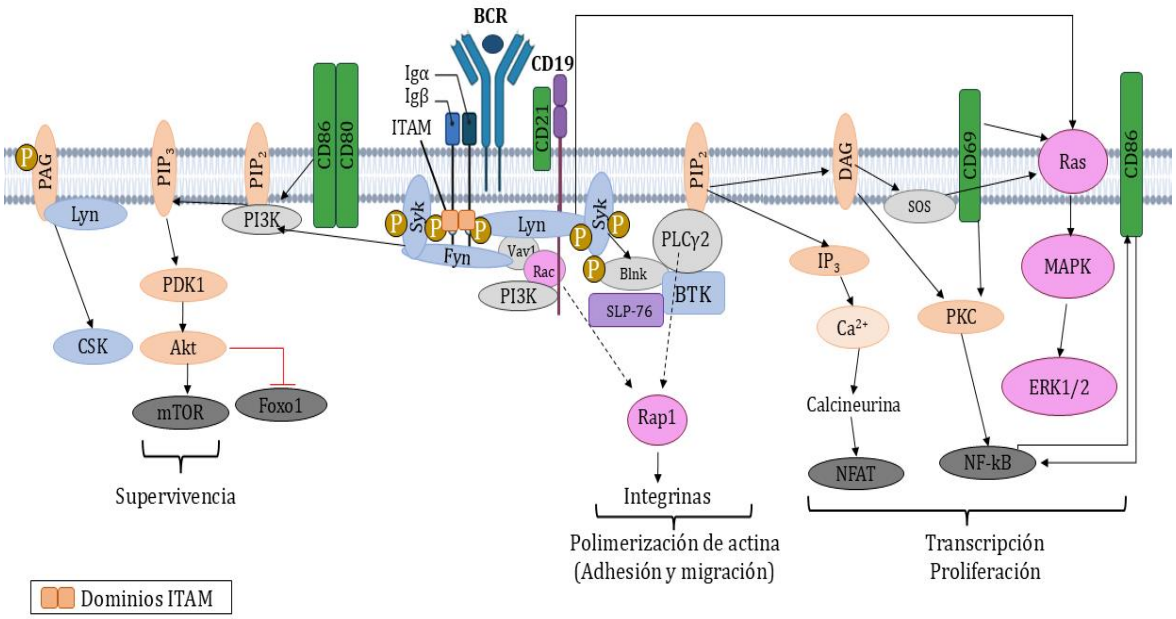


Figura 8. Señalización dependiente de BCR. Tras la activación del BCR, las proteínas Src fosforilan los dominios ITAM de las cadenas Igα e Igβ. Asimismo, las proteínas Src reclutan proteínas adaptadoras y segundos mensajeros que activan las vías PI3K/Akt, MAPK/ERK1/2 y NF-kB, así como a las integrinas, contribuyendo a la supervivencia, proliferación y adhesión celular de los linfocitos B (Niiro & Clark, 2002; Dal Porto *et al.*, 2004).

La estimulación del BCR desencadena la expresión de CD69 (Testi *et al.*, 1994; Minguet *et al.,* 2008), el cual juega un importante papel durante el desarrollo de las células pre-B (Lauzurica *et al.*, 2000). La expresión de CD69 puede ser asimismo inducida por LPS (Minguet *et al.,* 2008). Al igual que en timocitos T, la expresión de CD69 se asocia con la

inducción de apoptosis en células pre-B (Kishimoto *et al.*, 1995; Lauzurica *et al.*, 2000). Adicionalmente, la activación de células B mediante estimulación del BCR combinado con IL-4, o de TLR4 tras interacción con LPS, induce la expresión de CD86 (B7-2). Las células B en reposo expresan bajos niveles de CD86, pero tanto su mRNA como proteína aumentan tras estimulación del BCR o con LPS, actuando en sinergia con la estimulación de CD40 (Azuma *et al.*, 1993; Lenschow *et al.*, 1993; Lenschow *et al.*, 1994; Kohm *et al.*, 2002). CD86 es una glicoproteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas que cuenta con un dominio intracelular involucrado en la transducción de señales, y que presenta residuos de tirosina y sitios de fosforilación para PKC (Freeman *et al.*, 1993; Hathcock & Hodes, 1996). En células B, CD86 se une a sus ligandos CD28 y CTLA-4 expresados en la membrana de linfocitos T (Freeman *et al.*, 1993; Hathcock & Hodes, 1996; Lane, 1997), y juega un importante papel en la interacción de las células B con linfocitos T $CD4^+$ durante la formación de los GC (Borriello *et al*., 1997; Lane, 1997). Asimismo, la activación del CD86 potencia la proliferación de las células B y su secreción de IgG e IgE (Jeannin *et al*., 1997; Suvas *et al*., 2022). La estimulación de CD86 en linfocitos B incrementa la fosforilación de PKC, PLC y Akt, y activa la señalización de NF-kB en el núcleo (Kohm *et al.*, 2002; Kin & Sanders, 2006). Asimismo, aumenta la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-xl, favoreciendo la supervivencia de los linfocitos B (Suvas *et al*., 2022).

Los linfocitos B también requieren la estimulación por correceptores para conseguir una activación completa en la sinapsis inmune y para su proliferación (Zhu *et al*., 2011). El principal correceptor para la señalización en los linfocitos B es CD19, el cual se expresa desde las etapas pro-B hasta los linfocitos B maduros y las células plasmáticas (Kurosaki, 2002; Batista *et al.*, 2007), y su actividad es necesaria para la generación de las células MZB (Martin & Kearney, 2000; You *et al*., 2009). CD19 presenta un largo dominio citoplasmático susceptible de fosforilación por parte de Lyn y Syk tras activación del BCR. Esta fosforilación proporciona sitios de unión para proteínas que contienen dominios SH_2 como Vav1, Grb2 o subunidades p85 de PI3K (Kurosaki, 2002; Wang *et al*., 2002; Batista *et al.*, 2007). CD19 se asocia a IgM e IgD (Cyster & Allen, 2019), y forma asimismo un complejo con CD21 (Fearon & Carter, 1995), el cual se transloca próximo al BCR tras la activación del BCR para aumentar su señalización (Kurosaki, 2002). Otro de los correceptores es CD23, un receptor Fc de baja afinidad para IgE, que promueve el transporte de inmunocomplejos al folículo (Conrad *et al.*, 2007). CD23 se expresa en células B, principalmente en los precursores transicionales, como células T2 y pre-MZB, y disminuye a medida que se diferencian hacia células MZB (Pillai *et al.*, 2005). La activación del BCR también induce la fosforilación de correceptores inhibitorios, que actúan como un bucle de retroalimentación negativo sobre el BCR, como ocurre con CD22, que atenúa la señal del BCR mediante sus motivos ITIM (Kurosaki, 1997; Dal Porto, 2004).

Los linfocitos B expresan el receptor CD40, el cual se une a su ligando CD40L (CD154) expresado en la superficie de células T. La interacción CD40/CD40L ocurre de manera específica en los GC, donde los linfocitos B entran en contacto con los linfocitos T. La señalización por CD40 se traduce en un aumento de la proliferación de células B, la formación de los GC y el cambio de isotipo de Ig para generar respuestas T-dependientes (Grewal & Flavell, 1998; Zhu *et al*., 2011). El eje CD40/CD40L activa la vía canónica de NF-kB, la cual proporciona señales de supervivencia a los linfocitos B e induce su diferenciación a células plasmáticas y memoria (Zarnegar *et al.*, 2004; Klein & Dalla-Favera, 2008). Además, estimula la fosforilación de MAPK/ERK1/2, JNK y p38, contribuyendo a la progresión del ciclo celular y a la proliferación celular (Nomura *et al*., 1995; Li *et al.*, 1996b; Zhu *et al*., 2011), e induce la expresión de CD86 (Azuma *et al.*, 1993; van Kooten & Banchereau, 1997; Li *et al.*, 1999). Asimismo, el eje CD40/CD40L activa la vía no canónica de NF-kB, la cual induce la expresión de CXCR5 en células B (Wei *et al*., 2020). Otra molécula implicada en la coestimulación de linfocitos B es BAFFR, un receptor expresado en linfocitos B, cuyo ligando es BAFF, secretado por células mieloides (Thompson *et al.*, 2001; Rolink & Melchers, 2002). La interacción de BAFF/BAFFR produce señales esenciales para la activación y el desarrollo de células B incluidas las células MZB (Rolink & Melchers, 2002; Sasaki *et al*., 2004; Mackay & Schneider,

2009). La activación de BAFFR induce señalización principalmente a través de la vía alternativa de NF-kB, aunque también activa la vía canónica, y regula la supervivencia de los linfocitos B mediante la estimulación de la vía PI3K/Akt/mTOR (Mackay & Schneider, 2009). Asimismo, las células B requieren de la señalización de IL-4 para la proliferación y supervivencia, ya que esta citoquina potencia los efectos de la estimulación del BCR y del CD40 (Hodgkin *et al*., 1991; Nomura *et al*., 1995).

3. Migración linfocitaria hacia los órganos linfoides secundarios

Los linfocitos *naive* migran desde los órganos linfoides primarios hacia la sangre, y desde allí hacia el bazo y los LNs en donde finalizan su maduración y se activan tras reconocimiento de antígenos (Butcher & Picker, 1996; Batista & Harwood, 2009; Murphy & Weaver, 2017; Abbas *et al.*, 2018). Los OLS concentran los antígenos, aumentando las posibilidades de encuentro de los linfocitos con las APC, y tras reconocimiento antigénico, los linfocitos se diferencian a las poblaciones efectoras y de memoria (Butcher & Picker, 1996; Batista & Harwood, 2009; Masopust & Schenkel, 2013).

Los linfocitos B se sitúan en la región externa del córtex de los LNs, formando folículos e intercalados en una red de FDCs, que expresan la quimioquina CXCL13 requerida para la migración de los linfocitos B a esta región (Batista & Harwood, 2009; Mueller & Germain, 2009; Abbas *et al.*, 2018). Dentro de los folículos se localizan los GC, formados por células B proliferativas, activadas tras reconocimiento de antígeno y tras interacción con los linfocitos T foliculares. Las células B se distribuyen en los GC entre la zona oscura y clara según la expresión de CXCL12 y CXCL13 por parte de FDCs y células estromales respectivamente (Klein & Dalla-Favera, 2008; Batista & Harwood, 2009; Mueller & Germain, 2009). Los linfocitos T, junto con las DCs, se localizan en la zona paracortical bordeando los folículos y en contacto con los linfocitos B (Batista & Harwood, 2009; Mueller & Germain, 2009; Abbas *et al.*, 2018), y se encuentran embebidos en una red de FRCs que expresan las quimioquinas CCL19 y CCL21. Estas células secretan asimismo IL-7 y presentan complejos pMHC propios a los linfocitos T, lo cual proporciona una señalización tónica y basal del TCR para la supervivencia y homeostasis de estos linfocitos (Mueller & Germain, 2009; Takada & Jameson, 2009). Los linfocitos T y B *naive* circulantes son atraídos por CCL19 y CCL21 al interior de los LNs a través de las vénulas altas endoteliales (HEVs) de la región paracortical (Batista & Harwood, 2009; Mueller & Germain, 2009; Masopust & Schenkel, 2013; Murphy & Weaver, 2017). En la médula tiene lugar la presentación de antígenos por parte de APC, como las DCs y los macrófagos, y por parte de las células B (Batista & Harwood, 2009; Mueller & Germain, 2009; Murphy & Weaver, 2017). Los linfocitos T escanean las APC en busca de antígenos específicos, en caso de éxito se diferencian a linfocitos T efectores, los cuales salen de los LNs a través de los vasos linfáticos eferentes (Masopust & Schenkel, 2013; Murphy & Weaver, 2017; Abbas *et al.*, 2018) (**Figura 9**).

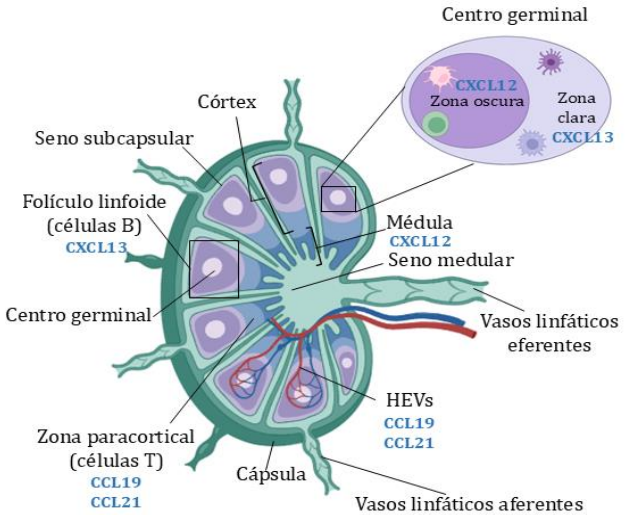


Figura 9. Estructura de los LNs. Estructura anatómica de un nódulo linfático y del centro germinal. En azul se indican las quimioquinas expresadas en cada región (Murphy & Weaver, 2017; Abbas *et al*., 2018).

La migración de linfocitos *naive* y memoria hacia los LNs tiene lugar en tres pasos (Butcher & Picker, 1996; Ley *et al.*, 2007; Alon & Ley, 2008). El primer paso consiste en el anclaje ("*tethering*") leucocitario sobre el endotelio de las HEVs, lo cual es mediado por selectinas y sus ligandos (Rosen, 2004; Ley *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2007; Alon & Ley, 2008). El *tethering* mediado por las selectinas no es suficiente para permitir a los leucocitos resistir la fuerza del flujo, lo que produce un "*rolling*" de estas células sobre la superficie endotelial. Este movimiento facilita la interacción de receptores de quimioquinas de los leucocitos con sus ligandos presentados por las células endoteliales, lo que se traduce en una activación de las integrinas LFA-1 y VLA-4, y en cambios conformacionales del citoesqueleto de actina. Todo esto facilita una parada firme y estable del leucocito sobre el endotelio vascular (Ley *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2007; Alon & Ley, 2008; Graham *et al.*, 2019). El paso final consiste en la migración transendotelial de los linfocitos entre las células endoteliales (Ley *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2007).

3.1. Quimioquinas implicadas en el tráfico linfoide

Las quimioquinas son una familia de citoquinas con propiedades quimioatrayentes para los leucocitos (Griffith *et al.*, 2014). Las quimioquinas se agrupan en cuatro subtipos dependiendo del número de residuos de cisteína en su extremo N-terminal. Los receptores de quimioquinas contienen un extremo N-terminal extracelular hidrofílico, siete dominios transmembrana y tres bucles intracelulares en su extremo C-terminal, en donde se acoplan las proteínas G heterotriméricas (GPCR), que son las responsables de transmitir la señalización dependiente de las quimioquinas (Allen *et al.*, 2007). Varias quimioquinas juegan un importante papel durante la migración linfocitaria, entre las que se incluyen CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13 (Griffith *et al.*, 2014).

3.1.1. Eje CCR7/CCL19/CCL21

CCR7 es un receptor para CCL19 y CCL21, y es el principal receptor que media la entrada de los linfocitos T *naive* y memoria centrales a los OLS (Förster *et al.*, 2008). CCR7 tiene un papel fundamental en la migración de estos linfocitos hacia las zonas T (Okada & Cyster, 2007; Worbs *et al.*, 2007; Förster *et al.*, 2008), ya que CCL21 y CCL19 se expresan en la superficie luminal de las HEVs y en los senos marginales del bazo (Luther *et al.*, 2000; Mueller & Germain, 2009). La unión de CCL19 a CCR7, pero no de CCL21, induce la desensibilización e internalización de CCR7 en los linfocitos a medida que se posicionan en los OLS (Bardi *et al.*, 2001; Masopust & Schenkel, 2013). Los ratones deficientes en CCR7 muestran una falta de linfocitos T *naive* en los LNs y en las zonas PALS del bazo (Förster *et al.*, 1999; Förster *et al.*, 2008), mientras que los ratones deficientes en los ligandos de CCR7 presentan una falta de migración de linfocitos T a las zonas T de los LNs (Okada & Cyster, 2007). Asimismo, las células B expresan bajos niveles de CCR7, lo que contribuye a su tráfico en los LNs (Abbas *et al.*, 2018). Tras la captura del antígeno, las células B se activan y comienzan a expresar CCR7, saliendo del folículo atraídos por CCL21 de las regiones de células T, para establecer conjugados con las DCs y con linfocitos T $CD4^+$ *helper* (Reif *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2005; Förster *et al.*, 2008; Cyster & Allen, 2019).

3.1.2. Eje CXCR4/CXCL12

CXCL12 (SDF-1) es una quimioquina homeostática que se expresa de manera ubicua en tejidos embrionarios y adultos, especialmente en MO, timo, bazo y LNs, y cuyo receptor es CXCR4 (Loetscher *et al.*, 1994; Oberlin *et al.*, 1996; Crump *et al.*, 1997; Teixidó *et al.*, 2018). El eje CXCL12/CXCR4 es esencial para la generación y expansión de las células HPSCs, y juega un importante papel en la linfopoyesis B en la MO (Nagasawa, 1996; Ma *et al.*, 1998). Ratones deficientes en CXCL12 muestran un déficit de las poblaciones celulares pre-pro-B, mientras que la falta de CXCR4 genera alteraciones en el *homing* hacia la MO de las células progenitoras y plasmáticas (Nagasawa, 2006; Chu *et al.*, 2012). Ratones deficientes en CXCR4

muestran defectos del *homing* de linfocitos T y B en los LNs únicamente cuando carecen también de CCR7 (Okada *et al.*, 2002). CXCL12 se expresa también en la pulpa roja del bazo (Mueller & Germain, 2009), y la inactivación de CXCR4 en precursores de células B genera una reducción del número de células B en la MZ del bazo y en los folículos (Nie *et al*., 2004).

3.1.3. Los receptores CXCR5 y S1PR1 en el tráfico linfocitario

La señalización desencadenada tras la interacción de CXCR5 con su ligado CXCL13, generado por células estromales, FDCs, FRCs y HEVs de la pulpa blanca del bazo y los LNs, juega un papel importante en el tráfico de los linfocitos B *naive* y memoria hacia el interior de los folículos de los OLS (Förster *et al.*, 1996; Ansel *et al.*, 2000; Ebisuno *et al*., 2003; Cyster & Allen, 2019; Lu & Cyster, 2019). Así, las células B transicionales T1 migran al interior de los folículos del bazo en respuesta a CXCL13, diferenciándose posteriormente a células transicionales T2 (Pillai & Cariappa, 2009). Asimismo, las células T $CD4^+$ requieren la señalización del eje CXCL13/CXCR5 para la formación de células Th foliculares, las cuales residen en la zona clara de los GC (Crotty *et al.*, 2014).

La salida de los linfocitos T y B desde los órganos linfoides primarios y secundarios hacia sangre periférica y linfa requiere la actividad de S1PR1, un receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas cuyo ligando es S1P (Chiba *et al*., 2006; Cyster & Schwab, 2012), ya que ratones con células hematopoyéticas carentes de S1PR1 muestran un déficit de linfocitos T y B en sangre periférica, incapaces de salir de los OLS (Matloubian *et al.*, 2004). S1P es un fosfolípido generado por la fosforilación de la esfingosina formada tras la escisión de la esfingomielina de membrana de eritrocitos, plaquetas y células endoteliales linfáticas, por lo que sus niveles son elevados en sangre y linfa (Davis & Kehrl, 2009; Mueller & Germain, 2009; Cyster & Schwab, 2012). En cambio, la concentración de S1P es moderada en la pulpa roja y blanca del bazo, y no se expresa en la zona de linfocitos T de los LNs y del bazo (Masopust & Schenkel, 2013; Ramos-Pérez *et al.*, 2015). La unión de S1P a S1PR1 se traduce en la internalización y desensibilización de este receptor en los linfocitos T y B en circulación sanguínea o linfática, lo que permite su recirculación a los OLS en respuesta a ligandos de otros receptores como CCR7 o CXCR5 (Cyster & Schwab, 2012).

El balance entre los ejes CXCL13/CXCR5 y S1P/S1PR1 es requerido por las células MZB para migrar entre la zona marginal y folicular (Cinamon *et al.*, 2008; Lu & Cyster, 2019). La mayor expresión de S1PR1 en las células MZB que en las células FOB promueve su localización en la MZ al estar expuestas a S1P del seno marginal (Cinamon *et al*., 2004; Cyster & Schwab, 2012). Una de las funciones de S1PR1 consiste en oponerse a las señales ejercidas por CXCL13, puesto que células MZB deficientes en S1PR1 en ratones carentes de CXCL13 muestran una localización en la zona marginal (Cinamon *et al*., 2004). La elevada concentración de S1P en la MZ causa la desensibilización del S1PR1 de las células MZB, lo que permite su migración al interior del folículo mediante la interacción de CXCR5 de estas células con CXCL13. Posteriormente, los bajos niveles de S1P en el interior del folículo facilitan la resensibilización de S1PR1 en la membrana de las células MZB, las cuales responden nuevamente al gradiente de S1P, desplazándose de nuevo hacia la MZ (Cinamon *et al.*, 2008; Cyster & Schwab, 2012; Arnon *et al.*, 2013; Cyster & Allen, 2019). En la MZ, las células MZB quedan retenidas por la adhesión de las integrinas α4β1 y αLβ2 a sus ligandos VCAM-1 e ICAM-1, respectivamente (Lu & Cyster, 2002). En cambio, las células FOB cercanas al seno marginal señalizan a través de S1P/S1PR1 desplazándose a la MZ, aunque son arrastradas fácilmente por el flujo sanguíneo debido a su baja expresión de α4β1 y αLβ2 (Lu & Cyster, 2002; Cyster & Schwab, 2012) (**Figura 10**). A medida que las células FOB y MZB se diferencian a plasmablastos y células productoras de anticuerpos, aumentan la expresión de S1PR1 según disminuyen la expresión de CXCR5, favoreciendo su salida de los OLS (Chu *et al.*, 2012; Nutt *et al.*, 2015).

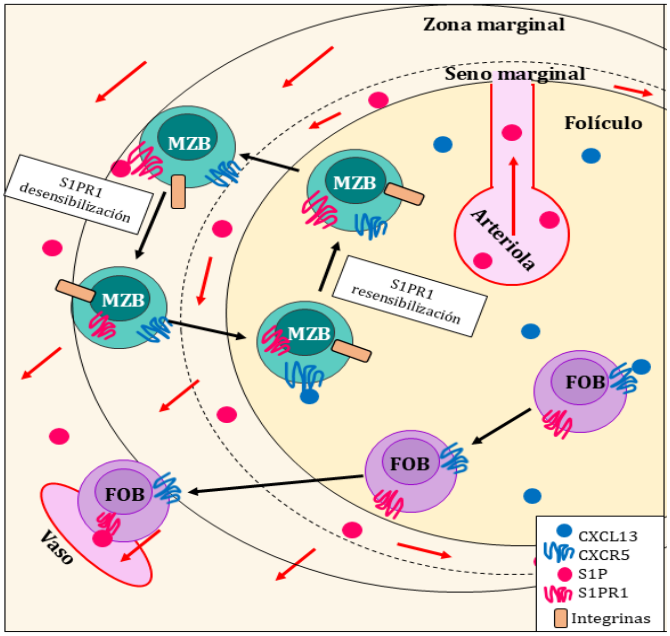


Figura 10. Regulación del tráfico de las células FOB y MZB por S1PR1 y CXCR5. Las flechas rojas indican la dirección de flujo sanguíneo (Adaptada de Cyster & Schwab, 2012).

El tráfico de los linfocitos T y B es también controlado por la actividad de CD69 y Klf2 (*Krüppel-like factor 2*), los cuales regulan la expresión de S1PR1 (Shiow *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2007; Bankovich *et al.*, 2010; Hart *et al.*, 2012). CD69 interacciona en cis con S1PR1, lo cual induce la internalización y degradación de S1PR1, por lo que CD69 actúa como inhibidor del receptor de S1P durante el tráfico de linfocitos T y B desde los órganos linfoides primarios y los OLS (Nakayama *et al.*, 2002; Bankovich *et al.*, 2010; Zachariah & Cyster, 2010), favoreciendo la retención linfocitaria (Shiow *et al.*, 2006). Así, los linfocitos T activados, linfocitos T $CD4^+$ *helper* foliculares o linfocitos T $CD8^+$ tisulares expresan CD69, favoreciendo su retención en los tejidos y OLS (Cyster & Schwab, 2012; Skon *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015).

En las células T, Klf2 promueve la expresión de S1PR1 y de CD62L, por lo que favorece su migración desde los órganos linfoides primarios y OLS a circulación (Kuo *et al.*, 1997; Carlson *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2007; Hart *et al.*, 2012), y promueve asimismo su quiescencia al inhibir la proliferación mediante la represión de *Myc* (Buckley *et al.*, 2001; Wu & Lingrel, 2004). Adicionalmente, Klf2 reprime la expresión de *Cxcr5* en las células Th foliculares (Weber *et al.*, 2015). Por tanto, las células Th foliculares, células T memoria residentes o células T activadas expresan niveles reducidos de Klf2, lo que se traduce en una disminución de la expresión de S1PR1, que a su vez se asocia con un aumento de expresión de CD69. Todo ello favorece la proliferación y la retención de estas células en los OLS y tejidos periféricos (Kuo *et al.*, 1997; Takada *et al.*, 2011; Skon *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015). Por otro lado, Klf2 regula la homeostasis de células B en los OLS e incrementa la expresión de CD62L e integrinas β7, a la vez que reprime la expresión de CXCR7 en células FOB (Hart *et al.*, 2011; Winkelmann *et al.*, 2011; Wittner & Schuh, 2023). A pesar de que un estudio indicó que las células MZB deficientes en Klf2 muestran una reducción de expresión de CXCR5 y S1PR1 (Hoek *et al.*, 2010), otros dos estudios realizados en ratones deficientes en Klf2 no confirmaron la regulación de CXCR5 y S1PR1 por Klf2 en células B (Hart *et al.*, 2011; Winkelmann *et al.*, 2011).

3.2. Integrinas

Las integrinas son glicoproteínas transmembrana heterodiméricas, formadas por la unión no covalente entre las subunidades α y β, y que median adhesión a proteínas de la matriz extracelular (ECM) y a otras células (Hynes, 2002; Carman & Springer, 2003; Calderwood, 2004; Sun *et al.*, 2019). La adhesión dependiente de integrinas está implicada en respuestas de mecanotransducción, polaridad celular y de reorganización del citoesqueleto

de actina. Asimismo, la unión de las integrinas con sus ligandos activa diferentes rutas de señalización, entre las que se incluyen las vías PI3K/Akt y de las MAP quinasas, implicadas en la regulación de la proliferación y supervivencia celular. Adicionalmente, la adhesión mediada por integrinas juega importantes papeles en respuestas autoinmunes y en cáncer (Hynes, 2002; Schwartz & Ginsberg, 2002; Kim *et al.*, 2003). En mamíferos existen dieciocho subunidades α que se combinan con ocho subunidades β distintas, formando en total veinticuatro heterodímeros de integrinas diferentes, que se agrupan en subfamilias según su especificidad de ligando (Hynes, 2002; Calderwood, 2004; Moreno-Layseca *et al.*, 2019; Nolte & Margadant, 2020) (**Figura 11**). Once de estas integrinas están expresadas en células del sistema inmune (Hynes, 2002; Davis, 2009).

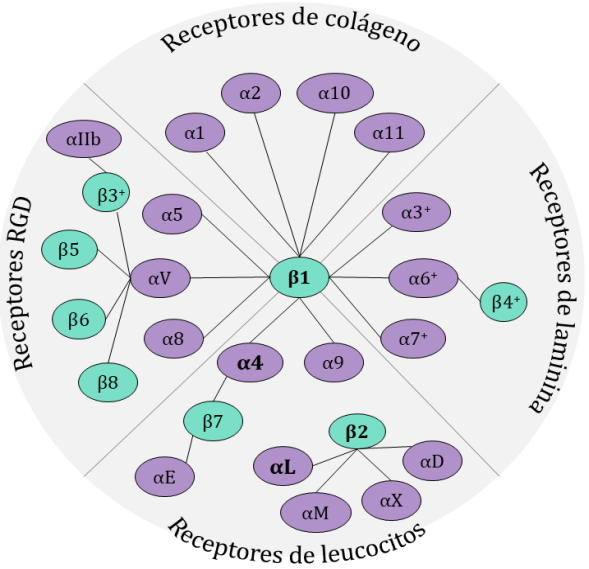


Figura 11. Familia de las integrinas. Clasificación de las integrinas en cuatro subfamilias. Se destacan en negrita las integrinas más importantes en este trabajo (Hynes, 2002).

Cada subunidad de las integrinas está compuesta por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular (Hynes, 2002; Calderwood, 2004; Evans *et al.*, 2009). Los dominios extracelulares de las subunidades α y β conforman el lugar de unión a los ligandos de las integrinas, y contienen la región MIDAS, que es el sitio de unión de cationes divalentes requeridos para el reconocimiento de ligandos (Hynes, 2002; Carman & Springer, 2003).

4. Regulación de la actividad de las integrinas

La actividad de las integrinas puede ser regulada mediante el control de la afinidad y de la avidez por sus ligandos extracelulares. La afinidad es la fuerza de unión monovalente de la integrina al ligando, mientras que la avidez se refiere a la eficiencia de la interacción con los ligandos por medio de clústers de integrinas (Carman & Springer, 2003; Calderwood, 2004; Evans *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2019). El control de la activación de las integrinas está basado en cambios conformacionales en sus dominios transmembrana y citoplásmico que se traducen en la generación de un dominio extracelular con alta afinidad por sus ligandos. El dominio citoplasmático de la subunidad β contiene las secuencias altamente conservadas NPLY (proximal) y NPxY (distal), a las que se unen proteínas activadoras con dominios de unión a fosfotirosina (PTB), tales como talina y kindlin (Chen *et al.*, 1990; Reszka *et al.*, 1992; Hynes, 2002; Calderwood, 2004; Rognoni *et al.*, 2016; Nolte & Margadant, 2020).

El proceso de activación de las integrinas, documentado en linfocitos T en migración usando como modelo la integrina LFA-1, es explicado mediante el modelo de la fuerza del citoesqueleto celular, que establece que la fuerza de tensión dependiente de la actina regula directamente la activación de las integrinas (Nordenfelt *et al.*, 2016). Según este modelo, las integrinas presentarían inicialmente una conformación inactiva de baja afinidad, en la que los dominios citoplasmáticos y transmembrana estarían cercanos, y el dominio extracelular

plegado, formando una estructura cerrada que impide la unión al ligando (**Figura 12**) (Takagi *et al.*, 2002; Carman & Springer, 2003; Evans *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2019; Nolte & Margadant, 2020). En esta conformación no se ejercen fuerzas de tensión debido a la falta de unión de la integrina con talina, kindlin y el citoesqueleto de actina (Nordenfelt *et al.*, 2016). Posteriormente, tendría lugar el proceso de señalización *inside-out,* un conjunto de eventos en el interior celular que incrementan la afinidad de las integrinas por sus ligandos (Carman & Springer, 2003; Evans *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2019). Esta señalización es desencadenada por la estimulación antigénica de los receptores TCR y BCR, y por la unión de quimioquinas a sus receptores (Evans *et al.*, 2009; Sosa-Costa *et al.*, 2016; Nolte & Margadant, 2020). La señalización *inside-out* estimula la unión de talina y kindlin al dominio citoplasmático de las subunidades β, desestabilizando la asociación de las regiones citoplasmáticas y transmembrana de las subunidades α y β, lo que causa su separación y la extensión de las integrinas. Esto se traduce en la generación de una conformación de activación intermedia, ya que el dominio extracelular aún permanece cerrado (Takagi *et al.*, 2002; Carman & Springer, 2003; Evans *et al.*, 2009; Nolte & Margadant, 2020) (**Figura 12**). La extensión de la integrina y la apertura del dominio extracelular requieren, simultáneamente, la unión a su ligando y la aplicación de fuerzas de tensión. Dicha fuerza se basa en la interacción de la actina con talina y kindlin que se encuentran asociados a los motivos NPxY de las subunidades β de las integrinas. Por tanto, talina y kindlin actúan como sensores de la fuerza de tensión del citoesqueleto (Nordenfelt *et al.*, 2016). Esta fuerza de tensión aumenta la separación de los dominios citoplásmicos de las subunidades α y β, produciendo un movimiento en forma de pistón que desestabiliza la cabeza de las integrinas (Takagi *et al.*, 2002; Carman & Springer, 2003; Nordenfelt *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2019), dejando al descubierto la región MIDAS de unión de cationes divalentes y la apertura del sitio de unión del ligando. Así, forman una estructura extendida y abierta de alta afinidad por el ligando (Hynes, 2002; Takagi *et al.*, 2002; Carman & Springer, 2003; Nordenfelt *et al.*, 2016) (**Figura 12**). La unión de la integrina al ligando ofrece resistencia a la tensión generada por la actina sobre el dominio citoplasmático de la subunidad β, lo cual estabiliza y favorece la conformación de alta afinidad de la integrina. Estas fuerzas de tensión generadas sobre el ligando reducen el flujo retrógrado de la actina, disminuyendo la migración celular (Nordenfelt *et al.*, 2016). Finalmente, la pérdida de unión a la actina desestabiliza la conformación abierta del dominio extracelular de la integrina, adquiriendo de nuevo una conformación cerrada de baja afinidad por el ligando (Nordenfelt *et al.*, 2016) (**Figura 12**).

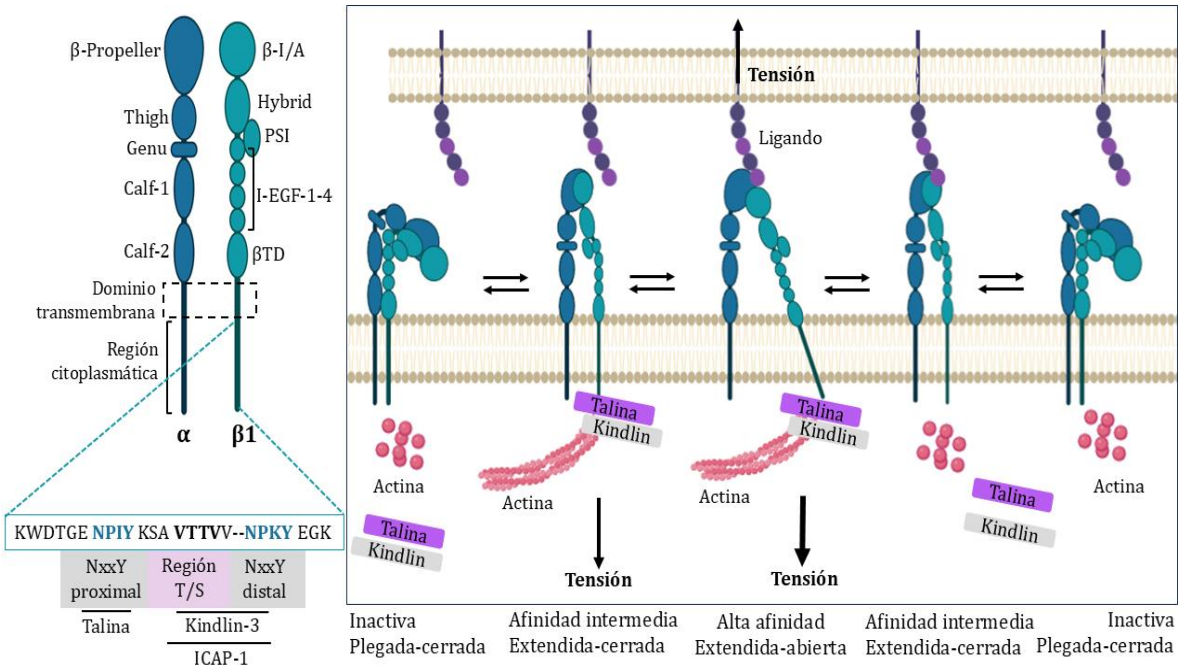


Figura 12. Modelo de activación de las integrinas. (Izquierda) Se muestra la estructura de los dominios extracelulares, transmembrana y citoplásmicos de las subunidades α y β de las integrinas, y

las secuencias conservadas de unión de proteínas reguladoras de las subunidades β. (Derecha) Esquema del proceso de activación de las integrinas (Adaptada de Nordenfelt *et al.*, 2016; Nolte & Margadant, 2020).

4.1. La integrina α4β1

Las integrinas leucocitarias son necesarias para el desarrollo del sistema inmune, para el tráfico linfocitario, para la formación de sinapsis inmunes, y para la generación de las respuestas inmunes (Hynes, 2002; Nolte & Margadant, 2020). Las principales integrinas expresadas en linfocitos T y B son LFA-1 (αLβ2; CD11a/CD18), cuyo ligando es ICAM-1, y VLA-4 (α4β1; CD49d/CD29), cuyos ligandos son VCAM-1 y fibronectina (FN) (Springer, 1994; Butcher *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2009). La FN es una de las glicoproteínas mayoritarias de la ECM y contiene el dominio CS-1 al que se unen las integrinas α4β1 y α4β7 (Wayner *et al.*, 1989; Guan *et al.*, 1990; Dalton & Lemmon, 2021). VCAM-1 es una glicoproteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas, expresada predominantemente por células endoteliales estimuladas por TNF-α e IL-1 (Osborn *et al.*, 1989; Neish *et al.*, 1992; Osborn *et al.*, 1992).

Tanto VCAM-1 como FN se expresan en el microambiente de la MO, y contribuyen al tráfico y posicionamiento de las células HPSCs mediante su interacción con α4β1 (Papayannopoulou & Nakamoto, 1993; Lobb & Hemler, 1994; Nagasawa, 2006). Sin embargo, estudios con ratones deficientes en las subunidades α4 y β1 en las células hematopoyéticas han mostrado que α4β1 no es esencial durante la hematopoyesis de progenitores tempranos de la MO ni durante la diferenciación linfoide (Brakebusch *et al.*, 2002; Bungartz *et al.*, 2006; Gribi *et al.*, 2006). Asimismo, se ha documentado que la retención de los timocitos DP inmaduros en la región cortical del timo es mediada por la interacción α4β1/VCAM-1, mientras que la adhesión dependiente de α4β1 a FN contribuye a la migración de los timocitos seleccionados a la médula del timo (Salomon *et al.*, 1997). Aunque α4β1 contribuye al tráfico de los timocitos durante la timopoyesis, su función no es requerida para este proceso (Arroyo *et al.*, 1996; Arroyo *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2002; Bungartz *et al.*, 2006).

α4β1 y αLβ2 son esenciales para la migración transendotelial de linfocitos a la sangre y tejidos periféricos (Springer, 1994; Butcher & Picker, 1996; Rose *et al.*, 2002). VCAM-1 es expresada por FDCs, FRCs y células estromales de la pulpa roja y de los senos venosos del bazo (Lu & Cyster, 2002; Mueller & Germain, 2009), mientras que en la MZ predomina la expresión de ICAM-1, lo que contribuye a la retención de las células MZB y evita su migración hacia la pulpa roja (Tedford *et al.*, 2017). Se ha demostrado que el bloqueo de α4β1 o αLβ2 induce el desplazamiento de las células MZB a circulación (Lu & Cyster, 2002; Arnon *et al.*, 2013), mientras que la inhibición de αLβ2, solo o en combinación con α4β1, reduce pero no evita la entrada de los linfocitos T y B a la pulpa blanca del bazo (Chauveau *et al.,* 2020). Las integrinas α4 también intervienen en el reclutamiento leucocitario a sitios de inflamación en enfermedades inflamatorias crónicas, y contribuye a la patogénesis de linfomas y leucemias de células B (Rose *et al.*, 2002).

4.2. Estructura y función de ICAP-1

Como se ha mencionado anteriormente, la activación de las integrinas implica la unión de proteínas como la talina y kindlin al dominio citoplasmático de las subunidades β, provocando un cambio de conformación que permite la interacción de alta afinidad de las integrinas con sus ligandos (Calderwood, 2004; Sun *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020). Sin embargo, dicho dominio constituye asimismo un lugar de unión de proteínas que compiten con talina y/o kindlin e inactivan a las integrinas, como es el caso de ICAP-1 (Chang *et al.*, 1997; Zhang & Hemler, 1999; Chang *et al.*, 2002; Bouvard *et al.*, 2003; Calderwood, 2004). ICAP-1 interacciona con subunidades β1, pero no con las subunidades β2, β3 o β5, ni con subunidades α (Chang *et al.*, 1997; Zhang & Hemler, 1999) (**Figura 13**). De este modo, ICAP-1

constituye un regulador negativo de las integrinas β1, manteniéndolas en su conformación cerrada de baja afinidad (Bouvard *et al.*, 2003; Brunner *et al.*, 2011), lo que se traduce en una inhibición de la adhesión celular (Calderwood, 2004; Bouvard *et al.*, 2006; Millon-Frémillon *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la sobreexpresión de ICAP-1 impide la unión de talina a las integrinas β1, induciendo un desensamblaje de las adhesiones focales (Bouvard *et al.*, 2003; Bouvard *et al.*, 2006; Millon-Frémillon *et al.*, 2008). Por el contrario, las células carentes de ICAP-1 muestran un incremento de la conformación activa de la subunidad β1 y de la adhesión mediada por integrinas β1 (Bouvard *et al.*, 2007).

ICAP-1 se expresa de manera ubicua (Chang *et al.*, 1997; Zhang & Hemler, 1999), habiéndose documentado dos formas que se originan por *splicing* alternativo. La isoforma más grande, ICAP-1α (de ahora en adelante ICAP-1), contiene doscientos aminoácidos e interacciona con la subunidad β1 de las integrinas a través de su extremo C-terminal. Éste contiene un dominio de unión a fosfotirosinas (PTB) (Chang *et al.*, 2002; Bouvard *et al.*, 2006), que se une de manera específica a la valina de la posición -5 del motivo distal NPxY de la cola citoplasmática de la subunidad β1. La isoforma más corta, ICAP-1β, presenta ciento cincuenta aminoácidos, y es incapaz de unirse a la subunidad β1 (Chang *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2002; Bouvard *et al.*, 2006) (**Figura 13**). ICAP-1 contiene un extremo N-terminal rico en residuos de serina y treonina con diversos sitios de unión para las quinasas PKA, PKC y CaMKII, con potencial de fosforilación tras la adhesión celular mediada por integrinas β1 (Chang *et al.*, 1997; Bouvard *et al.*, 2003; Bouvard *et al.*, 2006; Millon-Frémillon *et al.*, 2013). La fosforilación de ICAP-1 mediada por CaMKII interrumpe la forma autoinhibida y cerrada de ICAP-1 generada por la interacción entre los extremos N- y C-terminal. Esto se traduce en la formación de una conformación activa, ya que libera el dominio PTB de ICAP-1, y por tanto puede competir con talina y kindlin por la unión a la subunidad β1 (Millon-Frémillon *et al.*, 2013).

ICAP-1 presenta asimismo una secuencia de localización nuclear (NLS) de residuos KKHR en su extremo N-terminal (Fournier *et al.*, 2005) (**Figura 13**), lo que permite su localización en el núcleo. La deleción de la secuencia NLS impide la localización nuclear de ICAP-1, aumenta la regulación negativa de las integrinas β1 y causa una disminución de la proliferación celular (Fournier *et al.*, 2005; Bouvard *et al.*, 2007; Draheim *et al.*, 2017). Asimismo, se ha mostrado que la fosforilación de ICAP-1 se traduce en su retención en el citoplasma, e impide su translocación al núcleo (Su *et al.*, 2020). Adicionalmente, la sobreexpresión de la subunidad β1 se traduce en un secuestro de ICAP-1 en el citosol y en la inhibición de su distribución al núcleo (Fournier *et al.*, 2005).

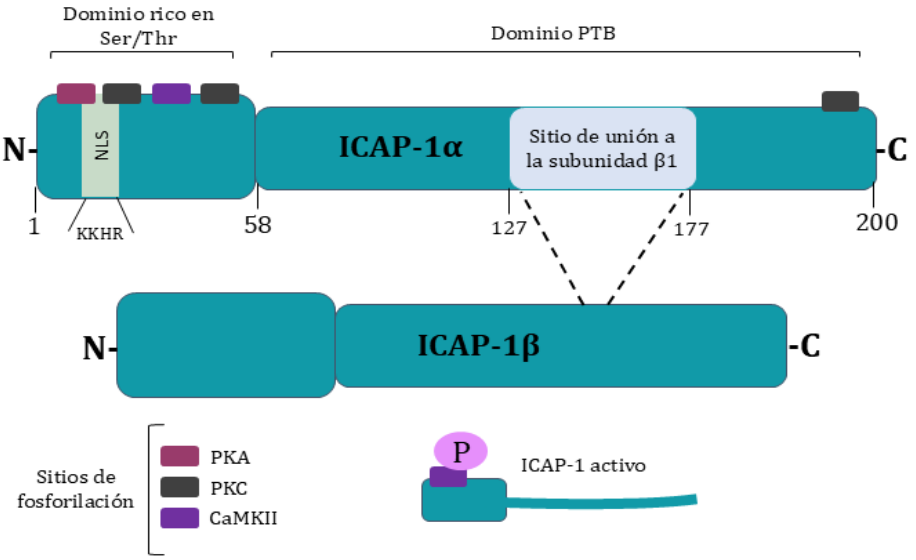


Figura 13. Estructura de ICAP-1α. Estructura de ICAP-1 indicando los dominios de fosforilación, de unión a la subunidad β1 y la secuencia NLS (Adaptada de Bouvard *et al.*, 2006; Millon-Frémillon *et al.*, 2013).

ICAP-1 se une asimismo a los dominios NPxY de Krit1, una proteína con capacidad de competir con la subunidad β1 por la unión de ICAP-1, desplazándolo de la membrana (Zhang *et al.*, 2001; Zawistowski *et al.*, 2002; Béraud-Dufour *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013). La interacción de Krit1 con ICAP-1 evita que éste último sea degradado por el proteasoma (Faurobert *et al.*, 2013). Por otra parte, ICAP-1 puede contribuir al transporte de Krit1 al núcleo, ya que Krit1 presenta también una secuencia NLS para su translocación nuclear (Draheim *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2020). Otro mecanismo de inhibición de la unión de ICAP-1 a la subunidad β1 procede de su monoubiquitinación mediante la proteína Smurf1 (Bouin *et al.,* 2017).

ICAP-1 puede interaccionar asimismo con Nm23-H2 (Fournier *et al.*, 2002), una proteína quinasa con capacidad de activación de la transcripción de c-Myc (Postel *et al.*, 1993; Postel *et al.*, 1996). La unión de ICAP-1 con Nm23-H2 tiene lugar tanto en regiones submembranales (Fournier *et al.*, 2002), como en el núcleo, uniéndose a regiones promotoras de *Myc* y promoviendo la proliferación celular (Fournier *et al.*, 2005). Se ha mostrado que ICAP-1 aproxima Nm23-H2 a las integrinas de membrana, participando en la endocitosis y reciclaje de las mismas (Fournier *et al.*, 2002; Kyumurkov *et al.*, 2023). Adicionalmente, se ha documentado que ICAP-1 inhibe la activación de las GTPasas Rac y Cdc42, causando una deficiente regulación de la organización del citoesqueleto de actina, e inhibiendo el *spreading* sobre la ECM (Degani *et al*., 2002).

Los ratones deficientes en ICAP-1 muestran un fenotipo característico de enanismo moderado y un dimorfismo craneofacial severo, con un déficit y retraso en la osificación (Bouvard *et al.*, 2007). Estas alteraciones en el desarrollo óseo se deben a un defecto autónomo de proliferación y de diferenciación de los osteoblastos. Estos últimos experimentan una mayor activación de integrinas β1 y un incremento de la adhesión celular (Bouvard *et al.*, 2007), lo que genera una menor compactación celular y afecta negativamente a la mineralización de los osteoblastos (Brunner *et al*., 2011). Adicionalmente, la ausencia de ICAP-1 causa defectos vasculares, caracterizados por una mayor dilatación y permeabilidad vascular (Faurobert *et al.*, 2013).

II. EL MIELOMA MÚLTIPLE Y MICRORNAS

1. Epidemiología y características del mieloma múltiple

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células plasmáticas malignas que proliferan de manera incontrolada en la MO (Hideshima *et al.*, 2007; Kuehl & Bergsagel, 2012; Morgan *et al.*, 2012; Kumar & Anderson, 2016). El MM representa la 2ª neoplasia hematológica más frecuente tras el linfoma de no Hodgkin y la supervivencia de los pacientes suele ser de 3-6 años dependiendo del tratamiento (Kuehl & Bergsagel, 2012; Kumar *et al.*, 2017). La incidencia del MM es mayor en países desarrollados económicamente, es menor en la población asiática e hispana y mayor en la población afroamericana (Kumar *et al.*, 2017). La proliferación de las células de MM en la MO inhibe la hematopoyesis, produciendo inmunodeficiencias, pancitopenias y anemia, debido al reemplazamiento de las células hematopoyéticas normales. Asimismo, incrementa la actividad de los osteoclastos, que son los responsables de las lesiones óseas características de esta neoplasia (Hideshima *et al.*, 2007; Kuehl & Bergsagel, 2012; Kumar *et al*., 2017). La mayoría de los pacientes con MM muestran una sobreproducción de inmunoglobulinas monoclonales, conocidas como paraproteína o proteína M, expresadas por las células de MM (Hideshima *et al*., 2007; Kumar *et al.*, 2017). El acúmulo de la paraproteína M y de cadenas ligeras de inmunoglobulinas obstruye los túbulos renales, afectando a su correcto funcionamiento y causando insuficiencia renal (Kumar *et al*., 2017).

En general, el MM progresa a partir de una enfermedad premaligna asintomática, conocida como gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), en la que no se detectan lesiones tisulares (Kuehl & Bergsagel, 2012; Morgan *et al.*, 2012; Rajkumar, 2022).

MGUS muestra bajos niveles de células plasmáticas en MO (<10%), y bajos niveles de proteína M en sangre y orina (<3 g/dL). El MGUS progresa hacia un MM incipiente (*smoldering MM*, SMM), que continúa siendo asintomático, pero en el que el número de células plasmáticas en la MO y de proteína M en sangre y orina aumenta (Kuehl & Bergsagel, 2012; Kumar *et al*., 2017; Rajkumar, 2022). El SMM suele progresar hacia leucemias de células plasmáticas o bien al MM intramedular (Kuehl & Bergsagel, 2012; Kumar *et al.*, 2017). El MM se caracteriza por una infiltración de células plasmáticas malignas en la MO superior al 60% y por unos niveles de IgL libres elevados (>100 mg/L) (Kumar *et al.*, 2017; Rajkumar, 2022). En fases avanzadas de la enfermedad, las células de MM pueden independizarse de la MO y migrar a localizaciones extramedulares, como a la sangre, generando una leucemia de células plasmáticas, o bien a órganos como bazo e hígado, lo que se conoce como MM extramedular (EMM) (Kuehl & Bergsagel, 2012; Kumar *et al.*, 2017). El EMM es la forma más agresiva y progresa rápidamente (Kuehl & Bergsagel, 2012; García-Ortiz *et al*., 2021; Rajkumar, 2022).

2. Origen y causas del MM

El MM es una enfermedad heterogénea, en la que la mayoría de los pacientes presentan diversas alteraciones genéticas (Morgan *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2017; Rajkumar, 2022). Comúnmente, existen dos eventos desencadenantes de la enfermedad. El primer evento consiste en las aneuploidías, de las que las más frecuentes son las hiperploidías, tales como las trisomías, que están asociadas a una mejor supervivencia. Por el contrario, las no hiperploidías, como las hipoploidías, muestran un peor pronóstico (Hideshima *et al*., 2007; Morgan *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2017). El segundo evento consiste en translocaciones, las cuales se generan durante la recombinación de clases de inmunoglobulinas y la hipermutación somática, donde tienen lugar cortes de las dobles cadenas de DNA de los genes de IgH que pueden producir fusiones inadecuadas (Kumar *et al.*, 2017). Muchas de las primeras translocaciones que se producen implican a los genes de la cadena IgH y afectan a genes relacionados con el ciclo celular, como *CCND1* (t[11;14]), *CCND3* (t[6;14]), *MAF* (t[14;16]), *FGF3* (t[4;14]) y *MAFB* (t[14;20]), entre otros (Hideshima *et al*., 2007; Kuehl & Bergsagel, 2012; Morgan *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2017). A medida que el MM progresa se producen alteraciones genéticas secundarias que contribuyen al progreso de la enfermedad. Entre ellas se encuentran mutaciones en *MYC* (t[8;14]), la deleción del cromosoma 1 (1q), que afecta a ciclinas, deleción de parte del cromosoma 13 (13q), generando haploinsuficiencia de Rb, o pérdida parcial del cromosoma 17 (17p), que afecta al locus de p53. Asimismo, tanto en MGUS como en MM se produce una inactivación de los genes *CDKN2A* y *CDKN2C* (Hideshima *et al*., 2007; Kuehl & Bergsagel, 2012; Morgan *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2017; Rajkumar, 2022). Adicionalmente, en la población de las células de MM coexisten diferentes subclones con mutaciones secundarias, tales como mutaciones activadoras en *BRAF, KRAS*, *NRAS* (Hideshima *et al*., 2007; Kuehl & Bergsagel, 2012; Morgan *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2017; Rajkumar, 2022), y se producen alteraciones epigenéticas que incluyen metilaciones del DNA de *MYC* o *CCND1* (Morgan *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2017), y la regulación de la expresión de microRNAs (miRNAs) que afectan a la progresión del MM (Kuehl & Bergsagel, 2012; Morgan *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2017).

3. Interacción de las células de MM con el microambiente de la médula ósea

El microambiente de la MO proporciona un soporte para la supervivencia y expansión de las células de MM, y para la evasión inmune, contribuyendo por tanto a la progresión de la enfermedad (Hideshima *et al.*, 2007; Kumar *et al*., 2017). Las primeras células de MM que llegan a la MO compiten con las células plasmáticas normales para su localización en la MO (García-Ortiz *et al*., 2021). Las células de MM educan a las células de dicho microambiente mediante contacto directo o mediante la liberación de factores solubles, exosomas y microRNAs (Hideshima *et al.*, 2007; Kumar *et al*., 2017; García-Ortiz *et al*., 2021). Estas

células plasmáticas malignas interaccionan con la IL-6, VEGF o factores de la familia TNF secretados por células estromales u otras células de MM de manera autocrina o paracrina. Al igual que las células plasmáticas normales, las células de MM requieren la unión de APRIL y BAFF a su receptor BCMA, que promueve la supervivencia, proliferación, migración y resistencia a fármacos por medio de la activación de las vías PI3K/Akt, MAPK, JAK/STAT, NF-kB o Notch (Hideshima *et al*., 2007; Kumar *et al*., 2017; García-Ortiz *et al*., 2021).

Las células de MM expresan CD138, un receptor de sindecanos mediante el cual se unen al colágeno de la ECM y se adhieren a las células estromales de la MO (Ghobrial, 2012; Kumar *et al*., 2017). Asimismo, la integrina α4β1 media la adhesión de las células de MM a sus ligandos expresados por las células estromales de la MO, como VCAM-1 y FN (Sanz-Rodríguez *et al.,* 1999; Ghobrial, 2012). La adhesión mediada por α4β1 proporciona a las células de MM la capacidad de migrar hacia y dentro de la MO, y es requerida para la adhesión de las células de MM a la microvasculatura de la MO (Martínez-Moreno *et al*., 2016). Asimismo, las células de MM expresan CXCR4, lo que les permite migrar a los nichos de la MO en respuesta a la quimioquina CXCL12 producida por las células estromales (Hideshima *et al*., 2007; Kumar *et al*., 2017; García-Ortiz *et al*., 2021). La unión del CXCR4 con CXCL12 incrementa la activación de α4β1 y la adhesión de las células de MM mediada por esta integrina (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2001; Alsayed *et al.*, 2007; Azab *et al*., 2009). Ensayos *in vivo* han demostrado la importancia de la adhesión de células de MM dependiente de α4β1 para el progreso de la enfermedad, ya que el bloqueo de la subunidad α4 inhibe el desarrollo de esta neoplasia (Mori *et al.,* 2004; Olson *et al*., 2005). Además, la adhesión mediada por integrinas a la ECM induce la activación de las vías MAP quinasas y PI3K/Akt (Hideshima *et al*., 2007; Ivaska & Heino, 2011; Cooper & Giancotti, 2019) (**Figura 14**).

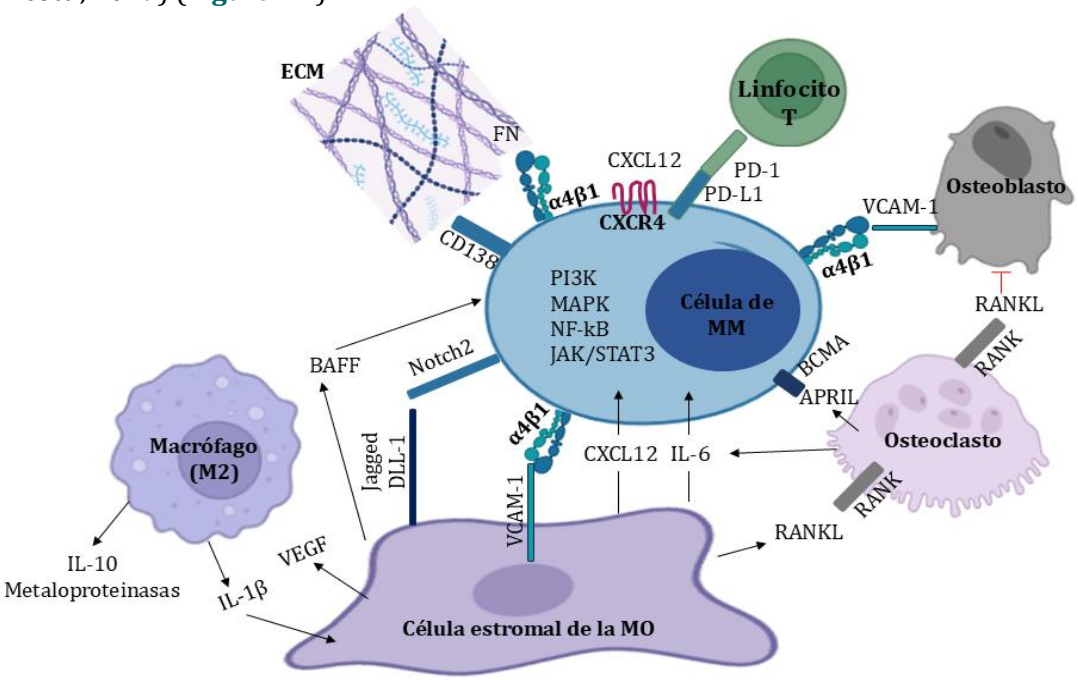


Figura 14. Microambiente de la MO en MM. Las células de MM interaccionan con células estromales, macrófagos, linfocitos T y regulan la remodelación ósea mediante la interacción con los osteoclastos y osteoblastos. Se indican los receptores presentes en las células de MM, el intercambio de citoquinas y las vías de señalización implicadas (Adaptada de Kumar *et al.,* 2017).

La adhesión de las células de MM mediada por α4β1 a VCAM-1 expresado por los progenitores de osteoblastos inhibe la formación de los osteoblastos (Giuliani *et al*., 2006; Hideshima *et al*., 2007; García-Ortiz *et al*., 2021). A su vez, la adhesión dependiente de esta integrina a VCAM-1 induce la liberación de RANKL por las células estromales. RANKL estimula la activación de los osteoclastos a la vez que bloquea la diferenciación de los osteoblastos (Hideshima *et al*., 2007; Kumar *et al*., 2017). Los osteoclastos producen a su vez el factor APRIL, que actúa como un bucle de retroalimentación positivo sobre las células de

MM (Kumar *et al*., 2017; García-Ortiz *et al*., 2021). Asimismo, la adhesión de células de MM dependiente de α4β1 induce la liberación de IL-6 por las células estromales, citoquina clave para la supervivencia de las células plasmáticas malignas (Lokhorst *et al*., 1994) (**Figura 14**).

Adicionalmente, la adhesión de las células de MM mediada por α4β1 les confiere resistencia a fármacos, una respuesta conocida como CAM-DR (*Cell adhesion-mediated drug resistance*) (Damiano *et al.*, 1999; Noborio-Hatano *et al.,* 2009; Sevilla-Movilla *et al.*, 2020). Así, el inhibidor de CXCR4, AMD3100, interrumpe la interacción de las células de MM con el estroma de la MO al disminuir la activación de α4β1, y aumenta la sensibilidad de estas células al fármaco bortezomib, un inhibidor del proteasoma (Richardson, 2004; Alsayed *et al.*, 2007; Azab *et al*., 2009). Adicionalmente, el bortezomib revierte la respuesta a CAM-DR reduciendo la expresión de α4β1 en las células de MM (Noborio-Hatano *et al.,* 2009). Los tratamientos más empleados contra el MM son la dexametasona, los fármacos inmunomoduladores como la talidomida y la lenalidomida, y los fármacos inhibidores del proteasoma (Kumar & Anderson, 2016; Rajkumar, 2022). En los últimos años se han desarrollado inmunoterapias que tratan de potenciar el sistema inmune frente a las células de MM, entre las que se incluyen el tratamiento con células CAR-T dirigidas a receptores como CD138 o BCMA expresados en las células de MM (Kumar & Anderson, 2016; Rajkumar, 2022). También se están utilizando *checkpoint inhibitors* frente a PD-1 o PD-L1 para restaurar la actividad de los linfocitos T (Kumar & Anderson, 2016; Kwon *et al.*, 2020; Tamura *et al.*, 2020; Desantis *et al.*, 2022), así como anticuerpos monoclonales frente a antígenos específicos del MM como daratumumab o el isatuximab, dirigidos a CD38 (Kumar & Anderson, 2016; Rajkumar, 2022), o belantamab frente a BCMA (Rajkumar, 2022).

4. MicroRNAs: Estructura y función

Los miRNAs son RNAs endógenos de pequeño tamaño (18-25 nucleótidos) y de una sola cadena que forman parte del genoma no codificante (Lujambio & Lowe, 2012; Lin & Gregory, 2015; Bartel, 2018). Los miRNAs pueden ser secretados en fluidos biológicos unidos a proteínas, o bien pueden liberarse empaquetados en microvesículas como los exosomas para evitar su degradación, por lo que pueden emplearse como marcadores de diagnóstico en diferentes patologías, incluido el MM (Bartel, 2018; Pourhanifeh *et al*., 2019). Los miRNAs pueden ser intergénicos, localizados en loci independientes de DNA no codificantes, o bien intragénicos o intrónicos, si sus genes se localizan en regiones intrónicas de genes codificantes para proteínas (Lin & Gregory, 2015; Bartel, 2018; Treiber *et al.*, 2019). Algunos miRNAs forman clústers y son regulados de manera policistrónica por un promotor común (Treiber *et al.*, 2019). La transcripción de los miRNAs intergénicos es realizada por la RNA polimerasa II, que genera un transcrito primario denominado pri-miRNA de doble cadena (Kim *et al.*, 2009; Krol *et al.*, 2010; Treiber *et al.*, 2019). Este transcrito es posteriormente procesado por la enzima DROSHA, que genera un precursor con estructura en forma de horquilla denominado pre-miRNA. El pre-miRNA es exportado del núcleo al citoplasma por medio de la Exportina-5 y el cofactor RAN-GTP (Yi *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009; Krol *et al.*, 2010; Treiber *et al.*, 2019). En el citosol, la enzima Dicer, una RNA polimerasa III, escinde el bucle de la estructura en horquilla, formando un dúplex miR-3p/miR-5p maduro. Las cadenas se separan posteriormente mediante una helicasa. Una de las cadenas es degradada mientras que la otra se une a un conjunto de proteínas Argonautas (Ago), formando el complejo de silenciamiento denominado miRISC (Kim *et al.*, 2009; Krol *et al.*, 2010; Treiber *et al*., 2019). En el caso de los miRNAs intrónicos el proceso es idéntico, pero los intrones son eliminados por DROSHA o por un proceso de escisión alternativa (Kim *et al.*, 2009; Lujambio & Lowe, 2012; Bartel, 2018; Treiber *et al.*, 2019). El complejo miRISC regula la expresión de genes a nivel postranscripcional, uniéndose al extremo 3'UTR de los mRNAs (Lujambio & Lowe, 2012; Lin & Gregory, 2015; Bartel, 2018; Treiber *et al*., 2019). Los miRNAs emplean su región "*seed*", situada en los primeros 2-8 nucleótidos del extremo 5' del miRNA, para emparejarse con la región 3'UTR del mRNA (Pasquinelli, 2012; Bartel, 2018; Treiber *et al*., 2019). Si este emparejamiento es perfecto, se produce la degradación del mRNA, pero si el

emparejamiento es imperfecto, se inhibe su traducción. Si la traducción ha comenzado, se elimina el ribosoma y se proteoliza la proteína (Pasquinelli, 2012) (**Figura 15**).

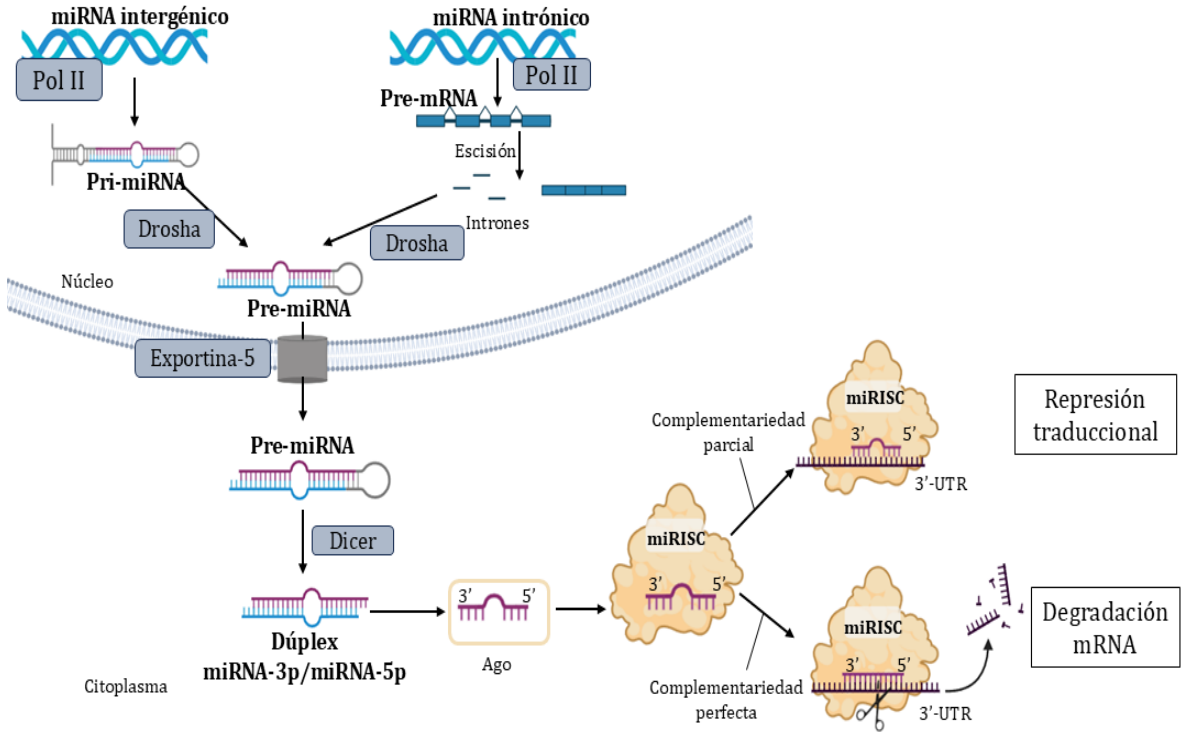


Figura 15. Formación de miRNAs y mecanismo de acción. Esquema de la formación de los miRNAs, las enzimas implicadas y su mecanismo de acción dependiendo de la complementariedad perfecta o parcial con el mRNA diana. Los miRNAs, mediante represión traduccional o escisión del mRNA, regulan la expresión de proteínas oncogénicas o supresoras tumorales (Bartel, 2018; Treiber *et al*., 2019).

Los miRNAs regulan procesos como la proliferación, diferenciación, metabolismo y muerte celular (Dimopoulos *et al*., 2013; Bartel, 2018). Asimismo, desempeñan papeles importantes en la aparición, desarrollo y progresión del cáncer (Pencheva & Tavazoie, 2013; Lin & Gregory, 2015), ya que suelen localizarse en regiones inestables de los cromosomas y son susceptibles a modificaciones epigenéticas que permiten su expresión en tumores como el MM (Handa *et al*., 2019; Pourhanifeh *et al*., 2019). Los miRNAs desempeñan funciones como oncogenes o como supresores tumorales. Los miRNAs con actividad oncogénica, denominados oncomiRs, inhiben a supresores tumorales, y son sobreexpresados en células cancerígenas. Por otro lado, la actividad de los miRNAs supresores tumorales (TS-miRs) consiste en la inhibición de protooncogenes, por lo que normalmente su expresión se encuentra reducida en células tumorales (Lin & Gregory, 2015; Svoronos *et al*., 2016).

4.1. Papel de los microRNAs en mieloma múltiple

La progresión del MM se asocia con la desregulación de miRNAs desde células plasmáticas sanas hasta las células de MM, variando su expresión según el estadío del MM (Dimopoulos *et al*., 2013; Ahmad *et al*., 2014; Rossi *et al*., 2015; Handa *et al*., 2019).

Algunos miRNAs, como el miR-21, incrementan su expresión en células de MM en comparación con las células plasmáticas sanas (Ahmad *et al*., 2014; Rossi *et al*., 2015; Handa *et al*., 2019; Pourhanifeh *et al*., 2019). Su expresión aumenta por la señalización IL-6/STAT3 tras adhesión de las células de MM con el estroma de la MO. El miR-21 favorece la supervivencia de las células de MM activando la vía Akt mediante la represión de PTEN, y contribuye al aumento de expresión de RANKL en el microambiente tumoral (Rossi *et al*., 2015; Federico *et al*., 2019). Otros miRNAs que actúan como oncomiRs en MM son el miR-181, miR-32 o el clúster miR-17-92 (Dimopoulos *et al*., 2013; Ahmad *et al*., 2014; Handa *et al*.,

2019; Pourhanifeh *et al*., 2019). Asimismo, miR-221/222 y miR-181 incrementan sus niveles en MM refractario, suprimiendo la expresión de proteínas inhibidoras del ciclo celular como PTEN, p27 o p21, y disminuyendo la sensibilidad de células de MM a diversos tratamientos (Rossi *et al*., 2015; Handa *et al.*, 2019).

Por otra parte, existen miRNAs cuya expresión se reduce en células de MM, como miR-29, el cual actúa como supresor tumoral dado que su diana es el gen antiapoptótico *MCL-1,* por lo que miR-29 inhibe normalmente la proliferación celular (Dimopoulos *et al*., 2013; Rossi *et al.,* 2015). Asimismo, miR-29 potencia los efectos antitumorales de los inhibidores del proteasoma, aumentando la apoptosis (Rossi *et al.,* 2015). Las células de MM muestran asimismo una baja expresión de miR-let-7e, miR-15 o miR-16 (Handa *et al.*, 2019). Los niveles de miR-15 como miR-16 son bajos en pacientes con MM refractario en comparación con individuos sanos (Rossi *et al.,* 2015). Sus dianas son *Bcl2* o *VEGF*, y por tanto, suprimen normalmente la proliferación y angiogénesis (Roccaro *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2013), actuando como supresores tumorales (Dimopoulos *et al*., 2013; Rossi *et al.,* 2015; Pourhanifeh *et al*., 2019). Se ha documentado que miR-34 es metilado en MM e inducido por p53, actuando como supresor tumoral, ya que regula dianas como *Myc, Bcl2 o Notch1,* e induce apoptosis en modelos *in vivo* e *in vitro* (Dimopoulos *et al*., 2013; Rossi *et al.,* 2015; Handa *et al.*, 2019; Pourhanifeh *et al.*, 2019).

Asimismo, se ha asociado la expresión de algunos miRNAs con la resistencia a fármacos. Por ejemplo, miR-222 o miR-451 se relacionan con la resistencia a dexametasona y agentes alquilantes, mientras que miR-21 o miR-125 proporcionan resistencia a bortezomib. Por el contrario, otros miRNAs como miR-155, miR-324-5p, miR-497 y miR-520 aumentan la sensibilidad de células de MM a bortezomib y disminuyen su resistencia (Handa *et al.*, 2019; Allegra *et al.*, 2021).

OBJETIVOS

ICAP-1 interacciona con la subunidad β de las integrinas β1, y regula la adhesión celular. ICAP-1 presenta asimismo un dominio de localización nuclear que le permite su translocación al núcleo. La integrina α4β1 se expresa en linfocitos y contribuye al tráfico linfocitario hacia lugares de inflamación, así como a la localización de estas células en diferentes órganos linfoides durante su diferenciación y maduración. En estudios previos del grupo del Dr. Joaquín Teixidó se inició la caracterización del papel de ICAP-1 en el desarrollo linfoide, utilizando ratones deficientes en ICAP-1. La presente Tesis Doctoral ha continuado estos estudios, centrándose en los siguientes objetivos:

1. Papel de ICAP-1 en el desarrollo de los timocitos.
2. Papel de ICAP-1 en la maduración y función de linfocitos de órganos linfoides secundarios.

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia que se caracteriza por la acumulación de células plasmáticas malignas en la médula ósea (MO). La integrina α4β1 regula la localización y el tráfico de las células de MM mediante su interacción con ligandos expresados en el microambiente de la MO. Dicha interacción juega un papel importante en la progresión de la enfermedad. Los microRNAs (miRNAs) controlan la progresión tumoral, actuando como activadores o supresores en diferentes etapas del proceso tumoral. La potencial regulación de la expresión de miRNAs dependiente de la adhesión mediada por α4β1 en células de MM no ha sido estudiada. Por tanto, el siguiente objetivo ha sido:

3. Regulación de la expresión de miRNAs en la adhesión dependiente de la integrina α4β1 en células de mieloma múltiple.

El primer objetivo de esta Tesis Doctoral ha contado con la colaboración esencial de las Dras. María Luisa Toribio y Patricia Fuentes (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC, Madrid), y de los Dres-as Agustín Zapata, Javier García-Ceca y Sara Montero Herradón (Universidad Complutense de Madrid).

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y muestras de pacientes

En este trabajo se ha utilizado la línea celular humana de leucemia aguda T Jurkat, así como las líneas celulares humanas de mieloma múltiple (MM) MM.1S (adquiridas en la *American Type Culture Collection*), NCI-H929 y U266 (estas dos últimas cedidas por la Dra. Giovanna Roncador, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO, Madrid). Las líneas NCI-H929 y U266 fueron autentificadas por análisis de sus repeticiones cortas en tándem en el CNIO. Todas las líneas celulares se testaron para evitar contaminaciones de micoplasma cada dos meses.

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio completo, compuesto por RPMI-1640 (Gibco, Paisley, Reino Unido) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Lonza, Basilea, Suiza), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 U/mL) y glutamina 2 mM (Gibco). Además, las células NCI-H929 se cultivaron en presencia de β-mercaptoetanol (0.05 mM) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO). Las células se mantuvieron a 37°C, 95% de humedad y 5% CO_2.

El RNA de muestras de células $CD138^+$ de médula ósea (MO) de pacientes con MM a diagnóstico se empleó para el estudio de microRNAs. Como controles se emplearon muestras $CD138^+$ de MO de donantes sanos. Todas las muestras fueron obtenidas bajo consentimiento informado, y siguiendo las pautas establecidas por el Comité de Ética del Hospital 12 de Octubre (Madrid), (colaboración con los Dres. Joaquín Martínez López y Antonio Valeri).

Reactivos y anticuerpos

El fragmento recombinante de la fibronectina (FN-H89), que contiene la región CS-1 (CS-1/FN) y que carece del sitio central de unión RGD, con capacidad de unión a la integrina α4β1, fue purificado según se indica en García-Bernal *et al.,* 2005.

En las siguientes tablas se indican los anticuerpos y reactivos empleados en citometría de flujo (**Tabla 1**), en *Western blotting* (**Tabla 2**), y en ensayos de inmunofluorescencia (**Tabla 3**).

Tabla 1. Anticuerpos conjugados, primarios y secundarios empleados en citometría de flujo. Se indica el clon, procedencia del reactivo y dilución preparada en solución de FACS, de los anticuerpos ordenados por fluorocromo.

Anticuerpo (Clon) o Reactivo	Procedencia	Dilución
BV421 *rat anti-mouse* CD44 (IM7)	BioLegend (San Diego, CA)	1:200
BV421 *rat anti-mouse* CD8a (53-6.7)	BioLegend	1:200
eFluor 450 *rat anti-mouse/human* CD1d (1B1)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)	1:100
eFluor 450 *rat anti-mouse* CD86 (B7-2) (GL-1)	Thermo Fisher Scientific	1:200
FITC-Anexina V	Immunostep (Salamanca)	1:200
FITC *rat anti-mouse* CD19 (ID3)	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ)	1:100
FITC *rat anti-mouse* CD21/CD35 (7G6)	BD Biosciences	1:100
FITC *rat anti-mouse* CD4 (GK1.5)	Thermo Fisher Scientific	1:100
FITC *rat anti-mouse* CD40 (3/23)	BD Biosciences	1:50
FITC *mouse anti-mouse* CD45.2 (104)	BioLegend	1:200
FITC *armenian hamster anti-mouse* CD69 (H1.2F3)	BioLegend	1:100
FITC *rat anti-mouse* CD93 (AA4.1)	Thermo Fisher Scientific	1:200
FITC *hamster anti-mouse* TCRαβ (H57-597)	Immunotools (Friesoythe, Alemania)	1:200
PE *rat anti-mouse* CD19 (ID3)	BioLegend	1:200

PE *rat anti-mouse* CD23 (B3B4)	BD Biosciences	1:100
PE *rat anti-mouse* CD8a (53-6.7)	Thermo Fisher Scientific	1:50
PE *rat anti-mouse* CD86 (GL-1)	BioLegend	1:100
PE *rat anti-mouse* IgM (II/41)	Thermo Fisher Scientific	1:100
PE *rat anti-mouse* Ly-51 (6C3)	BioLegend	1:100
Alexa Fluor 647 *rat anti-mouse* CD268 (BAFFR) (7H22-E16)	BioLegend	1:200
Alexa Fluor 647 *armenian hamster anti-mouse* $CD3_{\varepsilon}$ (145-2C11)	BioLegend	1:100
Alexa Fluor 647 *rat anti-mouse* CD4 (GK1.5)	BioLegend	1:200
APC *rat anti-mouse* CCR7 (4B12)	BioLegend	1:200
APC *rat anti-mouse* CD18 (M18/2)	Miltenyi (Rhineland, Alemania)	1:20
APC *rat anti-mouse* CD184 (CXCR4) (L276F12)	BioLegend	1:200
APC *rat anti-mouse* CD185 (CXCR5) (L138D7)	BioLegend	1:250
APC *rat anti-mouse* CD19 (1D3)	Thermo Fisher Scientific	1:200
APC *armenian hamster anti-mouse/rat* CD29 (HMβ1-1)	BioLegend	1:200
APC mouse anti-mouse CD45.1 (A20)	BioLegend	1:100
APC *rat anti-mouse* CD49 (R1-2)	BioLegend	1:200
APC *rat anti-mouse* CD5 (53-7.3)	BioLegend	1:200
APC *rat anti-mouse* CD69 (H1.2F3)	Thermo Fisher Scientific	1:100
APC *rat anti-mouse* IgD (11-26c)	Thermo Fisher Scientific	1:200
APC *rat anti-mouse* $S1P_1$/EDG-1 (T4H28)	R&D Systems (Minneapolis, MN)	1:100
PE/Cy7 *rat anti-mouse* CD3 (17A2)	BD Biosciences	1:100
PE/Cy7 *Hamster anti-mouse* CD69 (H1.2F3)	Thermo Fisher Scientific	1:100
PE/Cy7 *rat anti-mouse* IgM (II/41)	Thermo Fisher Scientific	1:100
PerCP-Cy5.5 *rat anti-mouse* CD197 (CCR7) (4B12)	Thermo Fisher Scientific	1:200
Alexa Fluor 700 *rat anti-mouse* CD19 (eBio1D3)	Thermo Fisher Scientific	1:200
Alexa Fluor 700 *rat anti-mouse* IgD (11-26c)	Thermo Fisher Scientific	1:100
Biotin *rat anti-mouse* CD4 (GK1.5)	Southern Biotech (Birmingham, AL)	1:100
Biotin *rat anti-mouse/human* CD45R/B220 (RA3-6B2)	BioLegend	1:500
Biotin *anti-mouse* CD62L (MEL-14)	BD Biosciences	1:200
Biotin *anti-mouse* H2Kb (AF6-88.5)	BioLegend	1:200
Biotin-UEA-1	Vector Laboratories (Newark, CA)	1:200
Purified anti-human α4 (ALC1/63)	Dr. Angel Corbí (CIB-MS, Madrid, España)	1:100
Purified mouse anti-mouse/human APA1/1	Dr. Balbino Alarcón (CBMSO, Madrid, España)	1:50
Purified rat anti-mouse CD16/CD32 (2.4G2)	BD Biosciences	1:100
Purified rabbit anti-mouse NOTCH2 (D76A6)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)	1:800
Alexa Fluor 488 *anti-mouse* (A-11001)	Invitrogen (Waltham, MA)	1:100

Alexa Fluor 546-*Streptavidin*	Invitrogen	1:100
Alexa Fluor 647 *goat anti-rabbit* (A-21244)	Molecular Probes (Eugene, OR)	1:100
Alexa Fluor 647-*Streptavidin*	Invitrogen	1:100
APC-*Streptavidin*	BioLegend	1:200
APC/Cy7- *Streptavidin*	BioLegend	1:200
Cell Trace™ Violet Proliferation Kit	Invitrogen	1:5000
Ghost Dye™ Red 780	Tonbo Biosciences (San Diego, CA)	1:300

Tabla 2. Anticuerpos empleados en *Western blotting*. Se indica el clon, procedencia y la dilución del anticuerpo preparada en solución de bloqueo.

Anticuerpo (Clon)	Procedencia	Dilución
Anti-*human/mouse* Akt (pan, C67E7)	Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-*human/mouse* β-Actina (C4)	Santa Cruz Technology (Dallas, TX)	1:1000
Anti-*human/mouse* c-Myc (policlonal)	Genetex (Irvine, CA)	1:1000
Anti-*human/mouse* c-Src (AF3389)	R&D Systems	1:2000
Anti-*human/mouse* ERK1/2 (p44/42 MAPK, L34F12)	Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-*human/mouse* fosfo-Akt (Ser473, D9E)	Cell Signaling Technology	1:2000
Anti-*human/mouse* fosfo-ERK1/2 (p44/42 MAPK, Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-*human* fosfo-Src (Y416) (D49G4)	Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-*human* GFP	Roche (Basilea, Suiza)	1:5000
Anti-*mouse* ICAP-1 (Ab33)	Dr. Daniel Bouvard (*Centre de Recherche en Biologie Cellulaire de Montpellier,* Montpellier, Francia)	1:2000
Anti-*human/mouse* ICAP-1 (B-2)	Santa Cruz Technology	1:1000
Anti-*human/mouse* Runx3 (CBFA3)	R&D Systems	1:1000
Anti-*human/mouse* SAM68 (7-1)	Santa Cruz Biotechnology	1:200
Anti-*human/mouse* Vinculina (7F9)	Millipore (Burlington, MA)	1:1000

Tabla 3. Anticuerpos conjugados, primarios y secundarios empleados en ensayos de inmunofluorescencia. Se indica el clon, procedencia y dilución del anticuerpo preparada en la solución de bloqueo o permeabilización correspondiente.

Anticuerpo (Clon)	Procedencia	Dilución
Alexa Fluor 488 *rat anti-mouse* CD4 (RM4-5)	BD Biosciences	1:50
Alexa Fluor 488 *rat anti-mouse* IgD (11-26c)	BioLegend	1:200
Alexa Fluor 647 *goat anti-mouse* IgM (A-21238)	Invitrogen	1:200
Biotin *rat anti-mouse* CD8 (53-6.7)	Thermo Fisher Scientific	1:50
Biotin *rat anti-mouse Metallophilic Macrophages* (MOMA-1) (ab51814)	Abcam (Cambridge, UK)	1:200
Purified rat anti-mouse CD19 (6OMP31)	Thermo Fisher Scientific	1:100
Purified rabbit anti-mouse/human Ki67 (monoclonal)	Abcam	1:100
Purified rabbit anti-mouse/human LaminB1 (policlonal)	Abcam	1:100
Alexa Fluor 488 *anti-rat* (A-11006)	Invitrogen	1:200

Alexa Fluor 488 *goat anti-rabbit* (A-11008)	Invitrogen	1:200
Alexa Fluor 568-*Streptavidin* (S-11226)	Invitrogen	1:200
Alexa Fluor 647 *goat anti-rabbit* (A-21244)	Invitrogen	1:200

Ratones

Los ratones se mantuvieron en condiciones asépticas libres de patógenos, con agua y alimento *ad libitum*, y fotoperiodos 12/12, en el Animalario del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB-MS). Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo los protocolos aprobados por el Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Los ratones heterocigotos ICAP-$1^{+/-}$ fueron cedidos por el Dr. Daniel Bouvard (*Centre de Recherche en Biologie Cellulaire de Montpellier,* Montpellier, Francia). Esta línea de ratones presenta una interrupción del alelo del gen de ICAP-1 mediante la inserción por recombinación homóloga del gen LacZ en los exones 2 y 3 (Bouvard *et al.,* 2007). Los ratones heterocigotos en fondo C57BL/6 fueron cruzados entre sí para la obtención de ratones ICAP-$1^{+/+}$ (*wildtype*) e ICAP-$1^{-/-}$ (*knock-out*). El genotipado de la descendencia se realizó a partir del DNA genómico extraído del tejido epitelial de fragmentos de la oreja, obtenidos tras marcaje de la camada en el momento del destete. El genotipado se realizó mediante una PCR convencional (**Tabla 4**), empleando los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 5**. Los resultados del genotipado por PCR se corroboraron mediante la comprobación de los rasgos fenotípicos del ratón (Bouvard *et al.,* 2007), y a partir de ensayos de *Western blotting* utilizando anticuerpos frente a la proteína ICAP-1.

Tabla 4. Ciclos de PCR para el genotipado de los ratones ICAP-1.

	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Pre-amplificación	95	3 min	1
Amplificación	94	30 s	10
	62	30 s	
	72	30 s	
	95	30 s	35
	52	30 s	
	72	30 s	
Melting	72	5 min	1
Cooling	20	1 h	1

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para el genotipado de los ratones ICAP-1.

	Secuencia (5'→3')
ICAP-1 *Forward*	CTGCCTCTGTCTTTCGAGTGC
ICAP-1 *Reverse*	ACCCTGGCCTCTTACCTTGC
LacZ *Reverse*	CATTCAGGCTGCGCAACTGTT

Machos y hembras fueron usados indistintamente para los experimentos. Los timos y bazos se obtuvieron a partir de ratones de 3-10 semanas de edad. Los linfocitos de nódulos linfáticos (LNs) se extrajeron a partir de los LNs inguinales, axilares y cervicales de ratones de 8-10 semanas. Las células de médula ósea (MO) se obtuvieron a partir de los dos fémures y las dos tibias de ratones de 8-10 semanas, exceptuando los experimentos de quimeras,

donde se emplearon ratones de 6-8 semanas. Para los ensayos de proliferación, ciclo celular y estimulación se usaron ratones de 8-12 semanas. La sangre periférica se obtuvo por punción de la vena mandibular, con una aguja de calibre 25G, o por punción cardiaca, con una aguja del calibre 23G, utilizando PBS+EDTA 12.5 mM. Las muestras de timos, bazos, LNs, y MO se disgregaron en filtros de nailon de 40 µm (LifeSciences, Falcon, NY) hasta obtener una suspensión en PBS o en medio RPMI-1640, tras lo cual, se lisaron los eritrocitos durante 5 min a temperatura ambiente (RT) con ACK *buffer* (NH_4Cl 170 mM, $KHCO_3$ 12 mM y EDTA 0.5 M).

Para la preparación y posterior análisis de células epiteliales tímicas (TEC), colaboramos con los Dres. Sara Montero, Javier García-Ceca y Agustín Zapata, de la Universidad Complutense de Madrid. Los lóbulos tímicos de ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ fueron disgregados con tijeras, y los timocitos se eliminaron mediante pipeteo con medio RPMI-1640 utilizando una pipeta de vidrio de gran calibre. Seguidamente, los fragmentos tímicos fueron incubados durante 15 min a 37ºC con 1 U/mL de Liberase TM y 0.1 mg/mL de DNAse I (Roche, Basilea, Suiza) para su disgregación, tras lo cual se eliminaron de nuevo los timocitos mediante pipeteo. Este proceso fue repetido dos veces. La suspensión celular obtenida fue lavada y resuspendida en medio RPMI-1640 con FBS 2% y EDTA 10 mM. Seguidamente, las células fueron teñidas durante 15 min a 4ºC con los anticuerpos anti-Ly51-PE y anti-UEA1-Biotina en PBS con FBS 1% (**Tabla 1**). Posteriormente, las células fueron lavadas e incubadas durante 15 min a 4ºC con APC-Estreptavidina en PBS/FBS 1%, y resuspendidas finalmente en el mismo medio para su análisis en el citómetro de flujo.

Los ratones CD45.1 B6.SJL utilizados en los experimentos de quimeras fueron cedidos por el Dr. Andrés Hidalgo (Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas, Madrid), y mantenidos en el Animalario del CIB-MS. Los ratones CD45.1 de 8 semanas fueron letalmente irradiados con dos dosis de 600 rad, 100 kV y ventana fina, durante 10-11.5 min, con un intervalo de diferencia de 3 horas entre ambas dosis, para conseguir la depleción de la MO. Tras 24 horas, los ratones irradiados recibieron $2{\cdot}10^6$ células de MO extraídas de los dos fémures y las dos tibias de ratones donantes CD45.2/ICAP-$1^{+/+}$ o CD45.2/ICAP-$1^{-/-}$, de 6-8 semanas. Estas células fueron inyectadas vía intravenosa en la vena de la cola. En otros experimentos, los ratones CD45.2/ICAP-$1^{+/+}$ o CD45.2/ICAP-$1^{-/-}$ fueron irradiados y reconstituidos a partir de células de MO de los ratones donantes CD45.1. En todos los casos, se analizó la reconstitución de la MO a partir de la sangre periférica de los ratones irradiados, tras 6-7 semanas de la irradiación. Después de la lisis de los eritrocitos mediante el *buffer* ACK, las células se marcaron durante 30 min a 4ºC con anticuerpos anti-CD45.1 y anti-CD45.2 (**Tabla 1**). Cuando la reconstitución resultó ≥ 90%, los ratones huéspedes fueron sacrificados para la extracción de sus timos, bazos y LNs. Las suspensiones celulares de estos órganos se marcaron con los anticuerpos anti-CD3-PeCy7, anti-CD4-FITC y anti-CD8-PE para muestras de timo, bazo y LNs, o anti-CD19-AF700, anti-CD21-FITC y anti-CD23-PE en muestras de bazo (**Tabla 1**) para su posterior análisis por citometría de flujo.

Citometría de flujo

Para los ensayos *standard* se emplearon 300.000 células por tubo o pocillo, mientras que para los ensayos del análisis de poblaciones transicionales de bazo se usaron $1\text{-}2{\cdot}10^6$ células. En los casos requeridos, las células se incubaron inicialmente en FACS *buffer* (PBS, FBS 1%, azida sódica 0.06%) a 4ºC durante 10 min con un anticuerpo bloqueante de receptores Fc CD16/CD32 (**Tabla 1**). Para la exclusión de células muertas, las células se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron a una concentración de $1\text{-}10{\cdot}10^6$/mL, y se incubaron a 4°C durante 30 min con *Ghost Dye™ Red 780* (Tonbo Biosciences; 1 µL). Posteriormente, las células fueron lavadas con FACS *buffer*, e incubadas durante 30 minutos a 4ºC con los correspondientes anticuerpos conjugados a fluorocromos o biotina, o con anticuerpos primarios preparados en FACS *buffer*. En el caso de las células marcadas con anti-CCR7, éstas se incubaron durante 30 min a 37°C. A continuación, las células fueron lavadas y resuspendidas en FACS *buffer*. En el caso de las células marcadas con anticuerpos primarios o conjugados con biotina, éstas fueron de nuevo incubadas durante otros 30 min a

4ºC con anticuerpos secundarios o streptavidina unida a fluorocromos. Las inmunoglobulinas IgG2b, k de rata e IgG de hámster armenio, conjugadas a fluorocromos o biotina, se utilizaron como controles de isotipo.

Todos los anticuerpos y reactivos de viabilidad empleados se presentan en la **Tabla 1**. Se utilizaron los citómetros de flujo FC500 o Cytoflex-S (Beckman Coulter, Brea, CA). Los datos obtenidos del citómetro fueron analizados mediante el *software* FlowJo v.10.8.1. Para ayudar a visualizar los datos multidimensionales de las células transicionales de bazo obtenidos por citometría de flujo, se utilizó el algoritmo de reducción t-SNE (*t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*) incluido en el *software* FlowJo v.10.8.1, que fue aplicado sobre las muestras concatenadas. En el análisis t-SNE se incluyeron los canales de citometría necesarios para la distinción de las poblaciones transicionales de bazo una vez compensados. Se aplicó la configuración de aprendizaje automático, con un valor de iteración de 1000, *perplexity* 30 y algoritmo de gradiente Barnes-Hut. Posteriormente, representamos gráficamente los resultados realizando un *overlay* de los clústers obtenidos de las diferentes poblaciones. Este análisis crea un "mapa" de puntos de datos agrupados, que representa células con fenotipo similar, definido por su perfil de citometría (Belkina *et al.,* 2019).

Purificación de linfocitos mediante selección negativa y *cell sorting*

Las células SP $CD8^+$ y $CD4^+$ de timo fueron purificadas mediante selección negativa utilizando los kits *MagCellet Mouse* $CD8^+$ *T-Cell Isolation Kit* o *MagCellet Mouse* $CD4^+$ *T-Cell Isolation Kit* (R&D Systems), respectivamente. Las células T $CD3^+$ totales de bazo fueron purificadas mediante selección negativa utilizando el kit *MojoSort™ Mouse CD3 T Cell Isolation Kit* (BioLegend). Las células B $CD19^+$ de bazo fueron asimismo purificadas por selección negativa mediante el kit *MagCellet Mouse-B Cell Isolation Kit* (R&D Systems), o mediante el kit *MojoSort™ Mouse Pan B Cell Isolation Kit* II (BioLegend). En la selección negativa mediante el *kit MojoSort™*, las células totales ($1\text{-}2\cdot10^8$) fueron resuspendidas en *buffer* de purificación (PBS pH 7.2, BSA 0.5%, EDTA 2 mM). Tras incubar las células durante 15 min a 4ºC con biotina-*Pan T cells* o biotina-*Pan B cells* (1 µL/10^6 células), se añadieron *beads* magnéticas unidas a estreptavidina (1 µL/10^6 células). Tras incubar 15 min a 4ºC, las células fueron separadas mediante un soporte magnético *MagCellet™ Magnet* (R&D Systems). Las células de interés quedan en suspensión, mientras que el resto de células permanecen unidas al imán. Cuando fue requerido, estas purificaciones se realizaron en condiciones de esterilidad.

Para el proceso de selección positiva mediante *cell sorting*, las muestras se prepararon en *buffer* de *sorter* (PBS, EDTA 1 mM, HEPES pH 7.4 25 mM, FBS 5%) en condiciones de esterilidad, a una concentración de $25\cdot10^6$/mL (timocitos) o de $30\cdot10^6$/mL (esplenocitos). Posteriormente, las células fueron marcadas durante 30 min a 4ºC con los anticuerpos correspondientes en *buffer* de *sorter* (**Tabla 1**). Para el *cell sorting* de células SP $CD4^+$ y DP $CD4^+CD8^+$ de timo, se emplearon los anticuerpos FITC-*anti-mouse* CD4 y PE-*anti-mouse* CD8. Para la selección positiva de células FOB y MZB de bazo se emplearon los anticuerpos FITC *rat anti-mouse* CD21 y PE *rat anti-mouse* CD23. Posteriormente, las células fueron lavadas y resuspendidas en *buffer* de *sorter*. Las muestras fueron filtradas con membranas de 30 µm (CellTrics™) previamente a su lectura en el citómetro. El proceso de separación y selección (*cell sorting*) se realizó a 4°C en el equipo FACSAria Fusion (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ), en condiciones de esterilidad. Las células separadas se recogieron en tubos con 2 mL de FBS, mezclando por inversión para anular las interacciones electrostáticas de las células con las paredes del tubo, tras lo cual, se centrifugaron a 500 g durante 10-15 min. El *pellet* celular se lisó con los *buffers* correspondientes para la obtención de RNA o proteína. La pureza de las suspensiones celulares tras su purificación mediante selección positiva o negativa, se comprobó por citometría de flujo (>90%).

Western blotting

Tras centrifugación, las células fueron lisadas durante 30 min a 4°C en la solución GST-FISH (Nonidet P-40 1%, Tris-HCl pH 7.4 50 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 2 mM, glicerol 10%) suplementada con inhibidores de proteasas 10% (*Complete Mini*; Roche), e inhibidores de fosfatasas 10% (*phosSTOP*; Roche). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 15 min a 4°C para la obtención del sobrenadante proteico, el cual fue cuantificado mediante el método de Bradford (*Protein Assay*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) midiendo su absorbancia a 595 nm. Las muestras (50 µg) fueron hervidas a 100°C durante 5 min en *buffer* de carga (SDS 10%, glicerol 50%, β-mercaptoetanol 100 mM, Tris-HCl pH 6.8 100 mM, azul de bromofenol 0.05%). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), y posteriormente transferidas a membranas de PVDF (Bio-Rad Laboratories). Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente (RT) en solución de bloqueo (TBS, BSA 3%, Tween-20 0.1%), tras lo cual se incubaron durante 16 horas a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 2**), preparados en solución de bloqueo. Seguidamente, las membranas recibieron tres lavados de 5 min con TBS-T (Tween-20 0.1% en TBS), y se incubaron durante una hora a RT con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa de rábano (HRP; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Finalmente, tras tres lavados de 5 min con TBS-T, las bandas proteicas se revelaron con el sustrato quimioluminiscente *Immobilon Western* (Millipore), utilizando el detector de quimioluminiscencia *Quemidoc Imaging System* (Bio-Rad Laboratories). Cuando fue necesario volver a incubar las mismas membranas con anticuerpos primarios distintos, las membranas se lavaron tres veces durante 30 min a RT con la solución de *stripping* (Glicina 1%, SDS 1%, Nonidet P-40 0.05%, pH 2.2) para liberar los anticuerpos unidos. A continuación, tras lavar las membranas con TBS-T, se repitió el procedimiento anteriormente descrito. Las bandas se cuantificaron mediante densitometría usando el programa ImageJ. La expresión de las proteínas de interés fue referida respecto a la expresión de los controles de carga vinculina o β-actina, mientras que las proteínas fosforiladas fueron normalizadas respecto a la expresión de la proteína total.

Fraccionamiento celular

Los linfocitos $CD19^+$ ($20{\cdot}10^6$) o células Jurkat ($10{\cdot}10^6$) fueron centrifugados durante 5 min a 1500 rpm. El *pellet* se resuspendió e incubó durante 5 min a 4ºC en 300 µL de una solución de lisis (HEPES pH 8 10 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, sacarosa 34 mM, glicerol 10%, DTT 1 mM, Tritón X-100 0.1%, suplementada con inhibidores de proteasas 10%). Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 5 min a 4°C para la obtención del sobrenadante, que corresponde a la fracción citoplasmática. El *pellet* resultante se lavó con otros 300 µL de solución de lisis, tras lo cual se incubó durante 15 min a 4ºC en 150 µL de solución GST-FISH. Posteriormente, las muestras se sometieron a tres etapas de sonicación, y tras centrifugar a 3500 rpm a 4°C durante 15 min, se obtuvo el sobrenadante, que corresponde a la fracción nuclear. Las fracciones citosólicas y nucleares se cuantificaron por Bradford, y se utilizaron en ensayos de *Western blotting*. El anticuerpo anti-vinculina fue empleado como control de carga de la fracción citoplasmática, mientras que para la fracción nuclear se emplearon anticuerpos anti-SAM68 o anti-c-Myc (**Tabla 2**).

Proliferación celular *in vitro*

Linfocitos $CD3^+$ y $CD19^+$ purificados de bazos mediante selección negativa y en condiciones de esterilidad fueron resuspendidos ($5\text{-}10{\cdot}10^6$/mL) en PBS e incubados a 37ºC con *Cell Trace™ Violet Proliferation Kit* (CTV; Invitrogen), (5 µM, 5 min, para los linfocitos $CD3^+$; 1 µM, 10 min, para los linfocitos $CD19^+$). La reacción se detuvo con un volumen de medio RPMI-1640, y se realizó un lavado adicional con el mismo medio, centrifugando a 1500 rpm durante 5 min. Las células $CD3^+$ fueron resuspendidas en medio de proliferación de células T (RPMI-1640, FBS 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 400 µM (L-alanina, L-asparagina, L-prolina, L-ácido aspártico,

L-ácido glutámico) y β-mercaptoetanol 0.05 mM). Por otro lado, las células $CD19^+$ fueron resuspendidas en medio de proliferación de células B, que consiste en el medio de proliferación de células T con la adición de piruvato sódico 1 mM y HEPES pH 7.4 10 mM. Seguidamente, se repartieron 200.000 células $CD3^+$ en los pocillos de una placa de fondo plano (Costar 3596; Corning Incorporated, Kennebunk, ME) previamente tapizada durante 16 horas a 4ºC en ausencia o con los anticuerpos *Ultra-LEAF™ Purified hamster anti-mouse* CD3ε (clon 145-2C11; BioLegend) y *Purified hamster anti-mouse* CD28 (clon 37.51, BioLegend), a una concentración final de 4 µg/mL. Las placas de células $CD3^+$ se incubaron durante 72 horas a 37°C. Por otro lado, se repartieron 300.000 células $CD19^+$ a los pocillos de las placas Costar (fondo plano), las cuales fueron incubadas en ausencia o en presencia de estímulos preparados en medio de proliferación de células B, y añadidos en suspensión. Dichos estímulos fueron: *goat anti-mouse* IgM (αIgM; Jackson ImmunoResearch, 20 µg/mL) junto con IL-4 recombinante murina (Peprotech, Cranbury, NJ; 20 ng/mL); hámster *anti-mouse* CD40 (αCD40; clon HM40-3, BioLegend, 5 µg/mL) junto con IL-4 (20 ng/mL); o lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (O111:B4, Sigma Aldrich; 2.5 µg/mL). La placa de células $CD19^+$ fue incubada durante 96 horas a 37°C. Se reservó una alícuota de las células $CD3^+$ y $CD19^+$ marcadas con CTV para determinar la señal máxima del CTV a tiempo 0. Transcurridos los tiempos de incubación, se pudo apreciar la formación de blastos celulares, que fueron fotografiados mediante un microscopio óptico Leica DFC3000 G (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). El número de blastos formados por campo de imagen, así como el área (μm^2) de los blastos fue calculado usando el *software* Fiji ImageJ (Rasband, USA, 2017). Posteriormente, las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD21 o anti-CD23 (**Tabla 1**), y fueron analizadas por citometría de flujo. Para cuantificar la proliferación celular, se calculó el índice de proliferación mediante el *software* FlowJo v10.8.1, que consiste en la relación entre el número total de divisiones celulares y el número de células que entran en división al menos una vez.

Análisis de ciclo celular

Las células $CD3^+$ y $CD19^+$ purificadas tal y como se ha descrito más arriba, se resuspendieron en sus respectivos medios de proliferación previamente mencionados. Los linfocitos $CD3^+$ o $CD19^+$ (300.000/pocillo) fueron incubados durante 72 o 96 horas, respectivamente, en placas Costar de fondo plano, en ausencia o en presencia de diferentes estímulos. Al igual que en la proliferación celular, los estímulos para las células $CD3^+$ fueron los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (4 µg/mL) previamente inmovilizados en las placas durante 16 horas a 4ºC. Para la estimulación de los linfocitos $CD19^+$ se utilizó el anticuerpo *anti-mouse* IgM (20 µg/mL) junto con IL-4 (20 ng/mL) preparados en medio de proliferación de células B y añadidos en suspensión. Para la obtención de perfiles del ciclo celular, un mínimo de 900.000 células fueron fijadas durante 10 min a 4ºC con etanol 70%. Seguidamente, las células fueron lavadas con PBS+BSA 2%, y se incubaron durante 15 min a RT en 500 µL de solución de yoduro de propidio (IP/RNASE Solution; Immunostep, Salamanca). Los perfiles del ciclo celular y el porcentaje de células en cada fase del ciclo se obtuvieron siguiendo el modelo de Watson mediante el programa FlowJo versión 10.8.1.

Estimulación celular *in vitro*

Las células $CD3^+$ y $CD19^+$ fueron purificadas de bazos en condiciones de esterilidad mediante selección negativa, y resuspendidas en sus respectivos medios de proliferación previamente descritos. Los linfocitos $CD3^+$ o $CD19^+$ (300.000/pocillo) fueron incubados en placas Costar (fondo plano) en ausencia o en presencia de estímulos durante 24 horas a 37°C. Los estímulos para las células $CD3^+$ fueron los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (4 µg/mL) previamente inmovilizados en la placa durante 16 horas a 4ºC. En el caso de los linfocitos $CD19^+$, los estímulos fueron *anti-mouse* IgM (20 µg/mL), *anti-mouse* CD40 (5 µg/mL), o bien LPS (2.5 µg/mL) añadidos en suspensión. Transcurridas 24 horas de incubación, las células fueron marcadas con los anticuerpos anti-CD3-PeCy7, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE y anti-CD69-APC para las células $CD3^+$. Para las células B se emplearon los anticuerpos anti-CD19-

APC o anti-CD19-AF700, anti-CD21-FITC y anti-CD23-PE o anti-IgM-PE y anti-IgD-APC y anticuerpos frente a CD86 y/o CD69 (**Tabla 1**). Finalmente, las células fueron analizadas por citometría de flujo.

Para analizar la activación de ERK1/2 y PI3K/Akt, tras la purificación de linfocitos $CD3^+$ y $CD19^+$, éstos ($3\text{-}4\cdot10^6$/condición) fueron resuspendidos en 200 µL de medio RPMI-1640 con FBS 10% en ausencia (control) o en presencia de diferentes estímulos. En el caso de los linfocitos T $CD3^+$, el estímulo consistió en la combinación de los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (5 µg/mL), mientras que para los linfocitos B $CD19^+$, el estímulo fue el anticuerpo *anti-mouse* IgM (10 µg/mL). Las células fueron incubadas a 37ºC durante diferentes tiempos, tras lo cual las células control y estimuladas fueron directamente lisadas durante 30 min a 4ºC en agitación con 200 µL de *buffer* de lisis 2x (Nonidet P-40 1%, NaCl 280 mM, Tris-HCl pH 7.4 40 mM, inhibidores de proteasas 20%, e inhibidores de fosfatasas 20%). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm 5 min a 4°C para la obtención del sobrenadante proteico, y finalmente analizadas mediante *Western blotting* con anticuerpos frente a fosfo-ERK1/2, ERK1/2, fosfo-Akt y Akt (**Tabla 2**).

Detección de la activación de CD3ε mediante el anticuerpo APA1/1

Los linfocitos $CD3^+$ purificados mediante selección negativa fueron distribuidos por triplicado y por condición en placas de 96 pocillos de fondo en U (300.000 células/pocillo). Las células fueron incubadas durante 6 min a 37°C, en ausencia o en presencia de *anti-mouse* CD3 (10 µg/mL), o de la combinación *anti-mouse* CD3 y *anti-mouse* CD28 (7,5 µg/mL), preparados en medio RPMI-1640. La incubación fue detenida mediante fijación de las células con formaldehído 2% durante 20 min a 4ºC. Seguidamente, las células fueron lavadas con *buffer* de permeabilización (PBS, BSA 1%, saponina 0.01%), y posteriormente incubadas durante 30 min a 4ºC con el anticuerpo purificado *anti-mouse/human* APA1/1 (anti-CD3ε; 10 µg/mL; **Tabla 1**) preparado en *buffer* de permeabilización. El anticuerpo APA1/1 reconoce un epítopo intracelular de la cadena CD3ε que queda expuesto tras estimulación del TCR (Risueño *et al.*, 2005). A continuación, las células fueron lavadas con *buffer* de permeabilización e incubadas durante 15 min a 4ºC con un anticuerpo secundario *anti-mouse* Alexa Fluor 488 (**Tabla 1**). Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en PBS para su análisis por citometría de flujo.

Ensayos de detección de Notch2 intracelular

Los linfocitos $CD19^+$ purificados ($1\cdot10^6$) fueron fijados con formaldehído 2% durante 20 min a 4ºC. Tras un lavado, se incubaron durante 30 min a 4ºC con los anticuerpos correspondientes para la detección de las poblaciones transicionales (T1, T2 y pre-MZB), y las poblaciones maduras FOB y MZB (**Tabla 1**). A continuación, las células fueron lavadas y permeabilizadas con *buffer* de permeabilización (PBS, BSA 1%, saponina 0.01%). Tras lavarlas, las células fueron marcadas durante 30 min a 4ºC con el anticuerpo purificado *rabbit anti-mouse* Notch2 (clon D76A6, Cell Signaling), preparado en *buffer* de permeabilización. Posteriormente, las células se lavaron con *buffer* de permeabilización y se incubaron durante 15 min a 4ºC con el anticuerpo secundario *goat anti-rabbit* Alexa Fluor 647, resuspendiéndose finalmente en PBS para su análisis por citometría de flujo.

Análisis de la proliferación celular *in situ* mediante detección de Ki67 por inmunofluorescencia

Los bazos de ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ fueron embebidos en la resina Tissue-Plus® O.C.T.™ (Scigen, Gateway West, Singapur), congelados a -80ºC y procesados con un criotomo en el Servicio de Histología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid) para la obtención de cortes del tejido de 10 µm de grosor. Las secciones de bazo se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante diferentes tiempos a RT (**Tabla 6**). Posteriormente, tras tres lavados con PBS, las muestras fueron permeabilizadas a RT a diferentes tiempos (**Tabla 6**) con una solución de bloqueo (PBS, BSA 5%, *normal goat serum*

(NGS) 5% (Novex, Invitrogen) y Tritón-X-100 (**Tabla 6**)). Para la detección de la proliferación *in situ* empleamos un anticuerpo frente a Ki67, un marcador de células en proceso de proliferación cuya expresión incrementa a medida que las células progresan desde las fases G1 a G2 del ciclo celular. Para ello, los cortes fueron incubados durante distintos tiempos a RT (**Tabla 6**) y en cámara húmeda con los anticuerpos purificados primarios, anticuerpos conjugados y anticuerpos biotinilados (anti-Ki67, anti-CD4-AF488, anti-CD8-Biotina o anti-MOMA-Biotina, y anti-CD19), preparados en solución de bloqueo. A continuación, los tejidos fueron lavados cuatro veces durante 5 min con Tritón-X-100 0.1% en PBS, tras lo cual se incubaron durante 1 hora a RT con los anticuerpos secundarios o estreptavidina conjugada a fluorocromos (Estreptavidina-AF568, anti-*rat* Alexa Fluor 488, anti-*rabbit* Alexa Fluor 647) preparados en solución de bloqueo. Todos estos anticuerpos quedan recogidos en la **Tabla 3**. Finalmente, las muestras fueron lavadas cuatro veces con Tritón-X-100 0.1% en PBS, realizándose un lavado extra de 5 min con PBS. Los tejidos fueron incubados con DAPI (Miltenyi; 0.1 µg/mL) durante 10 min a RT en cámara húmeda, y seguidamente se lavaron dos veces durante 5 min con PBS. Los cubreobjetos se colocaron con medio de montaje Fluoromont-G (Thermo Fisher Scientific), y posteriormente, las imágenes de proliferación fueron adquiridas en un microscopio confocal láser Leica TCS-SP5 con objetivos de 20x y objetivos de inmersión de 40x o 63x aumentos, obteniéndose imágenes de 1 µm de grosor en el eje Z. El contaje de células positivas para Ki67 y del número total de células, así como la intensidad de fluorescencia del Ki67, se calculó mediante el *software* Fiji ImageJ (Rasband, USA, 2017), a partir de 3-7 campos de imagen por ratón.

Tabla 6. Condiciones de inmunofluorescencia para la detección de la proliferación *in situ*.

Condiciones	Células T	Células B
Tiempo de fijación	15 min	40 min
Tiempo de permeabilización	30 min	1 h
Tritón-X-100 (solución de bloqueo)	0.3%	0.5%
Incubación con anticuerpos 1^{arios}	1 hora	2 horas

Ensayos de β-Galactosidasa

Secciones de 10 µm de espesor de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron lavadas con PBS, y posteriormente, fijadas durante 10 min a RT con glutaraldehído 0.2% en PBS. Seguidamente, las muestras fueron lavadas tres veces durante 1 min con una solución de $MgCl_2$ 1 mM en PBS pH 6 (PBS/$MgCl_2$). A continuación, las muestras se incubaron a 37ºC durante 24-48 horas con la solución de tinción de x-Gal (PBS/$MgCl_2$, N-N-Dimetilformamida 1 mg/mL, Ferricianuro de potasio $K_3Fe(CN)_6$ 100 mM, Potasio hexacianoferrato(II) trihidrato $K_4Fe(CN)_6*3H_2O$ 100 mM). Tras dos lavados con PBS, las muestras se marcaron durante 10 min a RT con DAPI (Miltenyi; 0.3 µg/mL). Los cortes ya fijados se emplearon para la tinción con anticuerpos anti-*mouse* LaminB1 (**Tabla 3**), siguiendo el protocolo de inmunofluorescencia para células B previamente descrito. Para la obtención de las imágenes se empleó el microscopio THUNDER Imager 3D Tissue (Leica) con objetivos de inmersión de 40x y 63x aumentos, y se analizaron las imágenes mediante el *software* Fiji ImageJ (Rasband, USA, 2017) a partir de 2-5 campos de imagen por ratón.

Detección de la apoptosis *in situ* mediante la técnica TUNEL

Secciones de 10 µm de espesor de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron fijadas como se indica en el método de proliferación *in situ*, e incubadas durante 2 horas a RT en cámara húmeda con los anticuerpos primarios purificados, anticuerpos conjugados o biotinilados (anti-CD4-AF488, anti-CD8-Biotina o anti-CD19, anti-MOMA-Biotina), preparados en solución de bloqueo. Posteriormente, las muestras fueron lavadas tres veces durante 5 min con PBS, y a continuación permeabilizadas durante 15-30 min a 37°C con Tritón-X-100 0.2% en PBS (**Tabla 7**). Los cortes se lavaron tres veces durante 5 min con PBS

o Tritón-X-100 0.1% en PBS (**Tabla 7**), y seguidamente, se realizó el marcaje de TUNEL mediante los reactivos del *kit One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit* (Elabscience; Houston, TX). La técnica de TUNEL (*TdT dependent dUTP–biotin nick end labeling staining*) se basa en el empleo de la enzima terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT) que cataliza la adición de dUTPs-Alexa Fluor 647 a los extremos 3'OH del DNA fragmentado por la acción de las caspasas durante la apoptosis. Las muestras fueron incubadas durante 30 min a 37°C con *TdT Equilibration Buffer* (Elabscience), y a continuación durante 2 horas a 37°C con *Labeling Working Solution* (*TdT Equilibration Buffer*, Alexa Fluor-647-dUTPs, enzima TdT), según indicaciones del fabricante. Posteriormente, los tejidos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 1 hora a RT con los anticuerpos secundarios o estreptavidina conjugada a fluorocromos (Estreptavidina-AF568, anti-*rat* Alexa Fluor 488), preparados en solución de bloqueo. Finalizada la incubación, los cortes se lavaron con PBS, y se marcaron durante 5 min a RT con DAPI (Elabscience; 1 µg/mL). Finalmente, los cortes fueron lavados cuatro veces con PBS y montados con Fluoromont-G. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal láser Leica TCS-SP5 con objetivos de inmersión de 40x o 63x aumentos, adquiriendo imágenes de 1 µm de grosor en el eje Z. El contaje de células apoptóticas y del número de células totales se calculó mediante el *software* Fiji ImageJ (Rasband, USA, 2017).

Tabla 7. Condiciones de inmunofluorescencia para ensayos TUNEL.

Condiciones	Células T	Células B
Tiempo de permeabilización	30 min	15 min
Lavados tras permeabilizar	PBS	PBS+Tritón-X-100 0.1%

Ensayos de apoptosis *in vitro*

Los esplenocitos de ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ fueron incubados durante diferentes tiempos en medio RPMI-1640, en ausencia o en presencia de FBS 10%. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS frío y resuspendidas en 300 µL de *buffer* de unión a Anexina V (HEPES pH 7.4 10 mM, NaCl 140 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM), e incubadas a 4°C durante 30 min con los anticuerpos anti-CD19-APC o anti-CD3-PeCy7 (**Tabla 1**). A continuación, las células fueron lavadas con PBS e incubadas de nuevo durante 10 minutos a RT con Anexina V-FITC y DAPI (Miltenyi; 0.1 µg/mL) preparados en *buffer* de unión a Anexina V. Finalmente, las células fueron lavadas, analizándose las poblaciones T y B apoptóticas tardías por citometría de flujo.

Ensayos de quimiotaxis

Las células $CD19^+$ de bazos de ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ purificadas mediante selección negativa, fueron sometidas a un proceso de *starving* durante 1 hora en medio de migración (RPMI-1640, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL, HEPES pH 7.4 10 mM, BSA libre de ácidos grasos 0.2%). Seguidamente, las células ($3{\cdot}10^5$ células/pocillo) fueron depositadas por duplicado en la parte superior de cámaras *Transwell* (filtros de policarbonato de 5 µm de poro, Costar). Los pocillos inferiores de las cámaras fueron rellenados con 600 µL de medio de migración, en ausencia o presencia de la quimioquina CXCL13 (*Recombinant mouse* CXCL13 *carrier free,* Biolegend; 400 ng/mL), incubándose las células durante 3 horas a 37ºC. La quimiotaxis se analizó mediante citometría de flujo, juntando dos pocillos por condición (600.000 células), utilizando anticuerpos específicos para la detección de células $CD19^+$, FOB y MZB. El porcentaje de migración se calculó a partir de la relación entre el número de eventos de células FOB y MZB tras migración, y el número de células FOB y MZB iniciales, el cual fue obtenido de las células de la parte superior del *Transwell* previo a su migración.

$$\%\ \textbf{Migración} = \frac{\textbf{Eventos MZB o FOB tras migración}}{\textbf{células iniciales}} \textbf{x100}$$

$$\textbf{Células iniciales} = \textbf{600.000 x}\ \%\ \textbf{FOB o MZB del total}$$

Inmunización T-independiente y ELISA

Grupos de 5 ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 50 µg de TNP-Ficoll (Biosearch Technologies; Hoddesdon, UK) en un volumen final de 200 µL de PBS. Para comparar la presencia en el suero de anticuerpos antes y después de la inmunización, se tomaron muestras de sangre periférica (SP) el día previo a la inmunización (preinmune), y durante los días 7, 14 y 21 tras la inmunización. Ésto fue llevado a cabo mediante punción de la vena mandibular con una aguja de calibre 25G, sin exceder el 7.5% del volumen de sangre circulante. Las muestras de SP se dejaron reposar durante 2 horas a 4ºC sin heparina para la formación del coágulo, y tras centrifugar a 12000 rpm durante 5 min, se obtuvo el sobrenadante que corresponde al suero inmune. Posteriormente, para calcular los niveles de IgG e IgM, se analizaron las muestras de suero obtenidas mediante ensayos de ELISA.

Para ello, las placas de 96 pocillos Maxisorp NUNC (Thermo Fisher Scientific) fueron tapizadas *overnight* a 4°C por triplicado y condición con 100 µL de TNP-BSA 1 µg/mL (Biosearch Technologies). Posteriormente, los pocillos fueron lavados tres veces con 200 µL de *washing buffer* (PBS, Tween-20 0.01%) y bloqueados durante 1 hora a RT con *buffer* de bloqueo (PBS, BSA 2%, Tween-20 0.02%). Seguidamente, los pocillos fueron lavados con *washing buffer*, añadiéndose las muestras de suero diluidas (1:200) en *buffer* de bloqueo para los pocillos IgM e IgG. Tras lavarse con *washing buffer*, los pocillos se incubaron durante 1 hora a RT en agitación con anticuerpos *Biotin goat anti-mouse* IgM o IgG (ambos de Southern Biotech; 1:1000) preparados en *buffer* de bloqueo. Seguidamente, tras otros tres lavados, los pocillos se incubaron durante 30 min a RT en agitación en presencia de Estreptavidina-fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich; 1:5000) preparada en *buffer* de bloqueo. Finalmente, tras tres lavados, se añadieron 100 µL del sustrato colorimétrico *p-Nitrophenyl Phosphate* (Sigma-Aldrich), incubándose durante 45 min, tras lo cual se cuantificaron las absorbancias a 405 nm en el lector de placas *Varioskan Flash Multimode Reader* (Thermo Fisher Scientific). Tras restar a estas absorbancias la señal basal de la placa, se realizó la media de los tres pocillos por cada condición y se calculó la media de absorbancias de cada grupo de ratones por condición. La media de absorbancias post-inmunización de diferentes días y del suero preinmune fue comparada entre sí, así como la media de absorbancia de los ratones ICAP-$1^{-/-}$ con la media de los ratones ICAP-$1^{+/+}$ para cada día de inmunización, tanto para IgG como IgM.

Ensayos de adhesión celular a FN-H89

Las placas de 96 pocillos *high binding* (Costar) fueron tapizadas durante 17 horas a 4ºC con el fragmento recombinante de la fibronectina FN-H89 (CS-1/FN; 5 µg/mL), preparado en solución de *coating* ($NaHCO_3$ pH 8.8 0.1 M). Posteriormente, las placas fueron incubadas durante 1.5 horas a 37°C, y a continuación se añadió la solución de bloqueo (BSA 0.25% en $NaHCO_3$ pH 8.8 0.1 M), incubándose durante 40 min a 37°C. Durante este tiempo, las células de MM ($1 \cdot 10^6$/mL) permanecieron en *starving* en medio RPMI-1640 sin FBS. Tras el bloqueo de la placas con BSA, las células se repartieron en los pocillos (10^5 células), incubándose a 37°C durante 18 horas. En los ensayos de adhesión en presencia de inhibidores, las células se incubaron durante el *starving* con triciribina (inhibidor de pAkt), SCH772984 (inhibidor de pERK1/2) o saracatinib (inhibidor de pSrc), todos ellos obtenidos de Selleckchem (Munich, Alemania), y permanecieron en presencia de estos inhibidores durante las 18 horas de adhesión. Transcurrida la adhesión, se procedió a la lisis de las células de los pocillos para la extracción de RNA y proteína, o bien, a la tinción de las células con cristal violeta para la cuantificación de la adhesión. Para ello, las células se lavaron 3 veces con PBS, se fijaron durante 10 min a RT con PFA 4%, y tras un lavado, se tiñeron durante 1 hora a RT con cristal violeta 0.5% en PBS. Posteriormente, las células fueron lavadas con agua destilada y se eluyó el cristal violeta durante 2 horas a RT en agitación con ácido acético al 15%. A continuación, cuantificamos la absorbancia del cristal violeta a 590 nm en el lector de placas *Varioskan Flash Multimode Reader* (Thermo Fisher Scientific), con la

cual calculamos el número de células adheridas teniendo en cuenta el número de células iniciales y el tamaño del pocillo. Los resultados de adhesión de las células a FN-H89 se representan en relación con las células control unidas inespecíficamente a BSA.

Extracción de RNA para ensayos de RT-qPCR

Las líneas celulares, las células $CD8^+$ y los esplenocitos totales fueron lisados con el reactivo TRIzol TriReagent (MRC, Cincinnati, OH). El RNA de las muestras fue aislado mediante la adición de cloroformo y seguidamente precipitado con la adición de isopropanol y de etanol. Posteriormente, el RNA se resuspendió en *RNAse-free water* y se cuantificó mediante su absorbancia a 260 nm (A_{260}) en el espectrofotómetro Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). El cDNA se obtuvo por retrotranscripción a partir de 2 µg de RNA, empleando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI), hexámeros aleatorios de desoxirribonucleótidos (Thermo Fisher Scientific) y dNTPs (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante de la enzima. La retrotranscripción se llevó a cabo con un ciclo de 5 min a 70ºC, seguido de una incubación a 37ºC durante 1 hora y un ciclo final de 15 min a 70ºC.

Las células FOB y MZB purificadas por *cell sorting*, se lisaron en 350 µL de *buffer* RLT (Qiagen, Hilden, Alemania) suplementado con β-mercaptoetanol (10%), y el RNA se extrajo siguiendo los pasos del protocolo de *RNeasy Plus Micro Kit* (Qiagen), empleando las columnas de DNA genómico contenidas en el *kit*. La concentración de RNA fue cuantificada mediante el espectrofotómetro Nanodrop. Posteriormente, la retrotranscripción del RNA obtenido se realizó mediante el *kit Superscript III First-Stranded Synthesis Supermix for RT-qPCR* (Thermo Fisher Scientific), empleando ≤ 1µg RNA y *RT Reaction Mix* (enzima Superscript RT III, *RNAse OUT*, oligo-desoxinucleótidos 2.5 µM, hexámeros aleatorios 2.5 ng/µL, dNTPs y $MgCl_2$ 10 mM), siguiendo las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción se llevó a cabo con un ciclo de 10 min a 25ºC, seguido de otro ciclo de 30 min a 50ºC, y un ciclo final de 5 min a 85ºC. Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante 20 min a 37ºC con 2 U de RNAse H.

La amplificación del cDNA se realizó por triplicado mediante qPCR en el termociclador LightCycler 480 (Roche), siguiendo los pasos indicados en el protocolo de la **Tabla 8**. Para ello, se emplearon 1-2.5 µL de la dilución de cDNA junto con 20 µM de oligonucleótidos específicos para cada transcrito a amplificar (**Tabla 9**), y el reactivo *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche), el cual, contiene la Taq DNA polimerasa FastStart y el fluoróforo SYBR Green I. Este fluoróforo se une a DNA de doble cadena, de forma que la señal de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR y, por tanto, de RNA inicial. El resultado es el número de ciclos de amplificación necesarios para alcanzar un valor umbral de fluorescencia "*threshold*" (Ct) establecido. El número de ciclos necesarios es inversamente proporcional a la cantidad inicial de DNA en la reacción. A partir del ciclo 35 de amplificación, se consideró ausencia de expresión.

Tabla 8. Programa de ciclos empleados durante el análisis de expresión de mRNAs por qPCR.

	Temperatura (ºC)	Tiempo	Ciclos
Pre-amplificación	95	5 min	1
Amplificación	95 (desnaturalización) 60 (anillamiento y extensión)	10 s 30 s	45
Melting	95 60 97	1 min 1 min Continuo	1
Cooling	4	-	-

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de qPCR. Se indican el gen diana y las secuencias *forward* y *reverse*. Todos los oligonucleótidos fueron obtenidos de *Integrated DNA Technologies* (Leuven, Bélgica).

Diana	Secuencia *Forward* (5'→3')	Secuencia *Reverse* (5'→3')
ms Blnk	AAAAGCCTGTACCCTTGCCA	GAGCAGTTCAGCCTCCTGG
ms Dtx1	CAATGGCAACAAGGATGGCA	GAGTGCGGGATGAGGTGAAA
ms Ebf1	GGTGGAAGTCACACTGTCGTAC	GTAACCTCTGGAAGCCGTAGTC
ms Egr1	TGAGCACCTGACCACAGAGTC	ATAACTCGTCTCCACCATCGC
ms Ets1	GCCGACTCTCACCATCATCA	TGCACATTCCATGTCCGGG
ms Gata3	GCTCCTTGCTACTCAGGTGAT	GGAGGGAGAGAGGAATCCGA
ms Gpr174	ACATGGTAGTGGTTTGAAAACGG	TGACAGCCACTCCAATGAGG
ms Hes1	AAAATTCCTCCTCCCCGGT	ATGATAGGCTTTGATGACTTTCTG
ms Icap-1	GCGTTCCCGTGACAGGTCTA	GTTTCCAGGACTGGGTGCAG
ms Id2	CCTGCATCACCAGAGACCTG	GGGAATTCAGATGCCTGCAA
ms Ikzf3	CCTCTGCCCACAGAGAGC	GGGCTTCTCTACTGTCCACG
ms Itgb7	GAGACCCCAAGAGAAGGGAGT	AGAACCAGCCCTAGTCCCAC
ms Klf2	ACCAACTGCGGCAAGACCTA	CATCCTTCCCAGTTGCAATGA
ms Myc	AGCCCGACTCCGACCTCTTG	GAGACACCGCCCACCACCAG
ms Mzb1	GACTTAGCAAGGGGCCAGAG	CGTCTTGGAGAGCCTATTGGG
ms Nedd9	GACTCTGCAGTGCCTCACTC	CCCTTGCCATAAGATTCTTGTACT
ms Notch2	CCACCTGCCTGGATAAGATCG	CTGCCCGTTGTTCACACAC
ms Pax5	CGGACAAAAGTACAGCAGCC	CACGGAGCCTGTAGACACTAT
ms Rgs13	CGGAGTGCCATAGAAGGTTAATG	ATCCAACAGATATGCCTGCTCA
ms Runx3d	GCGACATGGCTTCCAACAGC	CTTAGCGCGCCGCTGTTCTCGC
ms Swap70	CGGCAGATGAAGGAACTCCAAG	TCCGTGCTGAACCTGGTCTGTA
ms TBP	GGTATCTGCTGGCGGTTTGG	CCATGAAATAGTGATGCTGGGC
ms Tcf3	TTACCCCTCATTCCCCAGCA	CTTCTTCGGCTGAGTATCCAGG
ms Thpok	GACTTGGTGGGAGCTTAACCC	TCCCCATCTTCTCACTTCCTGG
ms Tnfrsf13c	CCCTGGTGGGTCTAGTGAGT	ACATTTTCCAGGGACTCTTGCT
ms Zfp36l1	CTTCACGACACACCAGATCCTAGT	TGCTGTAGTTGAGCATCTTGTTACC
hGAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCAATACGACCAAATCC
hIcap-1	ACCGTCATCGTAACACACCA	AAAACCTTGCAAATGGCTTG
hRunx3	CATGGCATCGAACAGCAT	GGGGAGGGAGGTGTGAAG
hSMO	CTCTAGGGCCTCAGTCTGGA	TGCATCTTTCAGAGGCTTTGT
hTBP	CGGCTGTTTAACTTCGCTTC	CACACGCCAAGAAACAGTGA

Para cada muestra se calculó el valor de ΔCt, que consiste en la diferencia de los valores de Ct de las muestras respecto al control negativo. Después, se obtuvo el valor de ΔΔCt, que consiste en la diferencia de los valores de ΔCt del gen de interés respecto al gen de referencia endógeno *TBP* (*TATA binding protein*) o *GAPDH*. El resultado se representó como expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), o *fold change* del gen de interés.

Secuenciación de RNA de células MZB de bazo

El RNA de las células MZB purificadas mediante *cell sorting* fue extraído con el *kit RNeasy Plus Micro Kit* (Qiagen), como se indica previamente. La calidad del RNA de las muestras fue testada inicialmente mediante el equipo Experion SS RNA (Bio-Rad Laboratories), llevado a cabo por el servicio de proteómica y genómica del CIB-MS. El RNA fue enviado a Novogene (Cambridge, Reino Unido) para la realización del RNAseq, donde la calidad de las muestras fue confirmada usando *Agilent 2100 BioAnalyzer*. El mRNA fue purificado a partir del RNA total usando *beads* magnéticas unidas a oligos poli-T. Tras la fragmentación del RNA, se realizó la síntesis de la doble cadena de cDNA usando *primers* de hexámeros aleatorios. Seguidamente, se llevó a cabo la reparación de los extremos de la cola A, ligación de adaptadores, selección de tamaño, amplificación y purificación, generando finalmente la librería mediante el *kit Novogene NGS RNA Library Prep Set (PT042).* La librería se verificó con Qubit 2.0, PCR en tiempo real para la cuantificación y un bioanalizador 2100 para la detección de la distribución de tamaños. Las librerías cuantificadas se agruparon codificadas por índices, siguiendo las instrucciones del fabricante, y posteriormente se secuenciaron en la plataforma Illumina Novaseq6000. La estrategia de secuenciación fue *Pair-end* 150bp (lecturas de 150 pb de extremo pareado; >40M lecturas/muestra).

Los datos de RNAseq fueron analizados por el Dr. Mario García Lacoba, del Servicio de Bioestadística y Bioinformática del CIB-MS. La versión CASAVA 1.8 fue empleada para el procesamiento de los datos en crudo, almacenados en formato Fastq, tanto para la conversión de formato como para la demultiplexación de los datos. El ensamblaje del genoma de referencia GRCm38 y sus archivos de anotación de modelos de genes se descargaron de la base de datos Ensembl. El índice del genoma de referencia se construyó utilizando Hisat2 v2.0.5. Seguidamente se filtraron las lecturas brutas, eliminando aquellas con contaminación de adaptadores, así como aquellas que contenían N >10% y las lecturas con >50% de nucleótidos de baja calidad con Qscore < 5. A continuación, las lecturas limpias de extremo pareado, fueron alineadas con el genoma de referencia utilizando Hisat2 v2.0.5. La predicción de nuevos transcritos se realizó ensamblando las lecturas mapeadas de cada muestra en un modo basado en referencias utilizando StringTie v1.3.3b, y los nuevos genes se anotaron con las bases de datos GO y KEGG. Se utilizó FeatureCounts v1.5.0-p3 para contar el número de lecturas asignadas a cada gen, y el nivel de expresión del transcrito se cuantificó en términos de valores FPKM. Tras cuantificar las expresiones génicas, se realizaron coeficientes de correlación de Pearson entre muestras y análisis de componentes principales, para evaluar las diferencias entre grupos y la duplicación de muestras intragrupo. El análisis de expresión diferencial entre los grupos ICAP-$1^{-/-}$ e ICAP-$1^{+/+}$ (dos réplicas biológicas por condición) se llevó a cabo utilizando el paquete *DESeq2* R v1.36.0 con el test de Wald. Los valores P resultantes se ajustaron mediante el procedimiento de Benjamini-Hochberg para controlar la FDR (*False Discovery Rate*; tasa de falsos descubrimientos). Los genes con un padj ≤0.05 y |log2(*FoldChange*)|≥ 1 se asignaron como expresados diferencialmente (DEG). Finalmente, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional ORA (*over-representation analysis*) de los DEG para determinar un enriquecimiento significativo (FDR≤0.05) en términos GO.

Transfección transitoria mediante electroporación

Las células Jurkat se electroporaron ($8 \cdot 10^6$ células/transfección) con el vector control pEGFP o con el vector pEGFP-ICAP-1 (cedido por el Dr. Daniel Bouvard, *Centre de Recherche en Biologie Cellulaire de Montpellier,* Montpellier, Francia). Para ello, las células fueron incubadas durante 10 min a 4ºC en 500 µL de medio RPMI-1640 con FBS 20%, junto con 45 µg de los plásmidos correspondientes. A continuación, las células fueron electroporadas a 960 µF, 260 V durante aproximadamente 20 ms con un *Gene Pulser Electroporator* (Bio-Rad) utilizando cubetas de electroporación de 0.4 cm (Bio-Rad). Tras dejar reposar las muestras durante 10 min a 4ºC, las células fueron incubadas durante 16 horas a 37ºC en medio RPMI-1640 suplementado con FBS 5%. A continuación, se verificó el nivel de expresión de GFP mediante citometría de flujo, y finalmente, las células fueron lisadas para la obtención de RNA y proteína.

Nucleofección de líneas celulares de MM

Las células NCI-H929 ($10 \cdot 10^6$ células) fueron resuspendidas en 100 µL de *buffer* de transfección incluido en el *Human Transfection kit* (Amaxa, Colonia, Alemania), junto con la cantidad correspondiente de RNA de silenciamiento (siRNA; 30 nM) o miRIDIAN *miRNA Hairpin inhibitor* (40 nM), por cada 10^6 células. Los siRNAs control (5'→3': AUUGUAUGCGAUCGCAGAC[dT][dT]) y siα4 (5'→3': CUGAAACGUGCAUGGUGGA[dT][dT]) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, mientras que el inhibidor miRIDIAN *miRNA Hairpin inhibitor* para miR-324-5p, y el miRIDIAN *miRNA Hairpin inhibitor negative control*, fueron obtenidos de Dharmacon (Lafayette, CO). Seguidamente, las células fueron transfectadas por nucleofección mediante el equipo *Amaxa Nucleofector II*, usando el programa de nucleofección T-01. A continuación, las células fueron incubadas durante 24 horas en medio RPMI-1640 con FBS 10%, y finalmente, las células fueron empleadas en experimentos de adhesión y RT-qPCR.

Ensayos de RT-qPCR de miRNAs

Las células NCI-H929 fueron lisadas con el reactivo QIAzol (Qiagen, Venlo, Países Bajos). El RNA fue extraído mediante el *kit miRNeasy Mini Kit* (Qiagen), que permite la extracción de RNA de pequeño tamaño. Posteriormente, se realizó la transcripción inversa a cDNA a partir de 12.5 ng de RNA, empleando oligonucleótidos específicos para la retrotranscripción de cada miRNA (*TaqMan MicroRNA Assay*, Applied Biosystems, Foster City, CA), y los reactivos de *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), siguiendo el protocolo del fabricante. La retrotranscripción se realizó con un ciclo de 30 min a 36ºC, seguido de un ciclo de 30 min a 42ºC y otro de 5 min a 85ºC, finalizando con una incubación de 5 min a 4ºC. El cDNA fue amplificado mediante qPCR a partir de 1 µL de muestra, empleando oligonucleótidos específicos para cada miRNA (*TaqMan MicroRNA Assay*; **Tabla 10**), y el reactivo *FastStart Essential DNA Probes Master* que contiene la Taq DNA polimerasa (Roche). Las sondas TaqMan se unen específicamente a secuencias complementarias localizadas entre los sitios de unión de los oligonucleótidos *forward* y *reverse* del gen diana. Las sondas están compuestas por un reportero fluorescente en el extremo 5' y un *quencher* no fluorescente en el extremo 3'. Durante la extensión del cDNA, la enzima Taq Polimerasa corta la sonda en el extremo 3' liberando el *quencher*, permitiendo la emisión de fluorescencia en el extremo 5', y por tanto, la señal fluorescente es directamente proporcional a la cantidad de cDNA amplificado y a la cantidad de RNA inicial en la muestra. La qPCR se realizó en el termociclador LightCycler 480, con un ciclo de pre-amplificación de 10 min a 95ºC, seguido de 40 ciclos de amplificación, alternando desnaturalización a 95ºC (15 s) con el anillamiento y extensión a 60ºC (60 s), y un paso final de enfriamiento a 4ºC.

Tabla 10. Secuencias de oligonucleótidos de miRNAs utilizados en la qPCR. Se indican el miRNA diana y las secuencias de los *primers* empleados. Los oligonucleótidos de miRNAs fueron obtenidos de *Taqman Applied Biosystems* (Thermo Fisher Scientific).

Diana	Secuencias (5'→3')
miR-324-5p	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU
miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA
RNU44	CCTGGATGATGATAGCAAATGCTGACTGA

El resultado se representó mediante la fórmula ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) o *fold change* del miRNA de interés respecto al gen de referencia endógeno, en este caso el RNA nucleolar pequeño *RNU44*. La expresión superior a 35 ciclos de amplificación fue considerada negativa.

Secuenciación de miRNAs y análisis de datos

El RNA de las células NCI-H929, MM.1S y U266, adheridas a FN-H89 y en suspensión (por duplicado; en total 12 muestras), fue extraído como hemos descrito previamente. La

secuenciación de los miRNAs fue llevada a cabo en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares de Madrid (CNIC), usando *Next Generation Sequencing* (NGS, Illumina HiSeq 2500, Illumina San Diego, CA). Los datos se analizaron con la ayuda de la Dra. Lola Alonso (CNIO, Madrid), siguiendo los pasos descritos (Rodríguez-García *et al*., 2023). Brevemente, para preparar los datos de secuenciación para su análisis, se eliminaron los adaptadores 3' de las lecturas de secuenciación usando *CutAdapt* versión 1.7.1. Los datos resultantes se analizaron empleando la base de datos *miRBase20* para mapear los miRNAs humanos maduros, usando Bowtie version 1, con parámetros específicos (-v 0 –tryhard -k 1 –best –norc), que incluyen el requerimiento de coincidencia de identidad de secuencia del 100% entre las lecturas de secuenciación, y las secuencias conocidas de miRNAs maduros. Además, solo se reportó un alineamiento por lectura para asegurar la precisión del mapeo. Los alineamientos se convirtieron a binario y fueron ordenados, indexados y contados utilizando *Samtools*. El análisis de expresión diferencial entre muestras fue llevado a cabo usando el paquete de R *DESeq2*. Para el análisis, los miRNAs que no mostraron expresión en ninguna muestra o estuviesen ausentes en al menos 4 de las muestras, fueron excluidos del estudio. Para análisis posteriores, se empleó un diseño multifactorial, donde se incluyó la línea celular como una variable, además de la comparación de la condición de interés "Suspensión" frente a "Adhesión", ya que existen diferencias entre las líneas celulares. Finalmente, los p valores fueron ajustados usando la corrección Benjamini-Hochberg. Los miRNAs expresados diferencialmente fueron identificados de acuerdo con el FDR (*False Discovery Rate*) con umbral ≤0.10, y se seleccionaron aquellos que tuviesen un $\log_2$FC absoluto superior a 0.5, y un contaje *baseMean* superior a 65.

Análisis estadístico

Los datos de los ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ fueron analizados mediante el test estadístico T de *Student*, considerando las poblaciones normales. Para tres o más condiciones, los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA), con el análisis de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Los valores atípicos fueron descartados mediante el test de Grubbs. Los resultados fueron considerados significativos cuando las diferencias mostraron un p valor menor que 0.05 ($p<0.05$). Los cambios no significativos se representaron como ns, mientras que las diferencias significativas se indicaron como ***$p<0.001$, **$p<0.01$ y *$p<0.05$. Las gráficas representan la media de la población junto con la desviación estándar (*Mean*±SD). Los resultados de senescencia muestran la media de la población y el error estándar de la media (*Mean*±SEM). Las gráficas y estadísticas se han realizado con el programa GraphPad Prism 8 (Boston, MA).

RESULTADOS

1. Papel de ICAP-1 en el desarrollo de órganos linfoides primarios.

1.1. La ausencia de ICAP-1 no afecta al desarrollo de células madre y progenitoras hematopoyéticas, ni a la linfopoyesis B

Icap-1 se expresa en células madre hematopoyéticas (HSC) y progenitoras (HPSC) (*Gene Expression Commons*, http://gexc.stanford.edu, GEO GSE77078) (Chen *et al.*, 2016). Nuestros resultados preliminares mostraron que la ausencia de ICAP-1 no afecta significativamente a la población de HSC (Tesis Doctoral, Silvia Sevilla Movilla, 2019; Sevilla-Movilla *et al.*, 2022). Asimismo, indicaron que no existen diferencias notables en los estadíos HSC/MPP1 (LSK $CD48^{-}CD150^{+}$), MPP2 (LSK $CD48^{+}CD150^{+}$) y MPP3 (LSK $CD48^{+}CD150^{-}$) de la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas entre los ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$. En conjunto, estos resultados indican que la ausencia de ICAP-1 no altera significativamente al compartimento de células HSC y progenitoras en ninguna de las etapas de su diferenciación (Sevilla-Movilla *et al.*, 2022).

La caracterización de la linfopoyesis B mostró que la frecuencia de la población de células $B220^{+}$ en la MO no está alterada en los ratones ICAP-$1^{-/-}$, y que las proporciones de las poblaciones pro-B, pre-B, inmaduras y maduras en la MO de estos ratones eran similares a las de sus controles (Tesis Doctoral, Silvia Sevilla Movilla, 2019; Sevilla-Movilla *et al.*, 2022). En experimentos de la presente Tesis demostramos que el número celular de estas poblaciones es similar en los ratones control y deficientes en ICAP-1 (**Figura 16**). Adicionalmente, no hemos observado alteraciones significativas en el porcentaje ni en el número de células de las poblaciones $CD19^{+}$ (**Figura 17A**), ni de las poblaciones $B220^{+}IgM^{-}$ y $B220^{+}IgM^{+}$ en los ratones ICAP-$1^{-/-}$ (**Figura 17B**). Todos estos datos indican que ICAP-1 no es requerido durante la linfopoyesis de células B en la MO.

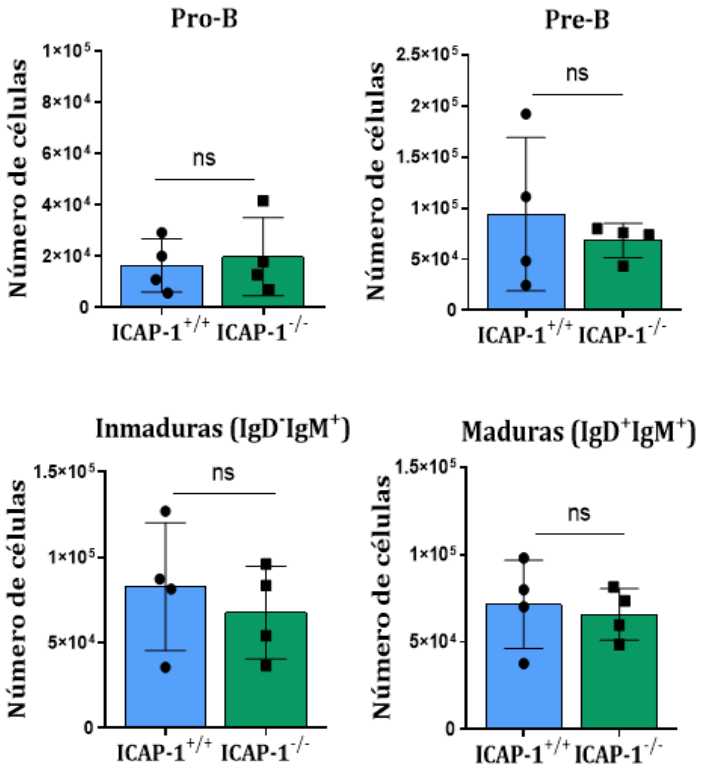


Figura 16. La linfopoyesis de células B en médula ósea no está afectada en ratones ICAP-$1^{-/-}$. Análisis del número celular en las poblaciones indicadas en MO de ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ (ns, no significativo).

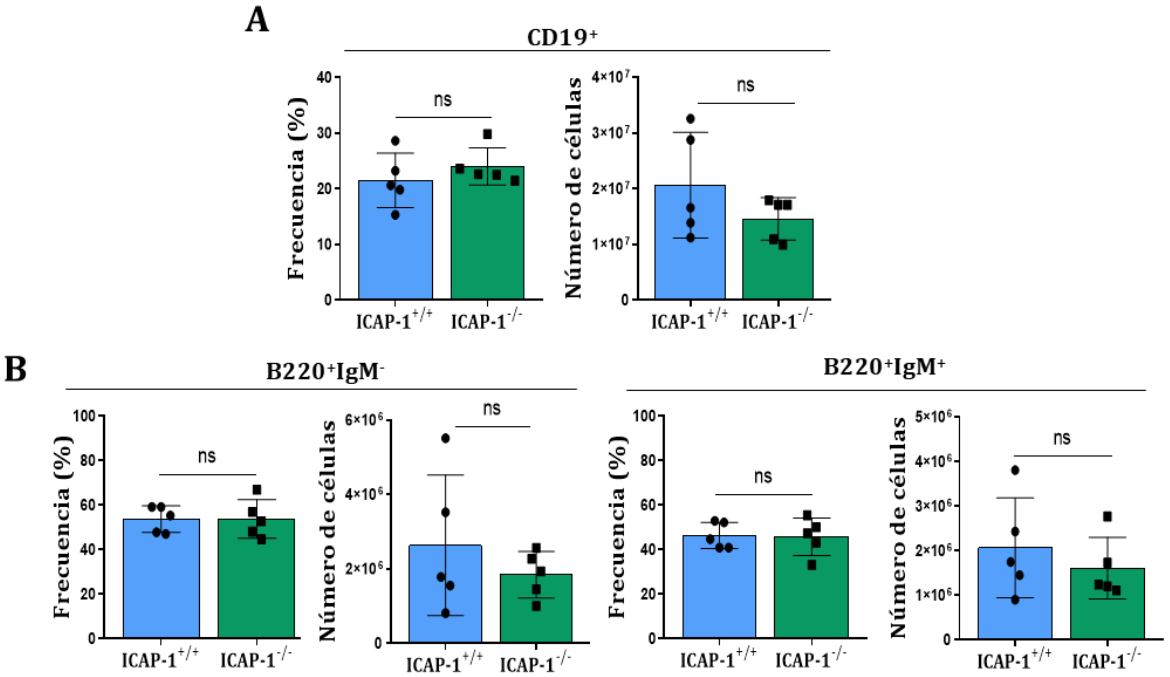


Figura 17. Poblaciones CD19⁺ y B220⁺ en MO. Análisis de la proporción y número de células de las poblaciones CD19⁺ (**A**), B220⁺IgM⁻ y B220⁺IgM⁺ (**B**) en MO de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ (ns, no significativo).

1.2. Alteración del desarrollo de timocitos CD8⁺ en ratones ICAP-1$^{-/-}$

Los progenitores linfoides de células T migran desde la MO hacia el timo, el cual es un órgano linfoide primario donde tiene lugar el desarrollo y maduración de los timocitos (Abbas *et al.,* 2018; Ashby & Hogquist, 2023). El timo de los ratones ICAP-1$^{-/-}$ es menor que el de los ratones ICAP-1$^{+/+}$ (Sevilla-Movilla *et al.*, 2022), lo que se correlaciona con un menor peso del timo (**Figura 18A**). Esta reducción del tamaño del timo se reflejó en una disminución del número total de timocitos en los ratones ICAP-1$^{-/-}$ (**Figura 18B**). Sin embargo, cuando normalizamos el número de timocitos respecto al peso del ratón, no distinguimos diferencias significativas en la celularidad del timo entre ambos grupos de ratones (**Figura 18B**).

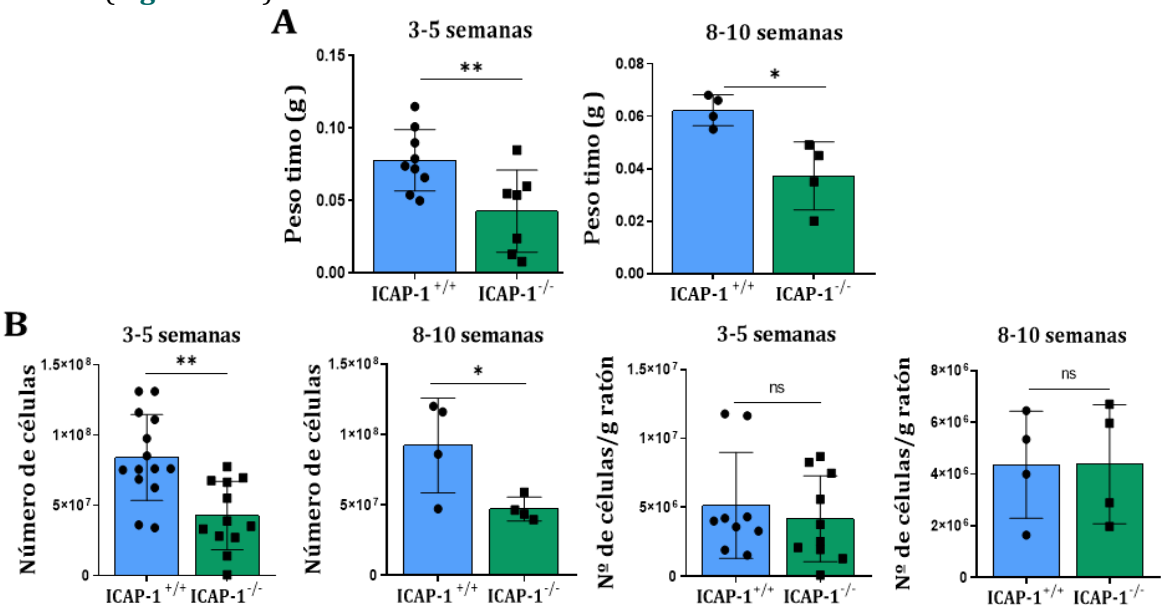


Figura 18. Celularidad del timo en ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (**A**) Pesos de los timos. (**B**) Se muestra el número total de células de los timos (izquierda), y el número de células normalizado respecto al peso del ratón (derecha), (ns, no significativo, **p<0.01, *p<0.05).

Los análisis mediante citometría de flujo revelaron que el número de células y las proporciones de las poblaciones dobles negativas CD4$^-$CD8$^-$ (DN) no estaban significativamente alterados en los ratones deficientes en ICAP-1 (**Figura 19**).

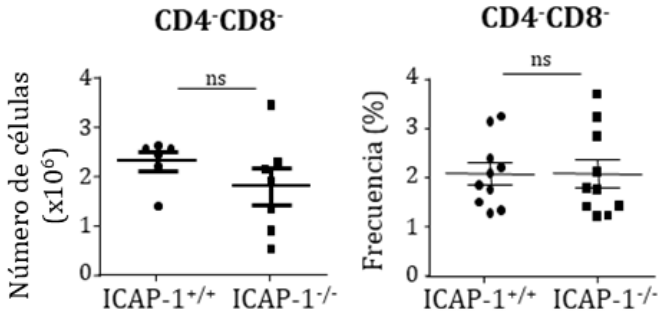


Figura 19. Análisis de la población de timocitos DN. Se muestra el número de células y la frecuencia de timocitos DN de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ (ns, no significativo). (Figura adaptada de la Tesis Doctoral de Silvia Sevilla Movilla, 2019).

En colaboración con las Dras. Patricia Fuentes y María Luisa Toribio (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid), analizamos mediante citometría de flujo las poblaciones de los timocitos DN1 (CD44$^+$CD25$^-$), DN2 (CD44$^+$CD25$^+$), DN3 (CD44^{low}CD25$^+$) y DN4 (CD44$^-$CD25$^-$), no hallando alteraciones significativas de las frecuencias y número de timocitos de ratones control y deficientes en ICAP-1 (Sevilla-Movilla *et al.*, 2022).

El análisis de las células dobles positivas CD4$^+$CD8$^+$ (DP) y CD4$^+$ *single positive* (SP) mostró una disminución de la cantidad de ambas poblaciones, si bien estas alteraciones no afectaron a sus proporciones, lo que podría explicarse por la reducción de la celularidad total del timo. Sin embargo, se evidenció una reducción significativa tanto del porcentaje como del número de timocitos SP CD8$^+$ en ratones ICAP-1$^{-/-}$ (**Figura 20**; adaptada de Sevilla-Movilla *et al.*, 2022). Estos resultados se muestran como base para el desarrollo de datos posteriores de la presente Tesis.

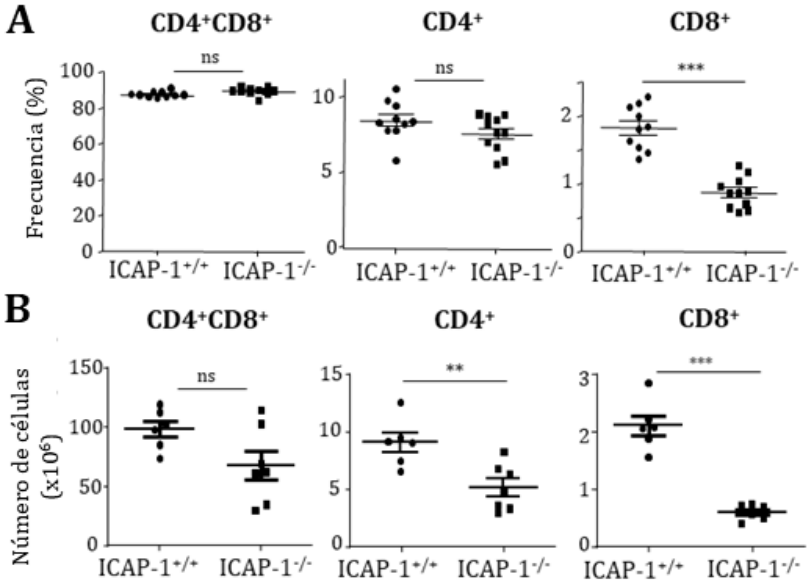


Figura 20. Distribución de las poblaciones de timocitos DP y SP. Frecuencia (**A**) y número de células (**B**) de los timocitos DP, SP CD4$^+$ y SP CD8$^+$ obtenidos por citometría de flujo a partir de muestras de timo de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ de 3-5 semanas (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01). (Figura adaptada de la Tesis Doctoral de Silvia Sevilla Movilla, 2019).

Para estudiar los niveles de expresión de ICAP-1 en las diferentes subpoblaciones del timo, purificamos timocitos totales, así como timocitos DP y CD4$^+$ mediante *cell sorting*. Los timocitos CD8$^+$ fueron purificados mediante selección negativa con el *kit MagCellet Mouse*

CD8⁺ T-Cell Isolation Kit. La expresión de ICAP-1 en las diferentes subpoblaciones celulares fue analizada mediante *Western blotting*, los cuales mostraron que ICAP-1 es expresado tanto en las poblaciones DP, como en los timocitos SP CD4⁺ y CD8⁺ (**Figura 21**).

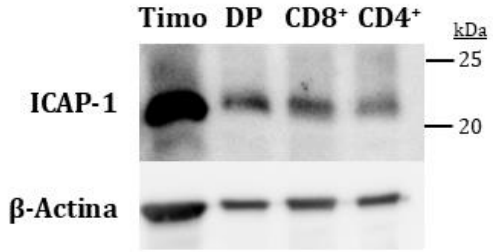


Figura 21. Expresión de ICAP-1 en subpoblaciones de timocitos. Análisis por *Western blotting* de la expresión de ICAP-1 en timocitos totales, DP, CD8⁺ y CD4⁺. Se muestra un gel representativo (n=3), utilizando β-Actina como control de carga.

Los timocitos CD8⁺ engloban no solamente a las células SP CD8⁺ maduras que expresan el TCRαβ, sino también a los timocitos que comienzan a expresar CD8⁺ pero que aún no presentan el receptor TCRαβ maduro (ISP) (Petrie *et al.,* 1990; Kohu *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2011). Experimentos de citometría de flujo en colaboración con la Dra. Patricia Fuentes revelaron una reducción de la frecuencia y el número de los timocitos SP CD8⁺ maduros de los ratones ICAP-1$^{-/-}$ en comparación con sus controles, mientras que detectamos un incremento de la proporción pero no del número de células ISP CD8⁺TCRαβ⁻ en los ratones mutantes (**Figura 22**) (Sevilla-Movilla *et al.*, 2022). Estos datos indicaron que la falta de ICAP-1 afecta a la generación de células maduras SP CD8⁺ TCRαβ⁺.

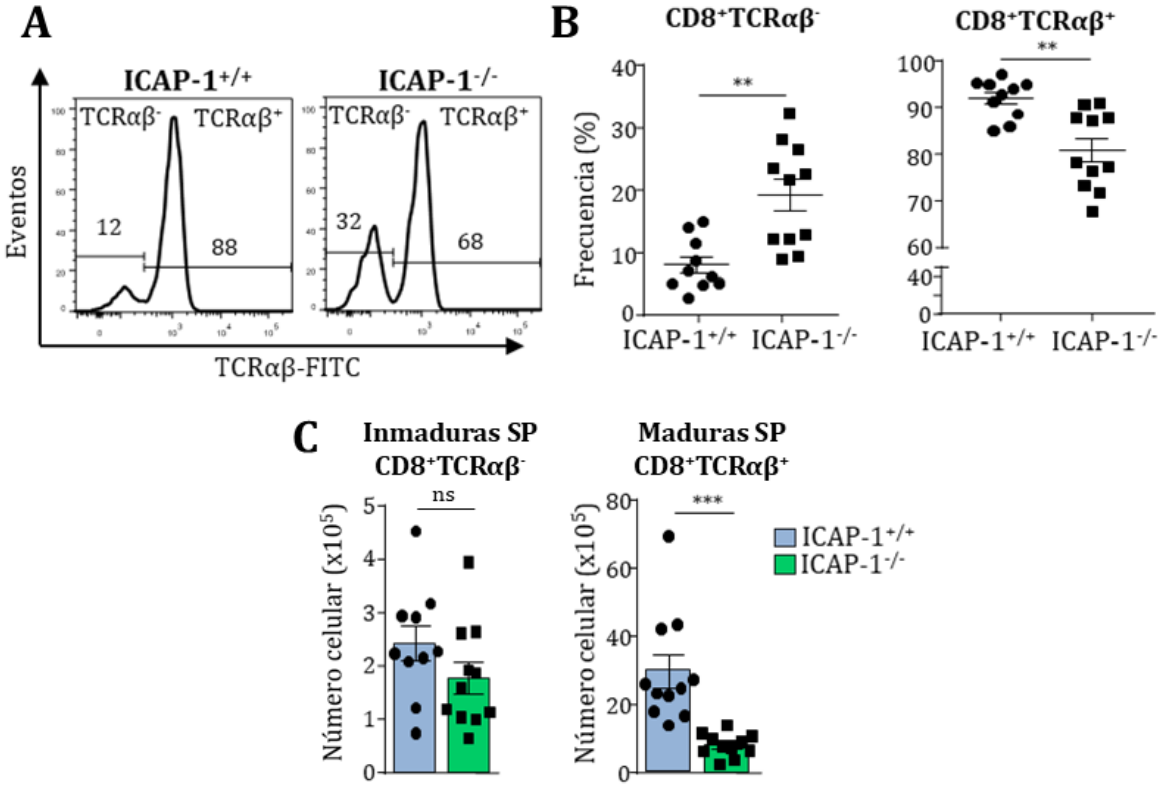


Figura 22. Análisis de las poblaciones inmaduras y maduras CD8⁺ en timo. (**A**) Estrategia de selección de los timocitos ISP o maduros de acuerdo con la expresión de TCRαβ en células CD8⁺ de muestras de timo de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Se muestra la frecuencia (**B**) y número de células (**C**). Datos agrupados de tres experimentos distintos (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01).

1.3. La deficiencia en el desarrollo de las células SP CD8⁺ en ratones ICAP-1$^{-/-}$ es intrínseca de los timocitos

Para el desarrollo de los timocitos SP CD4⁺ o CD8⁺ es necesaria su interacción con antígenos peptídicos presentados por moléculas MHC-I o MHC-II en células epiteliales tímicas

(TEC) (Moran & Hogquist, 2012; Ashby & Hogquist, 2023). Para investigar las bases celulares del defecto en la generación de timocitos SP CD8$^+$ en ratones ICAP-1$^{-/-}$, comprobamos en primer lugar que las TEC expresan ICAP-1 (Sevilla-Movilla *et al.*, 2022). En colaboración con la Dra. Sara Montero y con los Dres. Javier García-Ceca y Agustín Zapata, de la Universidad Complutense de Madrid, analizamos las poblaciones TECs corticales y medulares mediante la utilización de los anticuerpos Ly51 y UEA1, respectivamente. Los datos indicaron un incremento moderado en la proporción de las células cTECs, asociado con una reducción de la frecuencia de las células mTECs en los timos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ (**Figura 23**), aunque imágenes de microscopía confocal de secciones de timo mostraron distribuciones normales de células DP en el córtex, y de timocitos SP CD4$^+$ y CD8$^+$ en la médula del timo de ratones deficientes en ICAP-1 (no mostrado; Sevilla-Movilla *et al.*, 2022).

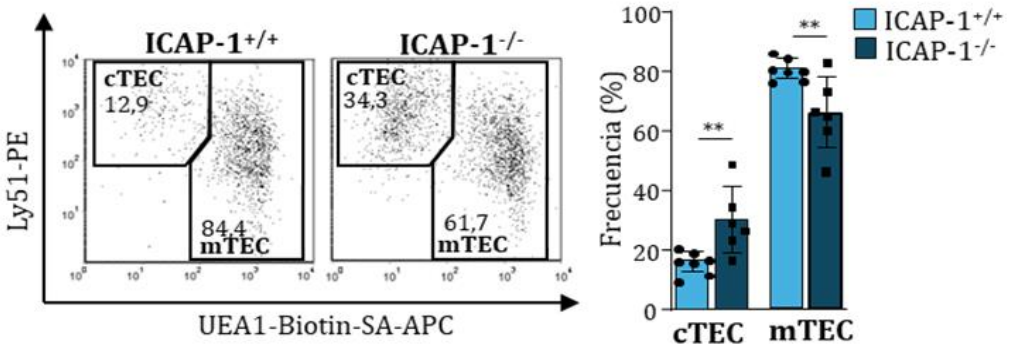


Figura 23. Distribución de las poblaciones cTECs y mTECs en timo. Estrategia de *gating* de las poblaciones cTECs y mTECs de timos procedentes de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ (izquierda), y cuantificación de dichas poblaciones (derecha), (**p<0.01).

Para estudiar si la deficiente generación de las células SP CD8$^+$ se debía a un defecto intrínseco de los timocitos o de las TEC, llevamos a cabo experimentos de quimeras mixtas. En estos experimentos, ratones que expresan la isoforma CD45.1 fueron irradiados letalmente, y posteriormente trasplantados con cantidades equivalentes de células de MO de dos tibias y dos fémures procedentes de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$, los cuales expresan CD45.2. Sin embargo, estos experimentos mostraron que las células procedentes de los ratones ICAP-1$^{-/-}$ eran incapaces de competir con las células de los ratones ICAP-1$^{+/+}$ durante la reconstitución de la MO (resultados no mostrados), por lo que decidimos realizar experimentos de quimeras simples.

En dichos experimentos, los ratones CD45.1 fueron irradiados letalmente, y posteriormente, trasplantados con células de la MO obtenidas de dos fémures y dos tibias de ratones CD45.2/ICAP-1$^{+/+}$ o CD45.2/ICAP-1$^{-/-}$. Tras asegurarnos mediante citometría de flujo de sangre periférica que la reconstitución había funcionado (**Figura 24A**), analizamos las diferentes poblaciones de timocitos. Los resultados mostraron que los ratones reconstituidos con células de MO procedentes de los ratones ICAP-1$^{-/-}$ presentaban una reducción de un 20-25% en la población de timocitos SP CD8$^+$ en comparación con los ratones reconstituidos con células procedentes de ratones ICAP-1$^{+/+}$. En cambio, los ratones reconstituidos con células de MO procedentes de ratones ICAP-1$^{-/-}$ presentaban frecuencias normales de los timocitos CD4$^+$. Sin embargo, los ratones ICAP-1$^{-/-}$ reconstituidos con células de MO de ratones CD45.1 no mostraron alteraciones en las poblaciones de timocitos SP CD8$^+$ (**Figura 24B**, **C**), indicando que el déficit de células SP CD8$^+$ en ratones ICAP-1$^{-/-}$ es autónomo de los timocitos.

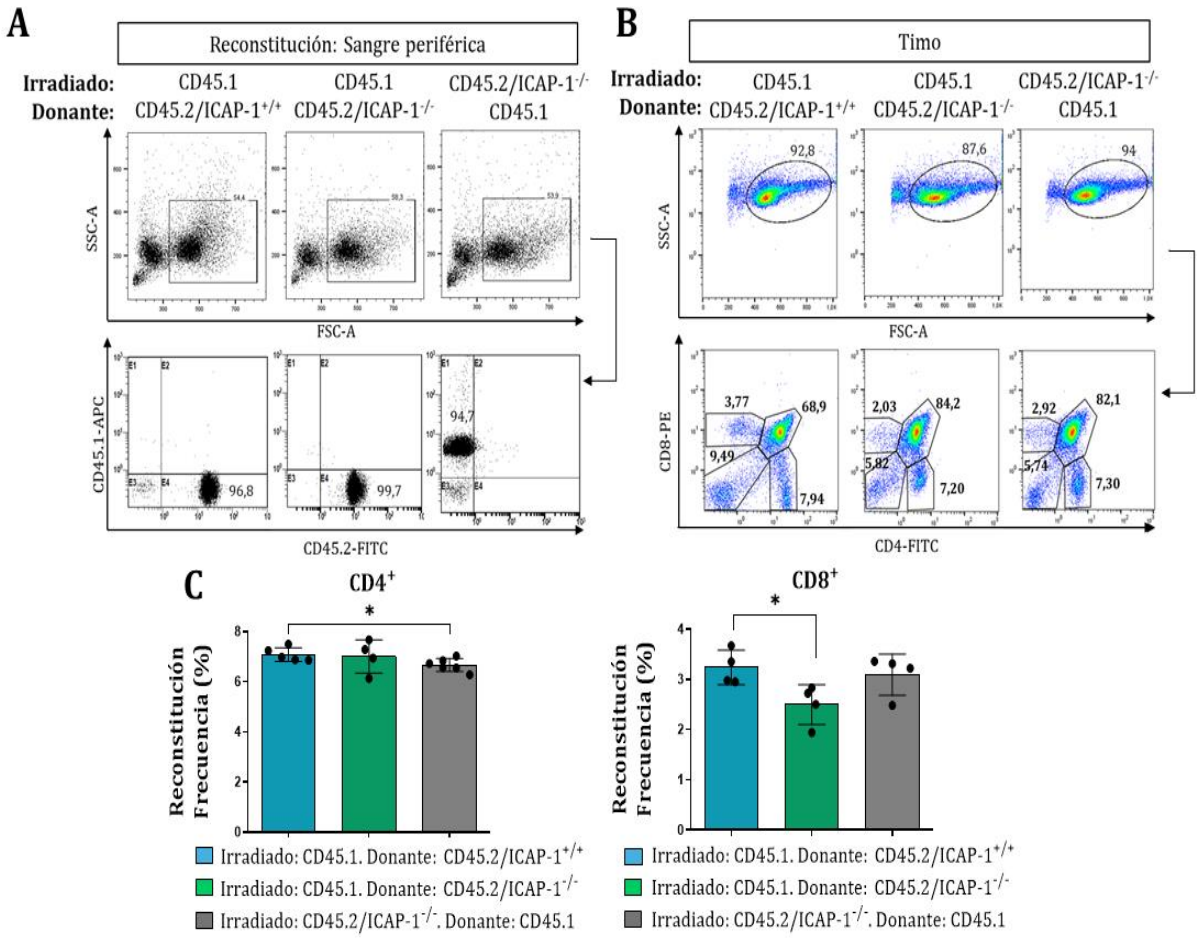


Figura 24. Análisis de poblaciones de timocitos en ratones quimeras. (**A**) Estrategia de *gating* en sangre periférica para la comprobación de la reconstitución. (**B**) Estrategia de *gating* de las poblaciones DN, DP, CD4⁺ y CD8⁺ a partir del timo de los ratones irradiados. (**C**) Cuantificación de las poblaciones de timocitos obtenidas a partir de los datos de citometría de flujo (*p<0.05).

1.4. Papel de ICAP-1 en la maduración de los timocitos SP CD8⁺

Debido a la reducción de los timocitos SP CD8⁺ en ratones ICAP-1$^{-/-}$, decidimos analizar el proceso de selección de los timocitos en diferentes estadíos de maduración (Hogquist *et al.*, 2015). En respuesta a señales del TCR, se incrementa la expresión del receptor de quimioquinas CCR7 en timocitos DP durante la selección positiva, lo que contribuye a su migración hacia la médula del timo en la que se encuentran expresados sus ligandos CCL19 y CCL21 (Ueno *et al.*, 2004). En base a estos datos, analizamos en el citómetro de flujo los timocitos CCR7⁺TCR⁺. A su vez, empleamos los marcadores CD69, que se activa durante el proceso de maduración por estimulación del TCR, y H2-Kb que representa el MHC-I, para distinguir tres subpoblaciones diferentes de timocitos seleccionados positivamente en distintos estadíos de maduración: la subpoblación semimadura (SM) CD69⁺MHC-I⁻, susceptible a apoptosis tras el acoplamiento del TCR con su antígeno (TCR *engagement*); la subpoblación madura M1 CD69⁺MHC-I⁺, con capacidad proliferativa; y la madura M2 CD69⁻MHC-I⁺, que expresa marcadores para la emigración de los timocitos (Hogquist *et al.*, 2015; Xing *et al*., 2016) (**Figura 25A**). En colaboración con las Dras. Patricia Fuentes y María Luisa Toribio, analizamos las frecuencias de las poblaciones SP CD4⁺ y CD8⁺, pudiendo observar una reducción de la proporción de los timocitos SP CD8⁺ en los estadíos SM, M1 y M2 de maduración, mientras que no existían alteraciones en la población de timocitos SP CD4⁺ (**Figura 25B**). Estos datos sugieren una posible alteración en la selección positiva de los timocitos SP CD8⁺ en ratones que carecen de la expresión de ICAP-1.

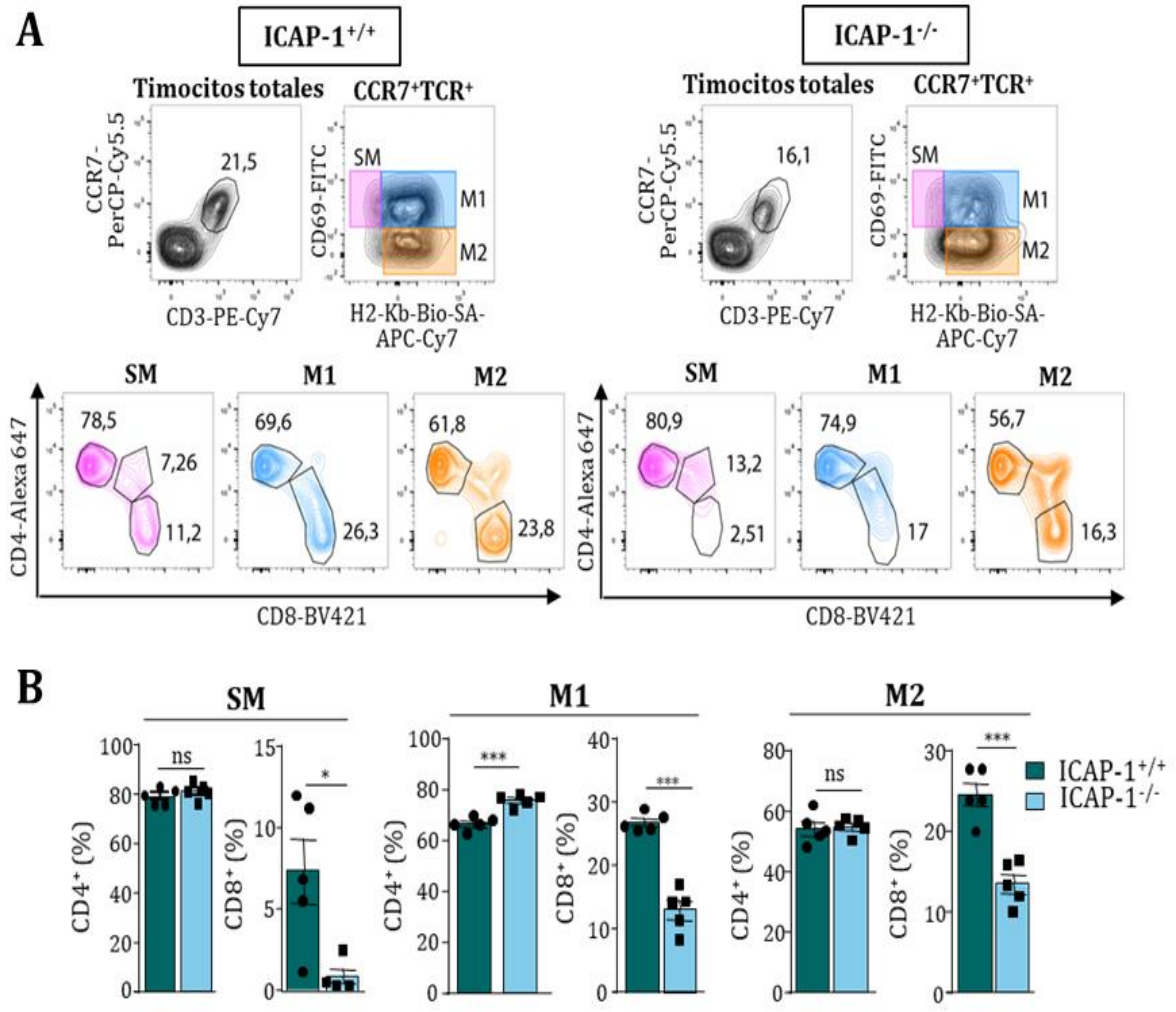


Figura 25. La ausencia de ICAP-1 causa una maduración deficiente de los timocitos SP CD8⁺. (**A**) Ejemplo representativo de *dot plots* distinguiendo las poblaciones SM, M1 y M2. (**B**) Cuantificación del porcentaje de timocitos CD4⁺ y CD8⁺ en los estadíos SM, M1 y M2 (ns, no significativo, ***p<0.001, *p<0.05).

Tanto el pre-TCR previo a la selección positiva como el TCR maduro se asocian a la cadena CD3 para la inducción de señalización (Michie & Zúñiga-Pflücker, 2002; Smith-Garvin *et al.*, 2009; Carpenter & Bosselut, 2010). Por ello, analizamos la expresión de CD3 en las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ de timocitos CCR7⁺CD3⁺ de ratones ICAP-1$^{-/-}$ e ICAP-1$^{+/+}$ (**Figura 26**). Los resultados reflejaron una reducción de la expresión de CD3 en las poblaciones DP, CD4⁺ y CD8⁺ en los ratones ICAP-1$^{-/-}$ en comparación con los ratones ICAP-1$^{+/+}$.

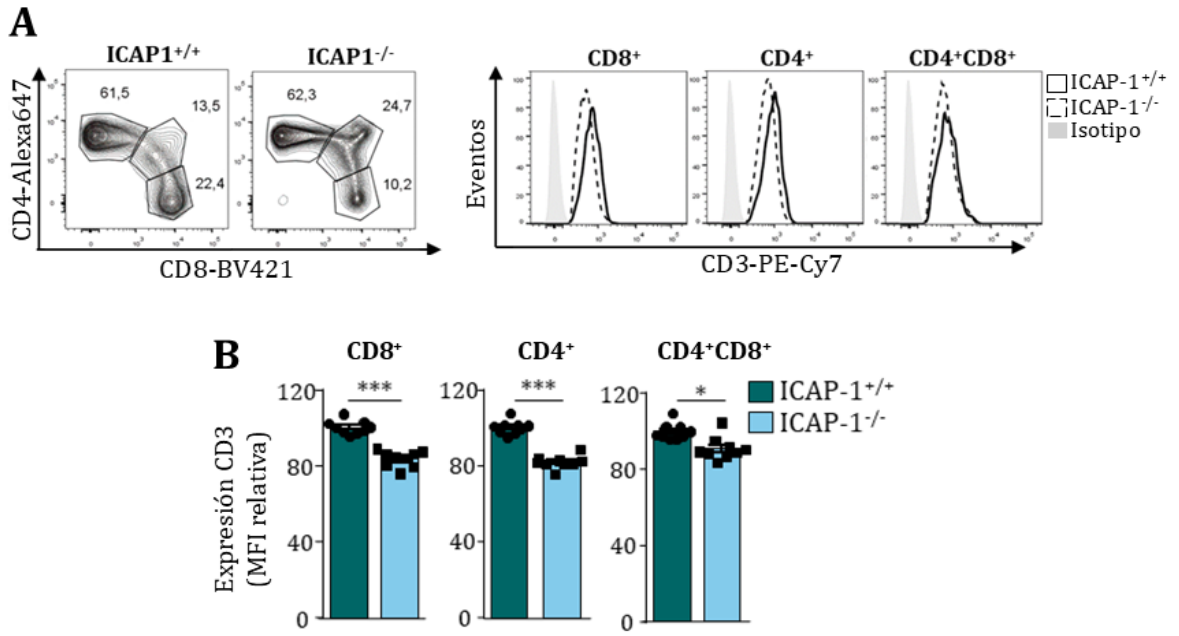


Figura 26. Análisis de la expresión de CD3 en los timocitos SP y DP. (**A**) *Dot plots* representativos con la estrategia de *gating* de los timocitos DP, CD4⁺ y CD8⁺, así como los histogramas de la MFI (intensidad media de fluorescencia) de CD3. (**B**) Cuantificación de la MFI de CD3 en las poblaciones CD8⁺, CD4⁺ y DP. Se emplearon 10 ratones (datos agrupados de 4 experimentos), (***p<0.001, *p<0.05).

1.5. Los timocitos SP CD8⁺ en ratones ICAP-1$^{-/-}$ muestran una reducción de la expresión de *Runx3*

En resultados previos de análisis de adhesión celular con timocitos totales, hemos mostrado que la falta de ICAP-1 no altera su adhesión a CS-1/FN y VCAM-1, ambos ligandos de la integrina α4β1 (Tesis Doctoral, Silvia Sevilla Movilla, 2019; Sevilla-Movilla *et al*., 2022). Estos datos indican que la alteración en el desarrollo de los timocitos SP CD8⁺ en ratones ICAP-1$^{-/-}$ tiene lugar en condiciones normales de adhesión mediada por α4β1.

Además de su capacidad de unirse a la subunidad β1 de las integrinas, ICAP-1 contiene una secuencia de localización nuclear que le permite su translocación hacia el núcleo (Fournier *et al*., 2005; Draheim *et al*., 2017; Su *et al*., 2020), y hemos demostrado anteriormente que los timocitos muestran una expresión predominante de ICAP-1 en el núcleo (Sevilla-Movilla *et al*., 2022). Esta observación junto con la reducción de la población de los timocitos SP CD8⁺ en ratones ICAP-1$^{-/-}$, nos llevó a analizar la expresión de Runx3, un factor de transcripción necesario para el desarrollo de timocitos SP CD8⁺ (Taniuchi *et al.,* 2002; Kohu *et al*., 2005; Egawa *et al.,* 2007). *Runx3* presenta dos regiones promotoras distintas, P1 (distal) y P2 (proximal). El exón 1 de *Runx3*, transcrito desde el promotor distal, es específico de timocitos SP CD8⁺ (Bangsow *et al*., 2001; Chung *et al.,* 2007), y no se encuentra en timocitos DN, DP o CD4⁺ (Egawa *et al*., 2007). Por tanto, procedimos a analizar por RT-qPCR la expresión de *Runx3* distal (*Runx3d*) mediante una serie de *primers* específicos, utilizando timocitos SP CD8⁺ purificados a partir de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Los resultados revelaron un fuerte descenso de la expresión de *Runx3d* en los timocitos SP CD8⁺ de ratones ICAP-1$^{-/-}$ comparado con los ratones control (**Figura 27A**), mientras que los niveles de *Thpok* y *Gata3*, los cuales son necesarios para el desarrollo de timocitos CD4⁺ (He *et al*., 2005; Singer *et al*., 2008; Xiong *et al*., 2013; Luckey *et al*., 2014), permanecían inalterados.

Por otro lado, a partir de los experimentos de quimeras simples descritos más arriba, y utilizando ratones CD45.1 irradiados y posteriormente reconstituidos con células de MO

procedentes de ratones CD45.2/ICAP-1$^{-/-}$ o CD45.2/ICAP-1$^{+/+}$, analizamos por RT-qPCR la expresión de *Runx3d*, *Thpok* y *Gata3* de timocitos SP CD8^{+} purificados mediante selección negativa. Los resultados mostraron que la expresión de *Runx3d* presentaba una clara disminución en los ratones reconstituidos con células CD45.2/ICAP-1$^{-/-}$ en comparación con los ratones reconstituidos con células CD45.2/ICAP-1$^{+/+}$, mientras que la expresión de *Thpok* y *Gata3* fue similar en ambos grupos (**Figura 27B**).

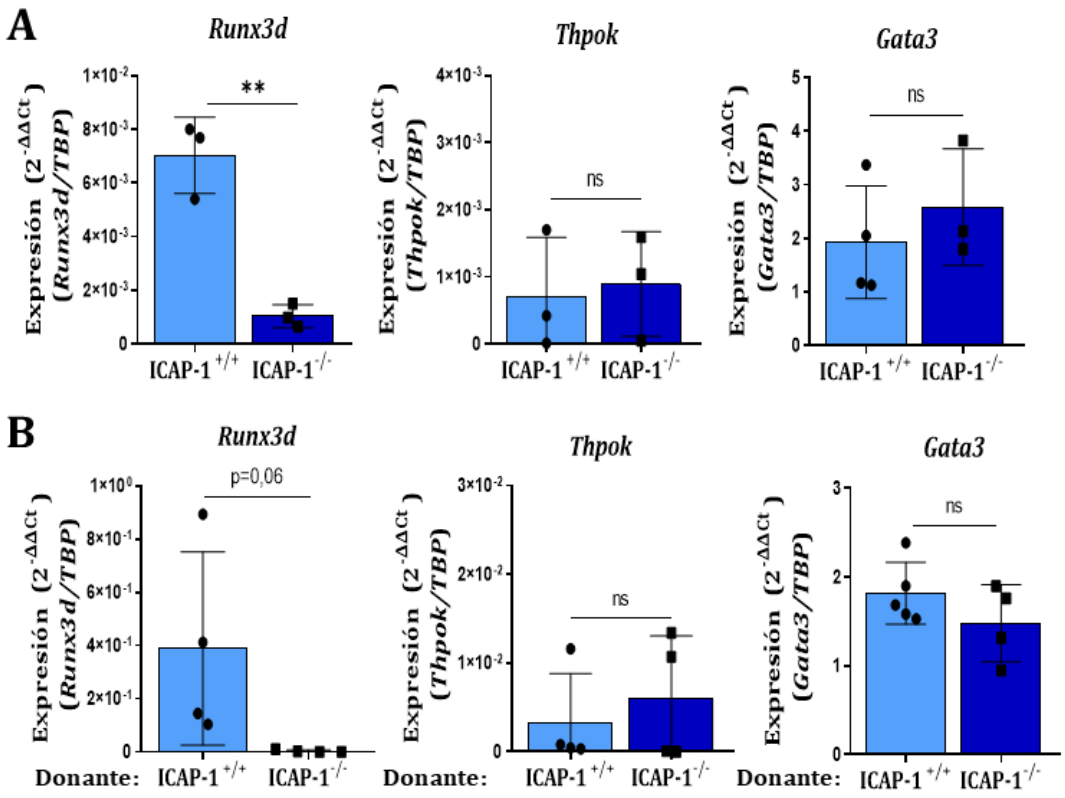


Figura 27. Reducción de la expresión de *Runx3d* en timocitos SP CD8^{+} en ratones ICAP-1$^{-/-}$. Análisis por RT-qPCR de la expresión de *Runx3d*, *Thpok* y *Gata3* en timocitos SP CD8^{+} purificados de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ (**A**), o de células CD8^{+} purificadas de timos de ratones CD45.1 irradiados y reconstituidos con células de MO de ratones CD45.2/ICAP-1$^{+/+}$ o CD45.2/ICAP-1$^{-/-}$ (**B**), (ns, no significativo, **p<0.01).

Estos resultados nos sugirieron la posibilidad de que ICAP-1 pudiera estar regulando la expresión de Runx3 en timocitos, lo que nos llevó a buscar un modelo experimental que pudiera contribuir a estudiar esta posibilidad. Tras una búsqueda en bases de datos de relaciones de expresión entre ICAP-1 y Runx3 en diferentes líneas celulares, elegimos las células Jurkat, una línea celular humana de linfocitos T. Experimentos de fraccionamiento celular mostraron que ICAP-1 se distribuye tanto en núcleo como en el citosol (**Figura 28A**). Asimismo, observamos que la expresión nuclear de Runx3 es muy baja, ya que solo lo pudimos detectar tras una sobreexposición de las membranas en ensayos de *Western blotting* (**Figura 28A**). Estos datos nos llevaron a investigar si la sobreexpresión de ICAP-1 mediante transfección en células Jurkat podría traducirse en una inducción de la expresión de Runx3. Para ello, se realizaron tres transfecciones distintas por electroporación. Un grupo de células recibió un vector pEGFP; otro se electroporó con un vector pEGFP-ICAP-1, y el tercero recibió un pulso de electroporación pero sin vector. Tras la electroporación, las células fueron incubadas durante 16 h, y posteriormente recogidas para analizar mediante citometría de flujo la eficiencia de la transfección. En base a la expresión de GFP, pudimos detectar una eficiencia moderada de transfección con los mencionados vectores (**Figura 28B**). Como análisis complementario de la eficiencia de transfección, lisamos los transfectantes y llevamos a cabo ensayos de *Western blotting*. Estos experimentos confirmaron la expresión de GFP e ICAP-1-GFP en los mencionados transfectantes (**Figura 28C**).

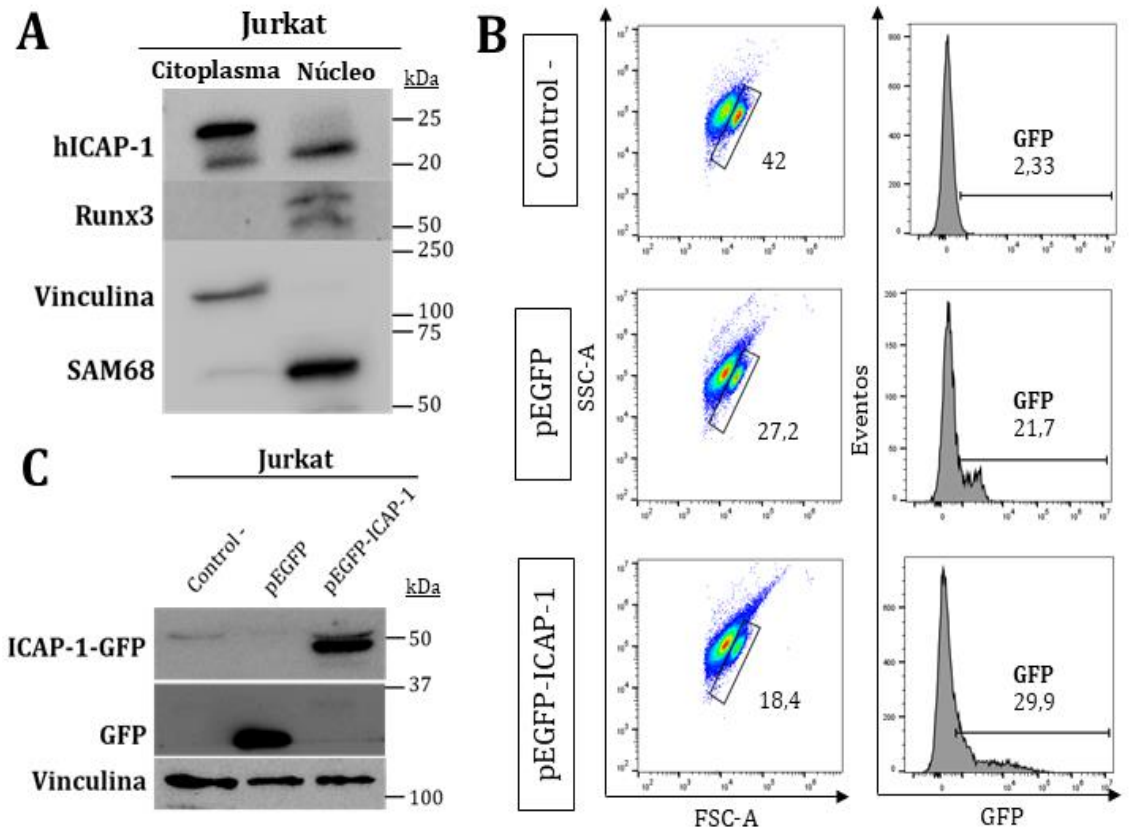


Figura 28. Expresión endógena y transfectada de ICAP-1 en células Jurkat. (**A**) Análisis por fraccionamiento celular y *Western blotting* de la expresión de ICAP-1 y Runx3 en células Jurkat. Empleamos vinculina como control de expresión citoplasmática, y SAM68 como control nuclear (n=3). (**B**) Las células Jurkat fueron electroporadas con los vectores indicados, y los transfectantes fueron analizados mediante citometría de flujo para cuantificar la expresión de GFP (n=3). (**C**) *Western blotting* representativo (n=3) de la expresión de GFP e ICAP-1-GFP en transfectantes Jurkat, utilizando anticuerpos anti-GFP.

Posteriormente, extrajimos RNA de los distintos transfectantes, y realizamos ensayos de RT-qPCR para analizar la expresión de *Runx3* e *Icap-1,* empleando oligonucleótidos específicos para los genes humanos. Detectamos un incremento muy significativo de la expresión de *Icap-1* en los transfectantes pEGFP-ICAP-1, y observamos un ligero incremento de la expresión de *Runx3,* aunque no alcanzó significantica estadística (datos no mostrados). Estos datos indican que con el modelo utilizado no se ha podido identificar una correlación directa entra la sobreexpresión de ICAP-1 y una inducción de los niveles de *Runx3*. Cabe la posibilidad de que la eficiencia de transfección no sea lo suficientemente elevada para detectar dicha correlación, o que este modelo no sea el óptimo para este estudio. En experimentos futuros utilizaremos el método BioID con células Jurkat, con el fin de identificar el interactoma de ICAP-1 que pueda revelar datos importantes sobre las posibles dianas reguladas por ICAP-1.

2. Papel de ICAP-1 en la maduración y función de linfocitos de órganos linfoides secundarios.

2.1. Distribución de células T periféricas en ratones deficientes en ICAP-1

Tras el desarrollo de las células T en el timo, éstas salen a sangre periférica, desde donde migrarán y recircularán a través de los diferentes OLS (Butcher & Picker, 1996; Takada & Jameson, 2009). Hemos demostrado anteriormente que ICAP-1 se expresa en esplenocitos, pero a diferencia de su preferente localización en el núcleo de los timocitos, ICAP-1 mostró una distribución similar entre el citoplasma y el núcleo de los esplenocitos

(Tesis Doctoral, Silvia Sevilla Movilla, 2019; Sevilla-Movilla *et al.*, 2022). Los ratones ICAP-1$^{-/-}$ presentan tamaños menores del bazo y un número inferior de células comparado con ratones ICAP-1$^{+/+}$ (Sevilla-Movilla *et al.*, 2022), aunque cuando normalizamos el número de células respecto al peso de los ratones, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de ratones en dos diferentes rangos de edad (**Figura 29**).

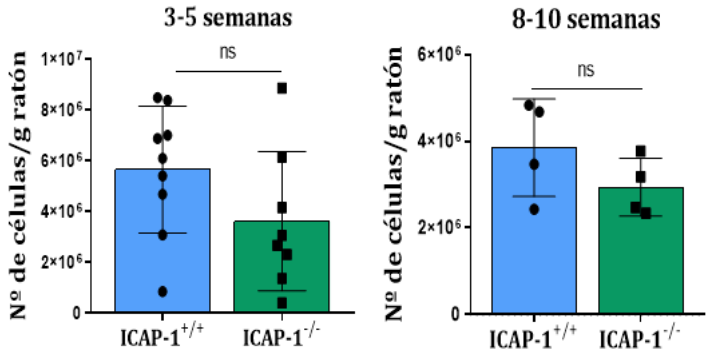


Figura 29. Comparación de la celularidad en bazos de ratones control y deficientes en ICAP-1. Número de células de los bazos normalizado respecto al peso de los ratones (ns, no significativo).

El análisis de las poblaciones de linfocitos T CD8$^+$ en bazos y LNs de ratones ICAP-1$^{-/-}$ reveló una notable reducción de su número y frecuencia en relación con los ratones ICAP-1$^{+/+}$ (**Figuras 30** y **31**; Sevilla-Movilla *et al.*, 2022). Asimismo, el número de linfocitos CD4$^+$ fue menor en ratones deficientes en ICAP-1 de 3-5 semanas, pero no en ratones de más edad, aunque la proporción de esta población linfocitaria no varió o incluso aumentó moderadamente (**Figuras 30** y **31**; Sevilla-Movilla *et al.*, 2022).

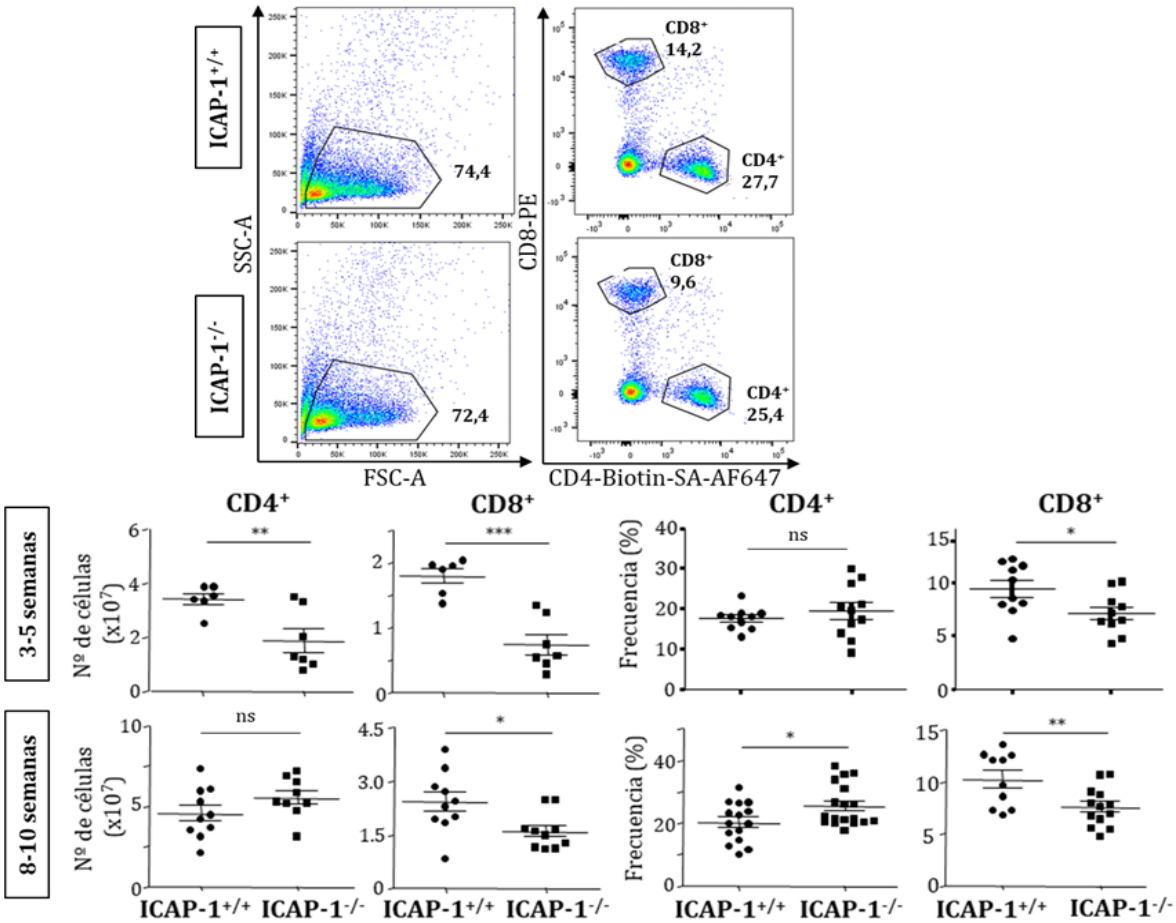


Figura 30. Distribución de los linfocitos T CD4$^+$ y CD8$^+$ en bazo. Se muestra la estrategia de *gating* por citometría de flujo de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (superior), y su número y frecuencia (inferior), (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05). (Figura adaptada de la Tesis Doctoral de Silvia Sevilla Movilla, 2019).

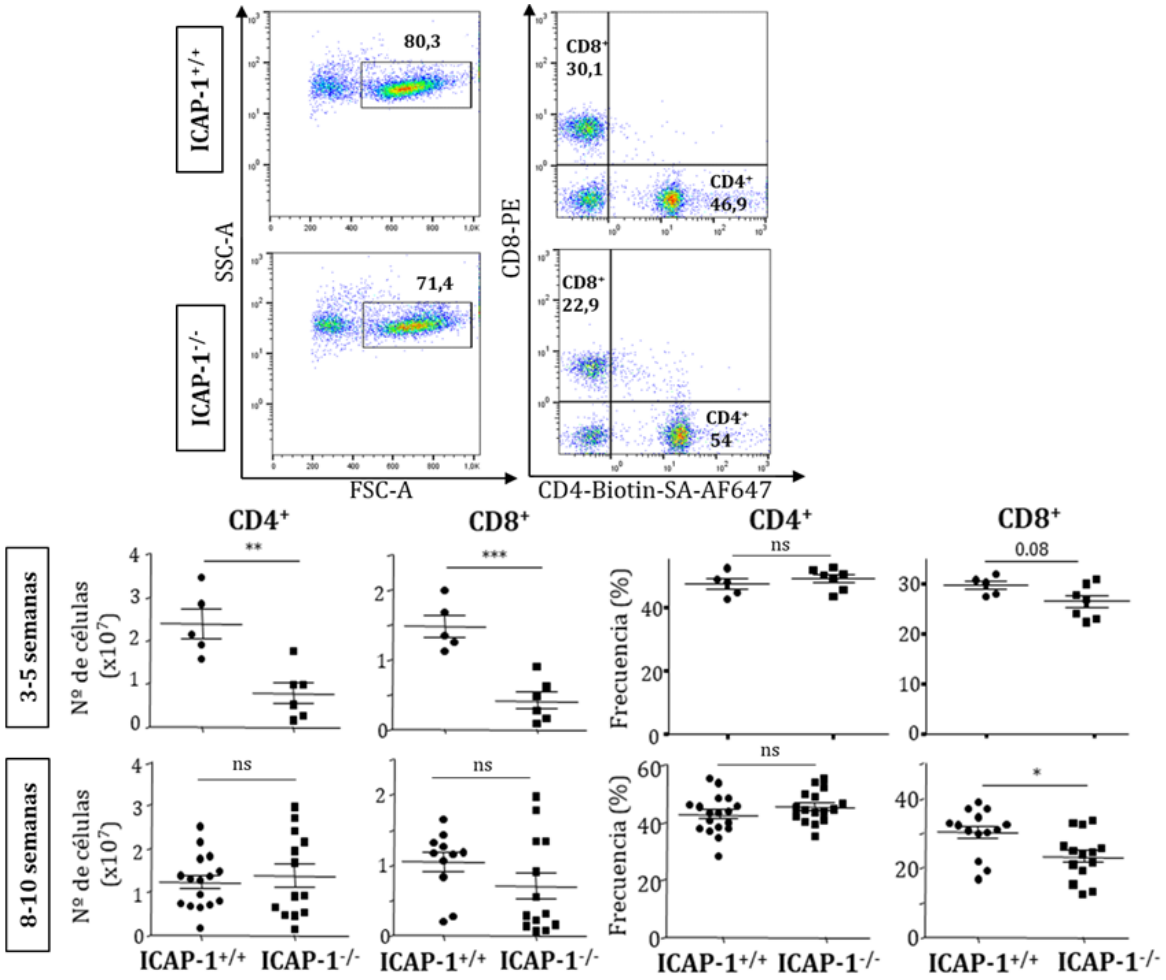


Figura 31. Distribución de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en LNs. Se muestra la estrategia de *gating* por citometría de flujo de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (superior), y su número y frecuencia (inferior), (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05). (Figura adaptada de la Tesis Doctoral de Silvia Sevilla Movilla, 2019).

Para analizar si la reducción de la población de células CD8⁺ en bazo y LNs de ratones ICAP-1$^{-/-}$ se debía a defectos intrínsecos de los linfocitos o a alteraciones del microambiente de estos OLS, realizamos experimentos con ratones quimeras. Los ratones CD45.1 B6.SJL fueron irradiados letalmente, y posteriormente reconstituidos con células de la MO de ratones CD45.2/ICAP-1$^{+/+}$ o CD45.2/ICAP-1$^{-/-}$. Tras seis semanas de reconstitución, analizamos la distribución de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺, tanto en bazo (**Figura 32A**) como en el *pool* de LNs inguinales, axilares y cervicales (**Figura 32B**). Los resultados mostraron que los ratones CD45.1 reconstituidos con células procedentes de ratones CD45.2/ICAP-1$^{-/-}$ presentan una disminución de la frecuencia de células CD8⁺ en comparación con los ratones control, tanto en bazo como en LNs, así como un mayor porcentaje de células CD4⁺. Estos datos sugieren que la disminución de linfocitos CD8⁺ en bazo y LNs en ratones deficientes en ICAP-1 implica alteraciones en funciones intrínsecas de los linfocitos. Aun así, no podemos descartar completamente la contribución de componentes celulares no hematopoyéticos en ambos OLS en esta disminución. Asimismo, dicha reducción de linfocitos CD8⁺ en ratones ICAP-1$^{-/-}$ podría proceder del déficit de timocitos SP CD8⁺ de los ratones CD45.1 reconstituidos con células de la MO de ratones CD45.2/ICAP-1$^{-/-}$.

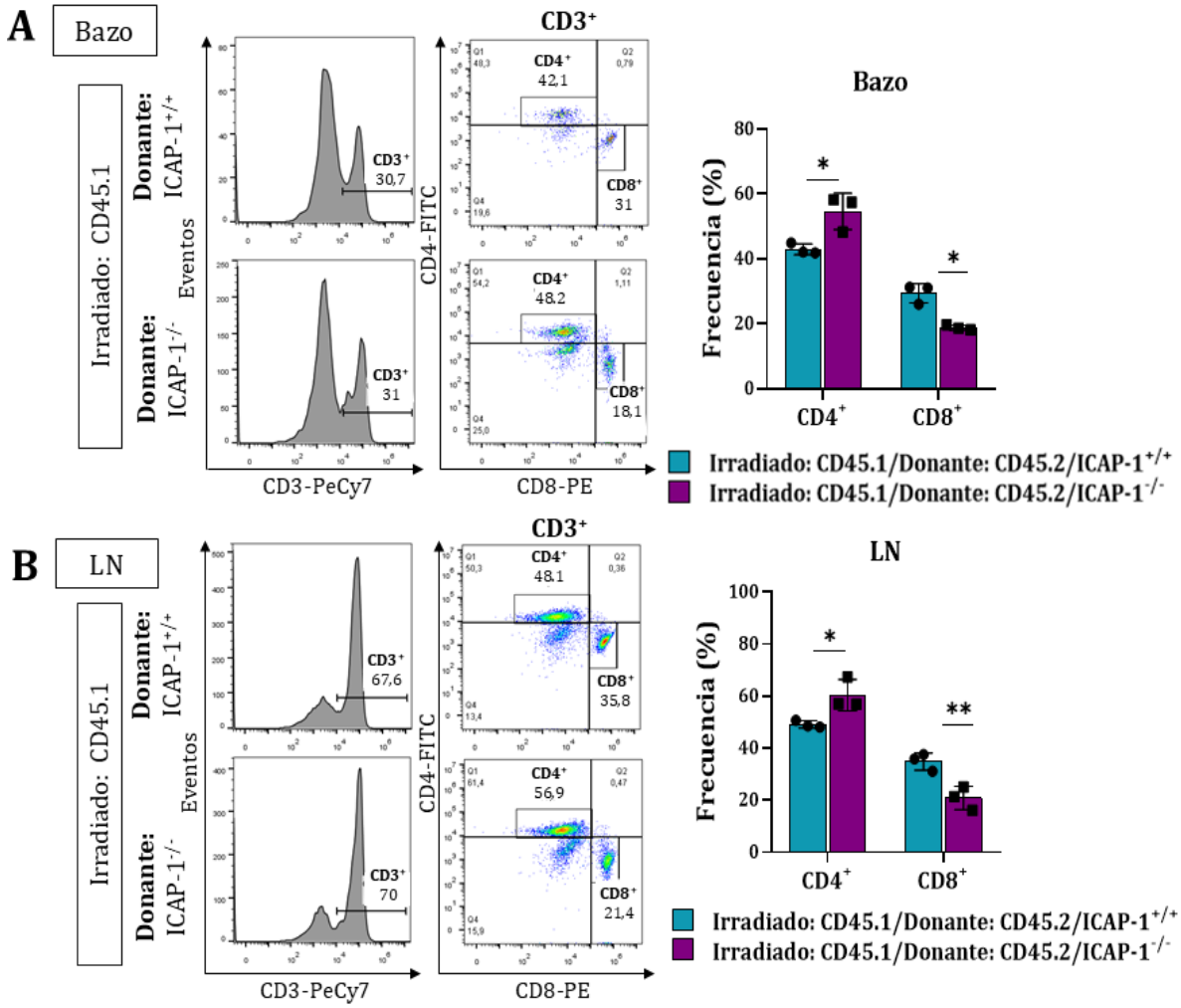


Figura 32. Cuantificación de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ en ratones quimeras. Mediante citometría de flujo se seleccionaron las células CD3⁺ de bazos y LNs a partir de ratones CD45.1 reconstituidos con células de la MO de ratones CD45.2/ICAP-1$^{+/+}$ o CD45.2/ICAP-1$^{-/-}$. A continuación, se analizó la distribución de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ (**p<0.01, *p<0.05).

Debido a la disminución de linfocitos CD8⁺ en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$, analizamos la distribución de las subpoblaciones de células CD8⁺ *naive* y memoria. Para ello, a partir de esplenocitos totales de ratones ICAP-1$^{-/-}$ e ICAP-1$^{+/+}$, seleccionamos mediante citometría de flujo las poblaciones de células CD8⁺, y a continuación cuantificamos la expresión de los marcadores CD62L y CD44. Notablemente, el número y la proporción de células *naive* CD62L^{high}CD44^{-} estaban marcadamente reducidos en esplenocitos de ratones deficientes en ICAP-1 (**Figura 33**). El número total de las poblaciones CD8⁺ de memoria central (CD62L^{high}CD44⁺) y de memoria efectora (CD62L^{-}CD44^{high}) no estaba significativamente alterado en los ratones ICAP-1$^{-/-}$, aunque sus proporciones aumentaron, especialmente en las células CD62L^{high}CD44⁺ (**Figura 33**).

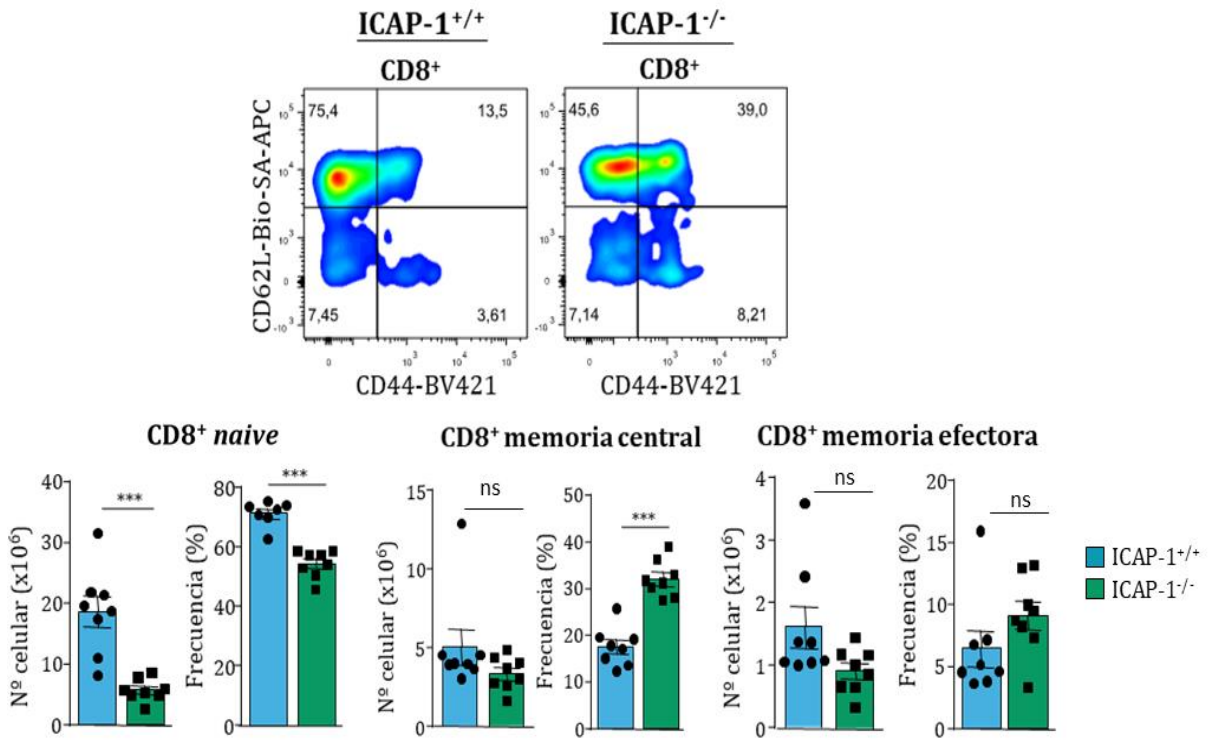


Figura 33. Distribución de células CD8⁺ *naive*, memoria central y memoria efectora en bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Superior) Ejemplo representativo de *dot plots* de la selección de las distintas subpoblaciones de células CD8⁺ utilizando los marcadores CD62L y CD44. (Inferior) Se muestra el número de células y la proporción (%), (ns, no significativo, ***p<0.001). (Colaboración con la Dra. Patricia Fuentes).

2.2. Análisis de la proliferación y apoptosis de células T en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$

Nuestros resultados muestran una reducción de células CD8⁺ en OLS de ratones ICAP-1$^{-/-}$. Aunque dicha reducción podría reflejar la disminución de la población de timocitos SP CD8⁺, decidimos investigar la posible implicación de un defecto en la proliferación de linfocitos CD8⁺ en bazo. Para ello, utilizamos secciones de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ para analizar mediante inmunofluorescencia, el grado de expresión *in situ* en células CD4⁺ y CD8⁺ de Ki67, un marcador de células en proceso de proliferación cuya expresión se incrementa a medida que las células progresan desde las fases G1 a G2 del ciclo celular, pero que no se expresa en la fase G0 (Sun & Kaufman, 2018). Los resultados mostraron un menor número de ambas subpoblaciones celulares positivas para Ki67 en los ratones ICAP-1$^{-/-}$ relativo a los ratones control (**Figura 34**). Asimismo, la determinación del porcentaje de proliferación, que consiste en la relación entre el número de células CD4⁺ Ki67⁺ o CD8⁺ Ki67⁺ y el número total de linfocitos CD4⁺ o CD8⁺, reveló un marcado déficit de proliferación de los linfocitos CD8⁺ de bazos de ratones deficientes en ICAP-1, mientras que los linfocitos CD4⁺ mostraron una reducción de su proliferación, aunque no alcanzó significancia estadística (**Figura 34**). Adicionalmente, obtuvimos una intensidad media de fluorescencia (MFI) de Ki67 en los linfocitos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ menor que en los ratones ICAP-1$^{+/+}$.

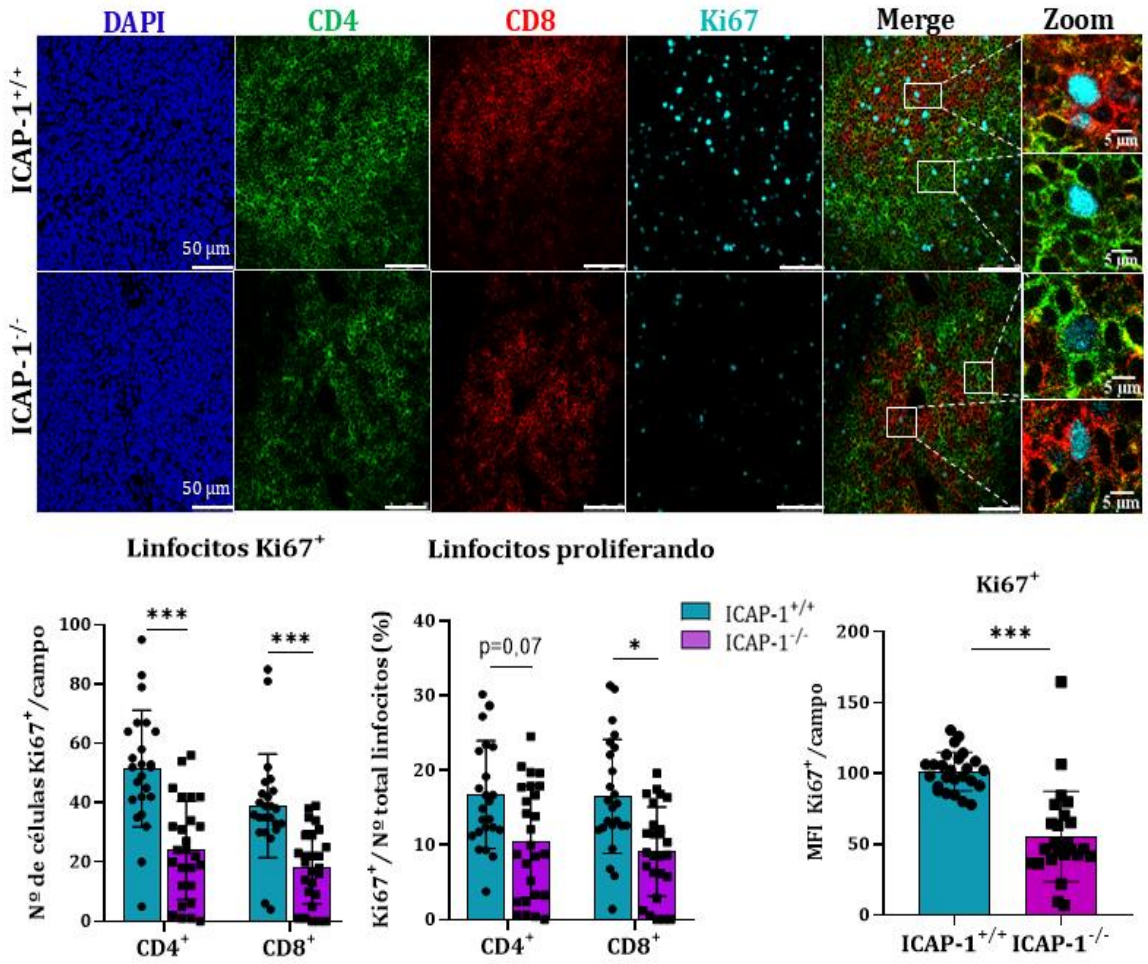


Figura 34. Análisis de la proliferación *in situ* de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. (Superior) Imágenes representativas de la expresión de Ki67 (revelada mediante anti-Ki67+AF647) en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (anti-CD4-AF488 y anti-CD8-Biotina+*Streptavidin*-AF568, respectivamente), en secciones de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Inferior) Se muestra la cuantificación de diferentes parámetros de las inmunofluorescencias (n=4 ratones). Barras de escala de 50 µm y 5 µm (*zoom*), (ns, no significativo, ***p<0.001, *p<0.05).

La reducción detectada en la proliferación de células CD4⁺ y CD8⁺ podría estar asociada a un incremento de la apoptosis. Para investigar esta posibilidad, realizamos ensayos de TUNEL a partir de secciones de bazo de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$, con el fin de analizar el grado de apoptosis de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Sorprendentemente, detectamos un menor número de células CD4⁺ y CD8⁺ positivas para TUNEL en los ratones ICAP-1$^{-/-}$ que en los ratones control (**Figura 35**). La cuantificación del porcentaje de apoptosis reveló que tanto los linfocitos CD4⁺ como los linfocitos CD8⁺ positivos para TUNEL disminuyeron significativamente en los ratones ICAP-1$^{-/-}$ en comparación con los ratones ICAP-1$^{+/+}$ (**Figura 35**). Estos resultados indican que la reducción de la proliferación observada *in situ* en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ deficientes en ICAP-1 no se asocia con un incremento de su apoptosis.

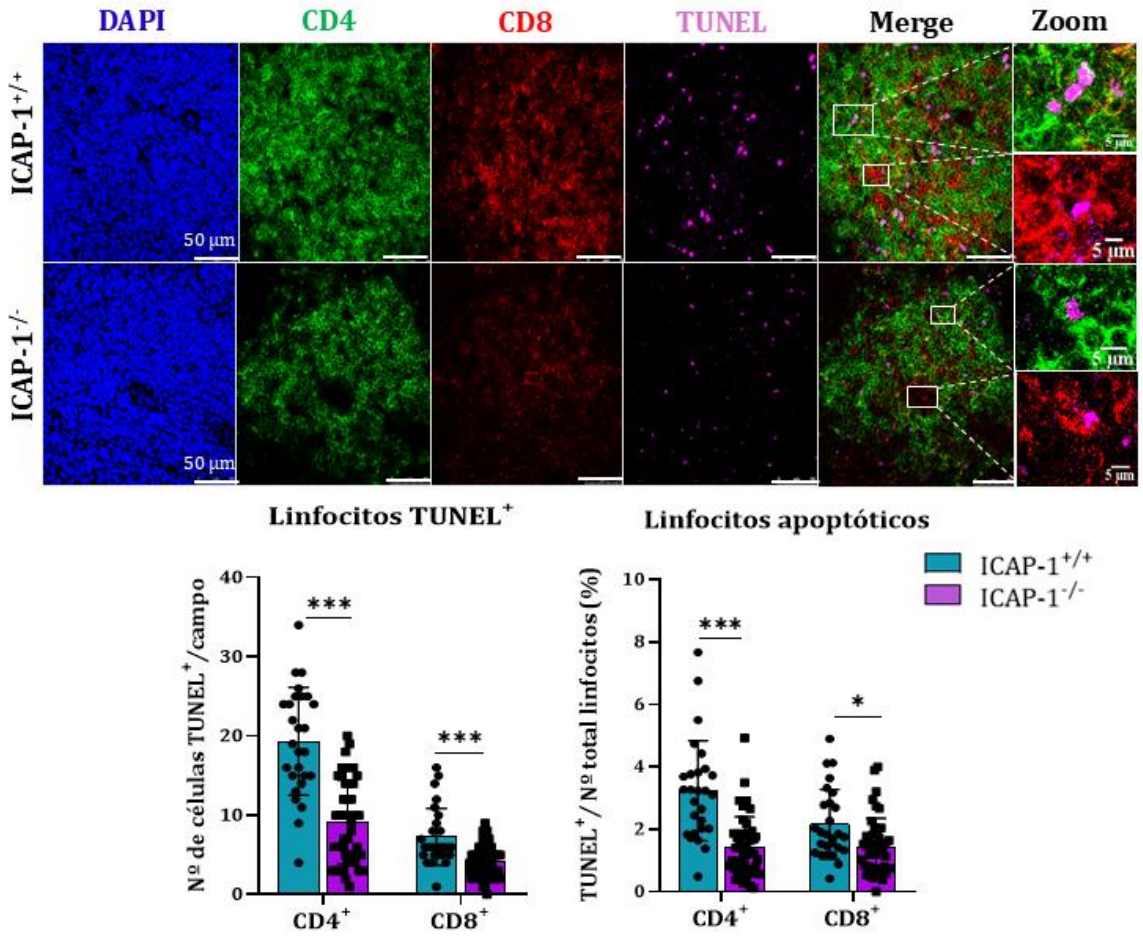


Figura 35. Análisis de la apoptosis *in situ* de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. (Superior) Imágenes representativas de la expresión de TUNEL (TUNEL-AF647) en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (anti-CD4-AF488 y anti-CD8-Biotina+*Streptavidin*-AF568, respectivamente) en secciones de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Inferior) Se muestra la cuantificación de diferentes parámetros de las inmunofluorescencias (n=4 ratones). Barras de escala de 50 µm y 5 µm (*zoom*), (***p<0.001, *p<0.05).

Para analizar en un contexto *in vitro* el potencial proliferativo de linfocitos T que carecen de ICAP-1, determinamos su grado de proliferación utilizando como estímulo anticuerpos anti-CD3 en combinación con anticuerpos anti-CD28. Para ello, purificamos mediante selección negativa linfocitos T CD3⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$, obteniendo eficiencias de purificación mayores del 96% (no mostrado). Estos linfocitos fueron marcados con *Cell Trace Violet* (CTV), e incubados (300.000 células/pocillo) durante 72 horas en medio completo de proliferación de células T, en ausencia o en presencia de los citados anticuerpos frente a CD3 y CD28. Las células fueron recogidas a tiempo 0 y a las 72 horas de incubación, y analizadas mediante citometría de flujo para detectar la señal máxima del CTV, y el marcaje final, respectivamente. A medida que las células proliferan y se dividen, pierden marcaje del CTV, que se reparte entre las células hijas, por lo que la intensidad de fluorescencia disminuye en cada ciclo de división celular. Los resultados mostraron que las células CD3⁺ de ratones ICAP-1$^{+/+}$ proliferan y presentan diversas rondas de división en presencia de anticuerpos αCD3+CD28, mientras que las células CD3⁺ de ratones ICAP-1$^{-/-}$ presentan una marcada reducción de su proliferación y división, lo que se tradujo en un menor índice de su proliferación comparado con el de los ratones control (**Figura 36**).

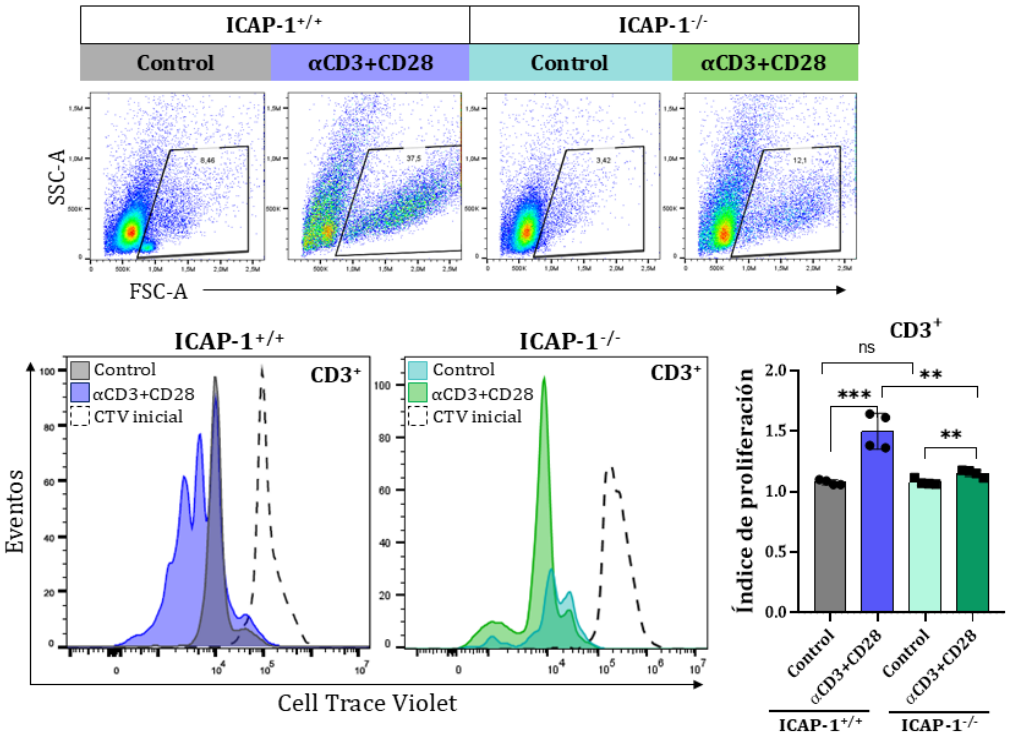


Figura 36. Análisis de la proliferación *in vitro* de linfocitos T CD3⁺. (Superior) *Dot plots* representativos del análisis mediante citometría de flujo de células CD3⁺ purificadas de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ marcadas con *Cell Trace Violet* (CTV), tras 72 horas de proliferación en ausencia (control) o en presencia de anticuerpos αCD3+CD28. En los histogramas (inferior izquierda) se muestra la señal máxima de CTV a tiempo cero (CTV inicial), y el marcaje en ausencia o presencia del estímulo. En las gráficas de barras (inferior derecha), se muestra el índice de proliferación (n=4 ratones), (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01).

Puesto que los linfocitos CD3⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ proliferan en menor medida que los de los ratones control, decidimos analizar posibles alteraciones de su ciclo celular. Los linfocitos CD3⁺ fueron incubados durante 72 h en ausencia o en presencia de anticuerpos αCD3+CD28, y posteriormente analizamos mediante citometría de flujo la proporción de las fases G1, S y G2/M del ciclo celular. Los resultados revelaron una reducción significativa de la frecuencia de células CD3⁺ en la fase G2/M de los ratones ICAP-1$^{-/-}$ tras estimulación en comparación con los linfocitos control (**Figura 37**).

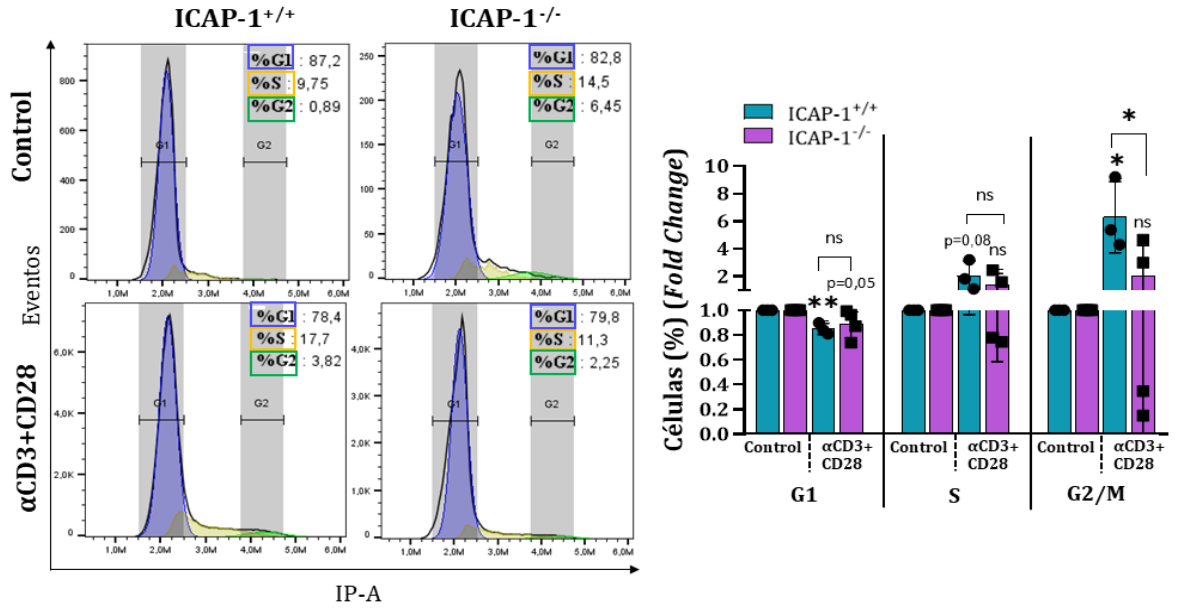


Figura 37. Análisis del ciclo celular de linfocitos T estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Linfocitos CD3⁺ purificados de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron incubados en

ausencia (control) o en presencia de anticuerpos αCD3+CD28, analizándose posteriormente el ciclo celular mediante citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos (izquierda), y la cuantificación de las fases G1, S y G2/M (derecha), (ns, no significativo, ** p<0.01, *p<0.05).

A continuación investigamos si la disminución de la proliferación de los linfocitos $CD3^+$ de bazo de ratones ICAP-$1^{-/-}$ afecta de modo similar o diferencial a las poblaciones de células $CD4^+$ y $CD8^+$. Esplenocitos totales marcados con CTV se incubaron durante 72 horas en ausencia o en presencia de anticuerpos αCD3+CD28. Las células fueron recogidas e incubadas con anticuerpos anti-CD4-FITC y anti-CD8-PE para el análisis mediante citometría de flujo del marcaje de CTV a tiempo 0 (señal máxima), y tras 72 horas de incubación. Tanto los linfocitos $CD4^+$ como los linfocitos $CD8^+$ presentaron una reducción de los niveles de CTV tras la estimulación, lo que indica que ha habido proliferación celular (**Figura 38A**). El análisis del índice proliferativo reveló que los linfocitos $CD8^+$ de bazos de ratones ICAP-$1^{-/-}$ presentan una disminución de la proliferación en comparación con los ratones control, mientras que no se detectaron cambios significativos en las células $CD4^+$ de ratones deficientes en ICAP-1 (**Figura 38B**).

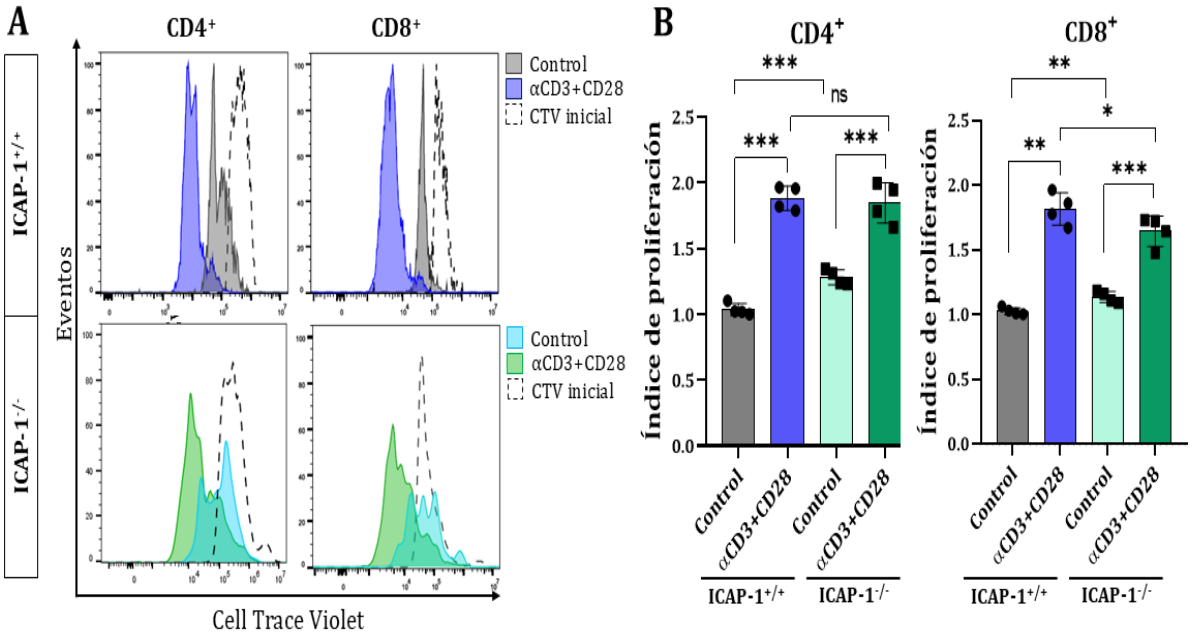


Figura 38. Análisis de la proliferación *in vitro* de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$. Los linfocitos de bazos de ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ marcados con CTV fueron incubados durante 72 h en ausencia (control) o en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. El índice de proliferación de células $CD4^+$ y $CD8^+$ fue determinado por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos (**A**), y cuantificación de los resultados (**B**), (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

Como modelo de análisis *in vitro* del grado de apoptosis celular, incubamos esplenocitos de ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ en medio RPMI-1640 en ausencia o en presencia de FBS 10%. Los análisis mediante citometría de flujo del nivel de apoptosis tardía en ausencia de suero, utilizando los marcadores AnexinaV-FITC y DAPI, revelaron niveles de apoptosis similares en las células $CD3^+$ deficientes en ICAP-1 y en las células control (**Figuras 39** y **40**). Conjuntamente con los datos de apoptosis *in situ* (**Figura 35**), estos resultados indican que la ausencia de ICAP-1 no se asocia a un aumento de la apoptosis de linfocitos T.

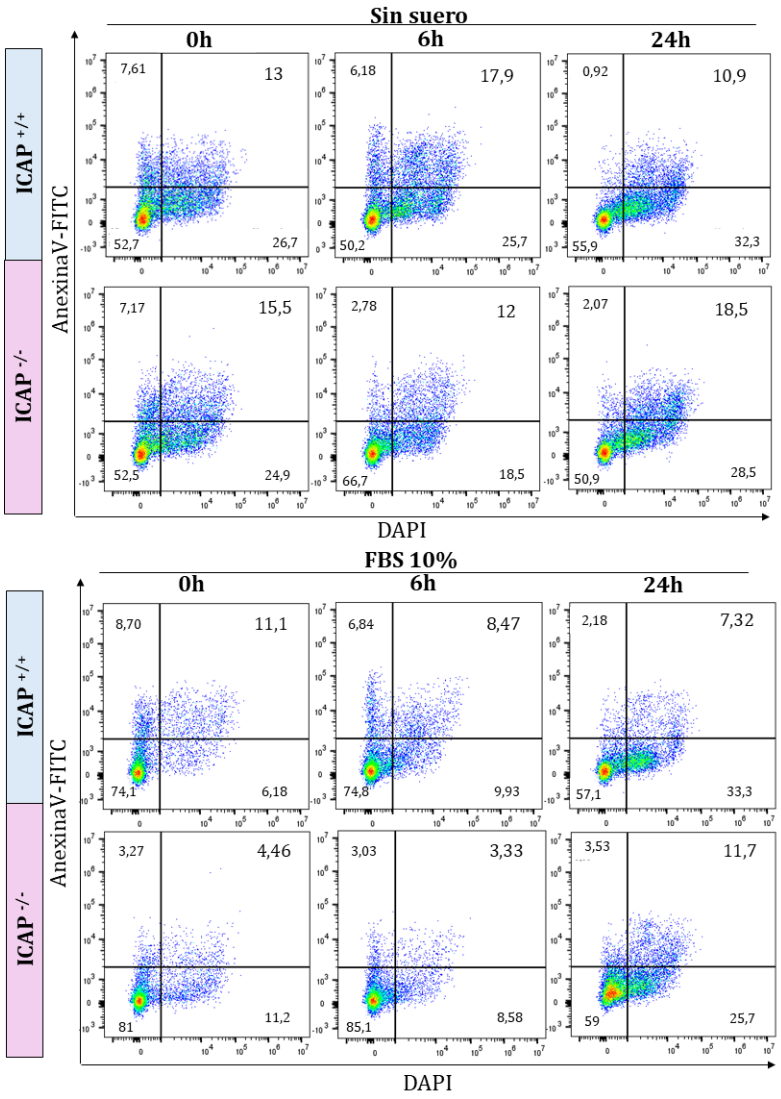


Figura 39. Análisis de la apoptosis *in vitro* de células CD3⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. *Dot plots* representativos del análisis por citometría de flujo de células CD3⁺ marcadas con anti-CD3-PeCy7, tras su incubación durante los tiempos indicados en medio RPMI-1640 sin suero o con FBS 10%. Se distinguen células vivas (AnexinaV⁻ DAPI⁻), células apoptóticas (AnexinaV⁺DAPI⁻), células apoptóticas tardías (AnexinaV⁺DAPI⁺) y células necróticas (AnexinaV⁻DAPI⁺), (n=4 ratones).

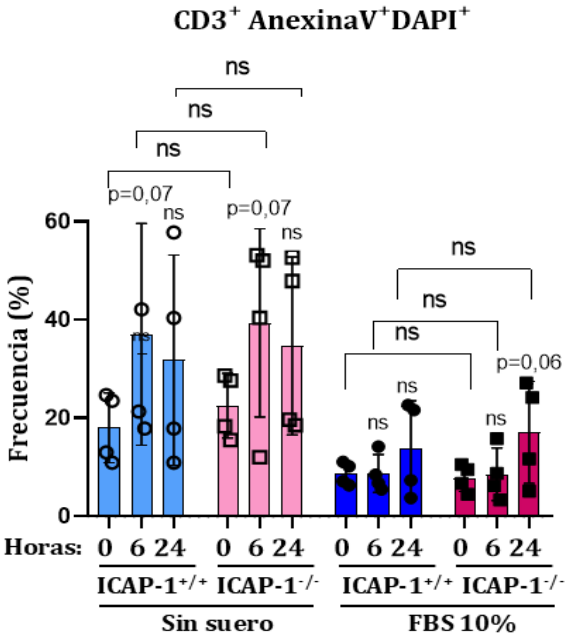


Figura 40. Cuantificación de la apoptosis *in vitro* de células CD3⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Cuantificación de la frecuencia de las células CD3⁺ apoptóticas tardías (AnexinaV⁺DAPI⁺), incubadas durante los tiempos indicados en ausencia o en presencia de FBS 10% (n=4), (ns, no significativo).

2.3. Análisis de la activación de linfocitos T deficientes en ICAP-1

El reconocimiento de péptidos acoplados al MHC por parte del TCR desencadena una cascada de señalización que implica la activación de diversas proteínas tirosín quinasas, las cuales fosforilan y activan a CD3 en el complejo TCR/CD3 (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Brownlie & Zamoyska, 2013; Cantrell, 2015). Para estudiar si la señalización dependiente del TCR pudiera estar alterada en linfocitos T de ratones ICAP-1$^{-/-}$, analizamos en primer lugar si la falta de ICAP-1 afecta a estadíos tempranos de la activación de células T, utilizando el anticuerpo anti-CD3ε APA1/1, el cual reconoce un epítopo de la cadena CD3ε que queda expuesto tras estimulación del TCR (Risueño *et al.*, 2005). Para ello, purificamos mediante selección negativa linfocitos CD3$^+$ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$, los cuales fueron estimulados con anticuerpos αCD3 o αCD3+CD28, y posteriormente permeabilizados e incubados con el anticuerpo APA1/1, analizándose finalmente mediante citometría de flujo. Estos análisis mostraron un aumento del marcaje con este anticuerpo tras la estimulación, tanto en linfocitos control como en los linfocitos deficientes en ICAP-1, si bien detectamos una menor inducción del epítopo de CD3ε reconocido por APA1/1 en los linfocitos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ (**Figura 41**).

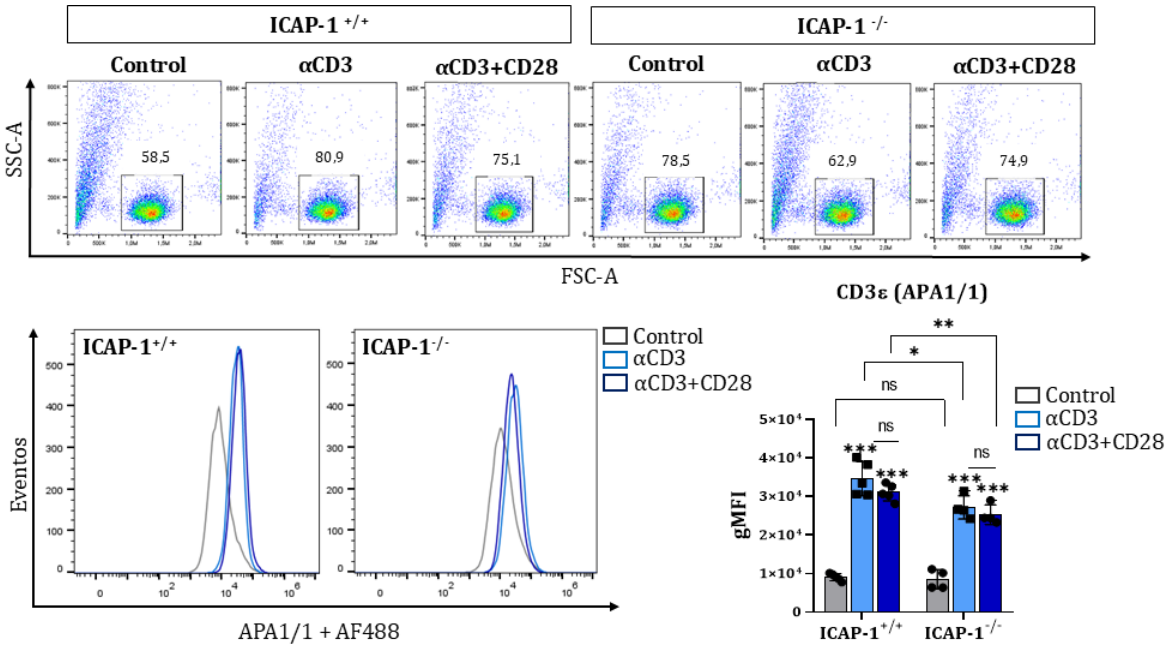


Figura 41. Análisis del marcaje de linfocitos CD3$^+$ con el anticuerpo anti-CD3$_\varepsilon$ APA1/1. Los linfocitos CD3$^+$ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron incubados durante 6 min en ausencia (control) o en presencia de anticuerpos αCD3 o αCD3+CD28, y posteriormente analizados mediante citometría de flujo con el anticuerpo APA1/1. Se muestran *dot plots* e histogramas representativos (superior e inferior izquierda), y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI; inferior derecha), (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

Tras la activación del complejo TCR/CD3, tiene lugar la activación de otras proteínas como ZAP-70 (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Brownlie & Zamoyska, 2013; Au-Yeung *et al.*, 2018). Para investigar si ICAP-1 afecta a la activación de ZAP-70, analizamos los niveles de su fosforilación en respuesta a anticuerpos αCD3+CD28. Sin embargo, aunque detectamos claramente la expresión de ZAP-70 total (anticuerpo de Invitrogen/eBioscience; no mostrado), no obtuvimos una detección eficiente y consistente de la fosforilación de ZAP-70 en el rango de 0-10 min (Phospho-ZAP-70, Tyr319; Syk Tyr 352; Cell Signaling; no mostrado).

La activación de Akt y ERK1/2 regula la supervivencia y la proliferación celular, y son eventos asociados a la señalización del TCR (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Brownlie & Zamoyska,

2013; Cantrell, 2015). Para estudiar la activación de Akt y ERK1/2, purificamos mediante selección negativa linfocitos CD3⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$, los cuales fueron incubados en ausencia o en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, analizando a continuación el grado de fosforilación de Akt y ERK1/2 mediante *Western blotting*. Los resultados mostraron que sus niveles de fosforilación tras estimulación fueron similares en los linfocitos CD3⁺ control y deficientes en ICAP-1 (**Figura 42**).

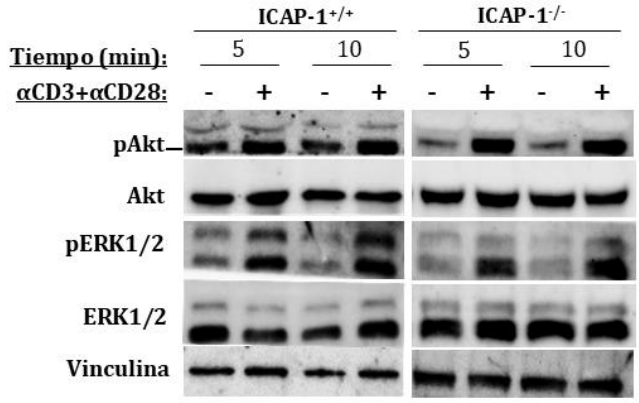


Figura 42. Análisis de la activación de Akt y ERK1/2 tras estimulación de linfocitos CD3⁺. Los linfocitos CD3⁺ purificados de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron incubados a diferentes tiempos en ausencia (-) o en presencia de αCD3+CD28 (+), y posteriormente sometidos a ensayos de *Western blotting*. Se muestra un resultado representativo (n=3).

Otro de los eventos asociados a la estimulación del TCR es la inducción de la expresión del marcador de activación CD69 (Testi *et al.*, 1994; Cibrián & Sánchez-Madrid, 2017), por lo que analizamos su expresión en linfocitos T. Linfocitos CD3⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ purificados mediante selección negativa fueron incubados en ausencia o en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, y posteriormente comparamos la expresión de CD69 por citometría de flujo en la población total CD3⁺ y en las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺. La cuantificación de la fluorescencia reveló un aumento significativo de la expresión de CD69 tras estimulación en las tres poblaciones celulares en ambos grupos de ratones (**Figura 43**). Mientras que no observamos grandes diferencias en la expresión de CD69 en linfocitos CD4⁺ estimulados entre los ratones ICAP-1$^{-/-}$ e ICAP-1$^{+/+}$, detectamos que el aumento de expresión de CD69 tanto en los linfocitos CD8⁺ como en la población total CD3⁺ de ratones deficientes en ICAP-1 fue superior a la de los ratones ICAP-1$^{+/+}$ (**Figura 43**).

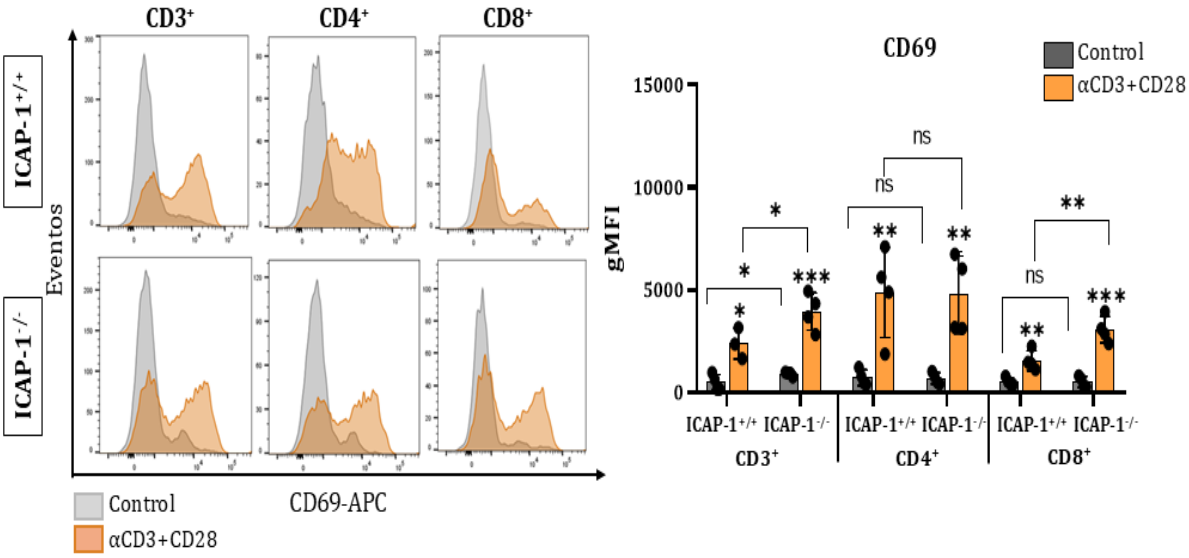


Figura 43. Análisis de la expresión de CD69 en linfocitos T estimulados. Linfocitos CD3⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron incubados durante 24 h en ausencia (control) o en presencia de anticuerpos αCD3+CD28, y posteriormente analizados mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-CD3-PeCy7, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE y anti-CD69-APC. Se muestran histogramas representativos (izquierda), y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI; derecha), (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

CD5 es una glicoproteína de membrana que regula negativamente la activación de linfocitos T mediante la atenuación de la señalización del TCR (Azzam *et al*., 1998; Pérez-Villar *et al.*, 1999; Cho & Sprent, 2018; Voisinne *et al*., 2018). En base a estos datos, decidimos analizar la expresión de CD5 en linfocitos T de ratones deficientes en ICAP-1. Para ello, las células T de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3-PeCy7, anti-CD4-FITC y anti-CD8-PE, y a continuación se analizó la expresión de CD5 mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que los niveles de expresión de CD5 son ligeramente superiores en los linfocitos CD4$^+$ y CD8$^+$ de ratones ICAP-1$^{-/-}$ que los de los ratones control (**Figura 44**).

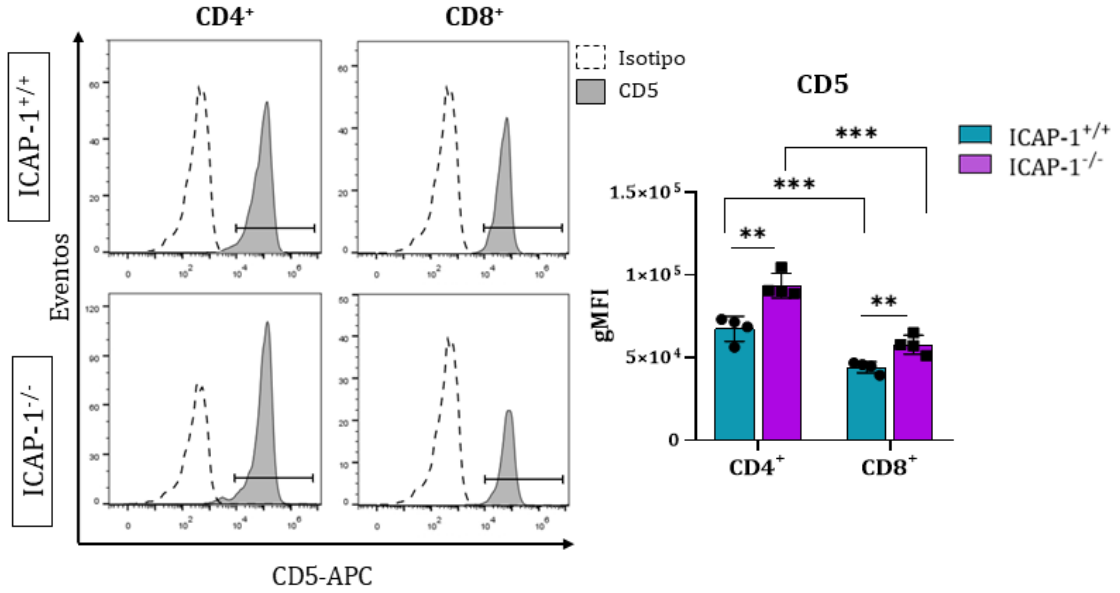


Figura 44. Expresión de CD5 en linfocitos CD4$^+$ y CD8$^+$ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD5 en las poblaciones CD4$^+$ y CD8$^+$ (izquierda), y la cuantificación de su intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI; derecha), (***p<0.001, **p<0.01).

2.4. Análisis de la expresión de moléculas de migración en linfocitos T de ratones deficientes en ICAP-1

Otra de las posibles razones de la disminución de células CD8$^+$ en bazos y LNs de ratones ICAP-1$^{-/-}$ podría basarse en alteraciones en la expresión de moléculas implicadas en la adhesión y migración linfocitaria que se tradujera en un tráfico y posicionamiento anómalo de los linfocitos. Resultados anteriores mostraron niveles normales de linfocitos CD4$^+$ y CD8$^+$ en sangre periférica de ratones ICAP-1$^{-/-}$ (Tesis Doctoral, Silvia Sevilla Movilla, 2019), sugiriendo que no se habría producido una emigración anómala desde estos OLS al torrente circulatorio.

Para estudiar si la ausencia de ICAP-1 pudiera afectar a la expresión de receptores de quimioquinas que causara una alteración del tráfico linfocitario hacia o en el interior de los OLS, comparamos la expresión de CXCR4 y CCR7 en linfocitos CD4$^+$ y CD8$^+$ de bazos y LNs de ratones control y deficientes en ICAP-1. Las poblaciones linfocitarias de ambos OLS fueron marcadas con anticuerpos anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, y posteriormente analizadas por citometría de flujo para determinar la expresión de CXCR4 y CCR7, utilizando anticuerpos anti-CXCR4-APC o anti-CCR7-APC. En el caso de CXCR4, los resultados mostraron una disminución de su expresión en células CD4$^+$, tanto de bazo como de LNs, de ratones ICAP-1$^{-/-}$ en comparación con las células control, mientras que no observamos alteraciones de su expresión en células CD8$^+$ (**Figuras 45** y **46**). En cuanto a CCR7, su expresión fue comparable

en esplenocitos CD4⁺ de los ratones ICAP-1$^{-/-}$ e ICAP-1$^{+/+}$, y no detectamos su expresión en linfocitos CD8⁺ (**Figura 47**). Los linfocitos T de LNs mostraron una ausencia de expresión de CCR7 tanto en ratones control como en ratones deficientes para ICAP-1 (no mostrado).

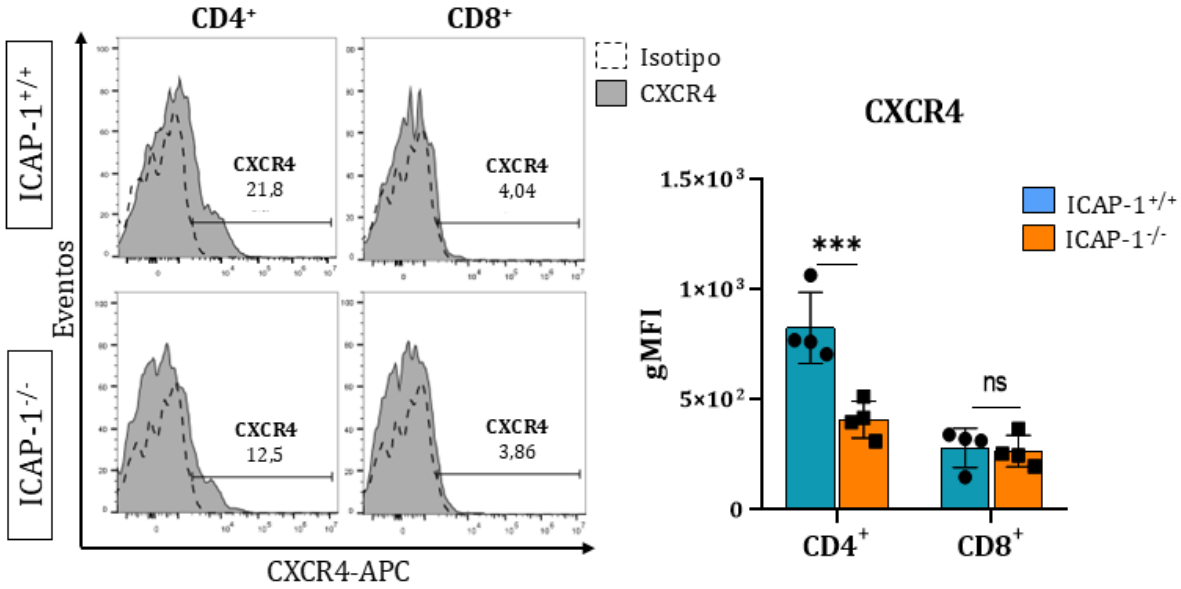


Figura 45. Expresión de CXCR4 en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Se muestran histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de CXCR4 en las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ de bazo (izquierda), y la cuantificación de su intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI; derecha), (ns, no significativo, ***p<0.001).

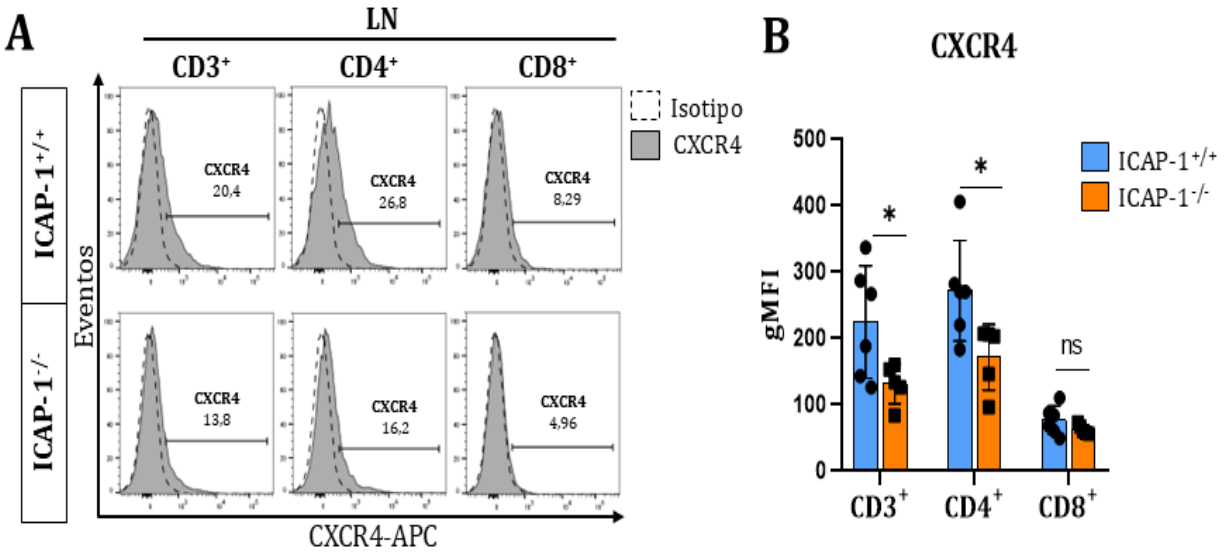


Figura 46. Expresión de CXCR4 en linfocitos T de LNs de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (**A**) Se muestran histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de CXCR4 en las poblaciones indicadas. (**B**) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) de CXCR4 en cada una de las poblaciones (ns, no significativo, *p<0.05).

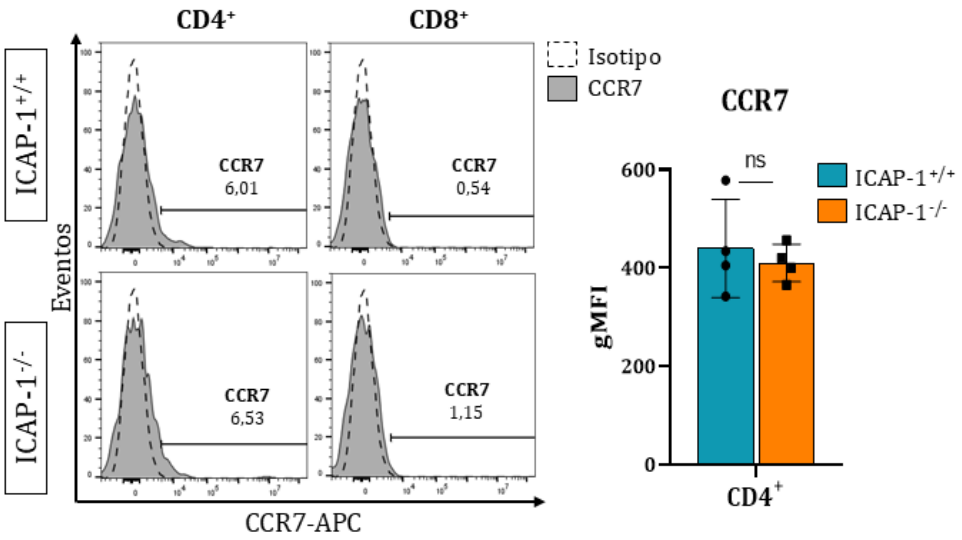


Figura 47. Expresión de CCR7 en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Se muestran histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de CCR7 en las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ (izquierda). En el panel de la derecha se representa la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) de la población CD4⁺ (ns, no significativo).

Asimismo, analizamos los niveles de expresión de S1PR1 en ratones deficientes en ICAP-1. S1PR1 es un receptor presente en linfocitos que responde a gradientes de concentración de S1P, permitiendo la emigración de los linfocitos hacia sangre y linfa, tanto desde el timo como desde los OLS (Davis & Kehrl, 2009; Cyster & Schwab, 2012). Los resultados indicaron niveles comparables de expresión de S1PR1 en linfocitos T de LNs de ratones control e ICAP-1$^{-/-}$ (**Figura 48**).

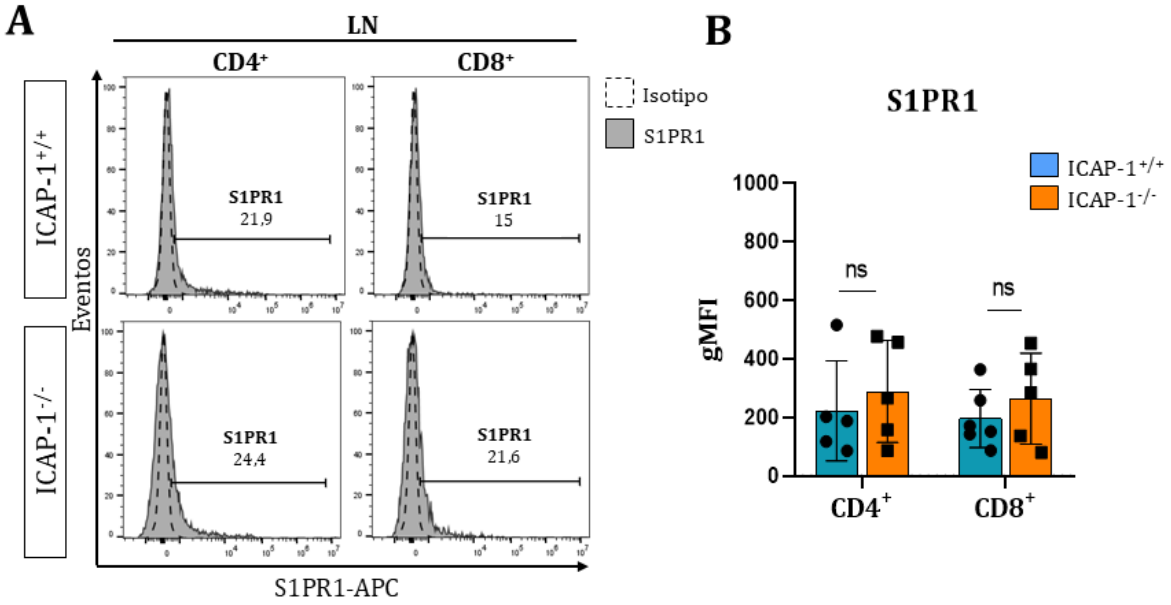


Figura 48. Expresión de S1PR1 en linfocitos T de LNs de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (**A**) Se muestran histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de S1PR1 en las poblaciones celulares indicadas. (**B**) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) de S1PR1 (ns, no significativo).

Por otro lado, aunque el receptor de quimioquinas CXCR5 se expresa principalmente en células B (Förster *et al.*, 1996; Ansel *et al.*, 2000) se expresa asimismo en los linfocitos T *helper* foliculares localizados en el interior de los folículos de los centros germinales de los LNs (Förster *et al.*, 1996; Crotty *et al.*, 2014). El análisis de la expresión de CXCR5 en

linfocitos T de LNs reveló que la ausencia de ICAP-1 no se traduce en alteraciones de su expresión (**Figura 49**).

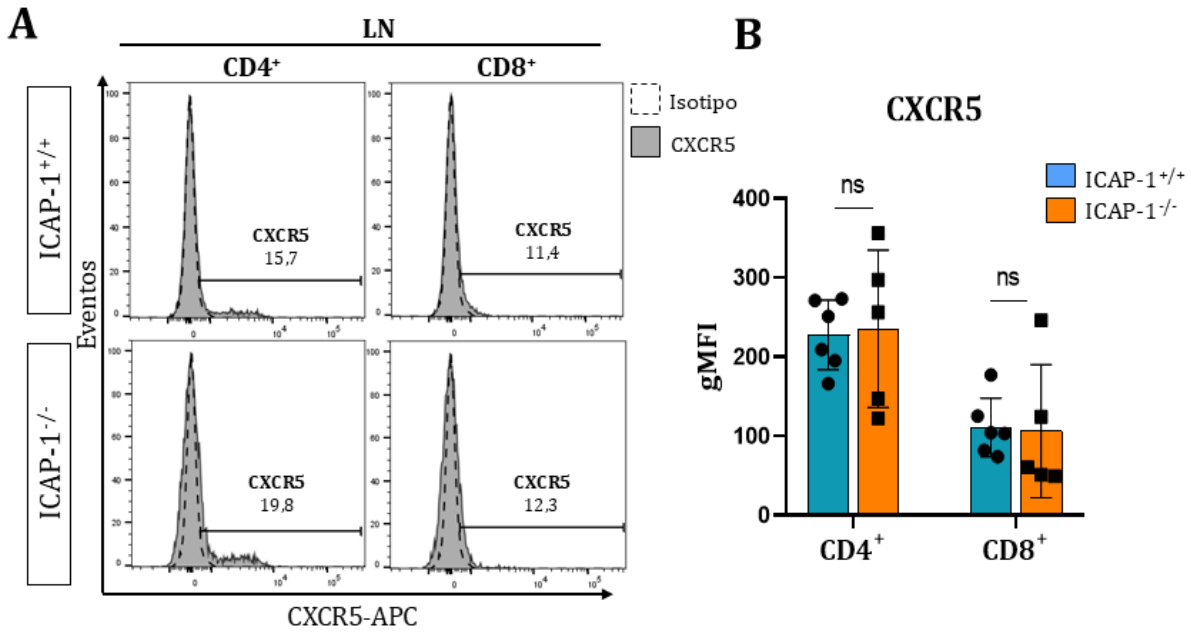


Figura 49. Expresión de CXCR5 en linfocitos T de LNs de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (**A**) Se muestran histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de CXCR5 en las poblaciones celulares indicadas. (**B**) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) de CXCR5 (ns, no significativo).

Puesto que ICAP-1 puede unirse a las secuencias NPxY del dominio citoplásmico de la subunidad β1 de las integrinas, e inhibir su activación posiblemente por competición con las proteínas activadoras talina y kindlin-3 (Bouvard *et al.,* 2003; Calderwood, 2004; Bouvard *et al.*, 2006; Rognoni *et al.*, 2016), habíamos estudiado previamente si la falta de ICAP-1 pudiera alterar la expresión de la subunidad β1. Los resultados mostraron que la ausencia de ICAP-1 no afecta significativamente a la expresión de β1 en las poblaciones CD4$^+$ y CD8$^+$ de linfocitos de bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ (Tesis Doctoral, Silvia Sevilla Movilla, 2019; Sevilla-Movilla *et al.*, 2022). Asimismo, mostramos anteriormente que las células CD3$^+$ purificadas de bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ presentan mayor adhesión al fragmento CS-1 de la fibronectina (CS-1/FN) y a VCAM-1, ambos ligandos de la integrina α4β1, que las células CD3$^+$ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ (Sevilla-Movilla *et al.*, 2022).

2.5. Distribución de células B periféricas en ratones deficientes en ICAP-1

En estudios previos habíamos mostrado una reducción en el número de linfocitos B B220$^+$ en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$, si bien la frecuencia de esta población celular fue comparable con la de los ratones control (Tesis Doctoral, Sevilla-Movilla, 2019; Sevilla-Movilla *et al.*, 2022). Los linfocitos inmaduros B220$^+$CD93$^+$ migran desde la MO al bazo, completando en este órgano linfoide secundario su proceso de maduración (Allman *et al.*, 2001; Allman & Pillai, 2008). Para estudiar si la falta de ICAP-1 altera a la población de células B inmaduras recién migradas al bazo, comparamos mediante citometría de flujo la expresión de CD93 en células B220$^+$ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Estos análisis mostraron que no existían diferencias significativas en el número ni en la proporción de células B inmaduras B220$^+$CD93$^+$ en los ratones ICAP-1$^{-/-}$ (**Figura 50**).

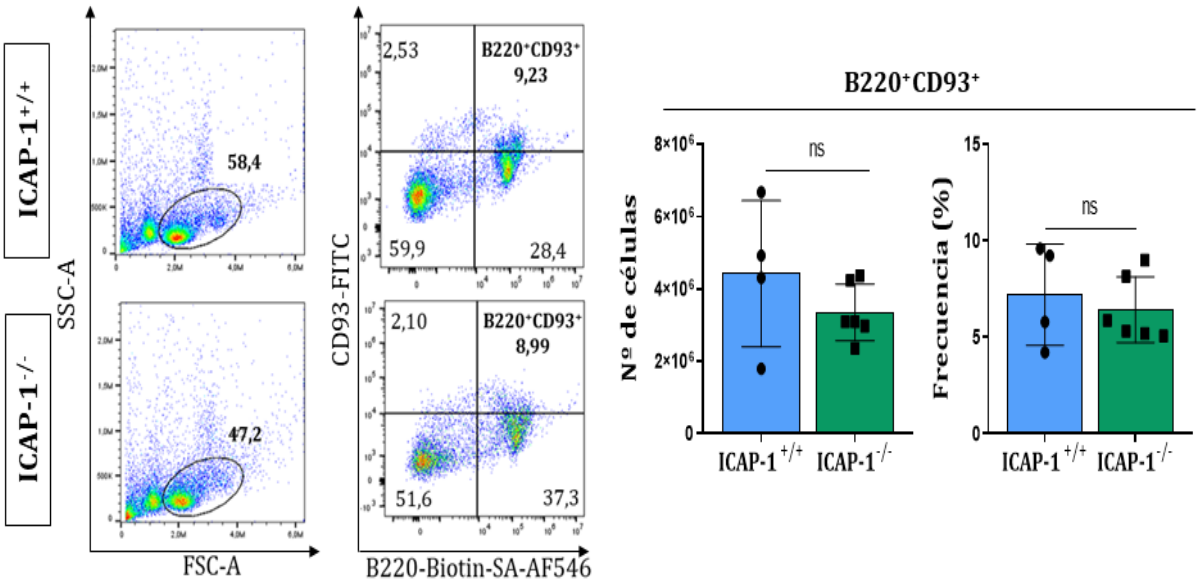


Figura 50. Análisis de las células B inmaduras B220⁺CD93⁺ en bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Se muestran *dot plots* representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de CD93 en la población B220⁺ (izquierda), y la cuantificación de estos análisis (derecha), (ns, no significativo).

Antes de la maduración final de células B en el bazo, se han definido diferentes estadíos transicionales: T1, T2 y pre-MZB (Loder *et al.*, 1999; Srivastava *et al.*, 2005; Allman & Pillai, 2008; Pillai & Cariappa, 2009). Las células B maduras engloban las células foliculares (FOB) y las células marginales (MZB). Las células foliculares se localizan en la región central del folículo (Allman & Pillai, 2008; Pillai & Cariappa, 2009; Boothby *et al.*, 2019), mientras que las células MZB se localizan en el seno marginal (Martin & Kearny, 2002; Mebius & Kraal, 2005; Pillai *et al.*, 2005), separadas de las células FOB por un anillo de macrófagos metalofílicos (Mebius & Kraal, 2005; Borges *et al.*, 2015). Para investigar si la falta de ICAP-1 afecta a la distribución de las diferentes subpoblaciones de células B durante su maduración en el bazo, analizamos mediante citometría de flujo las distintas poblaciones transicionales y maduras a partir de esplenocitos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Así, pudimos distinguir las poblaciones T1 (IgM^{high}IgD^{-}CD21^{-}CD23^{-}CD1d^{low}), T2 (IgM^{high}IgD^{low}CD21^{-}CD23^{+}CD1d^{low}) y pre-MZB (IgM^{high}IgD^{high}CD21^{high}CD23^{+}CD1d^{high}), y las poblaciones maduras FOB (IgM^{med}IgD^{high}CD21^{med}CD23^{+}) y MZB (IgM^{high}IgD^{low}CD21^{high}CD23^{-}) (**Figura 51**). Como ya habíamos documentado anteriormente (Sevilla-Movilla *et al.*, 2022), los resultados confirmaron una reducción de la proporción de células MZB en ratones ICAP-1$^{-/-}$ en comparación con los ratones ICAP-1$^{+/+}$ (**Figura 52**). Notablemente, dicha reducción se correlacionó con un aumento significativo de la frecuencia de la población precursora pre-MZB (**Figura 52**). No hallamos diferencias remarcables en las proporciones de las subpoblaciones T1, T2 y FOB entre bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. El análisis del número celular reveló que las subpoblaciones T1, T2, FOB y MZB presentaban una disminución en los ratones deficientes en ICAP-1, mientras que el número de células de la población pre-MZB fue similar en bazos ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ (**Figura 52**).

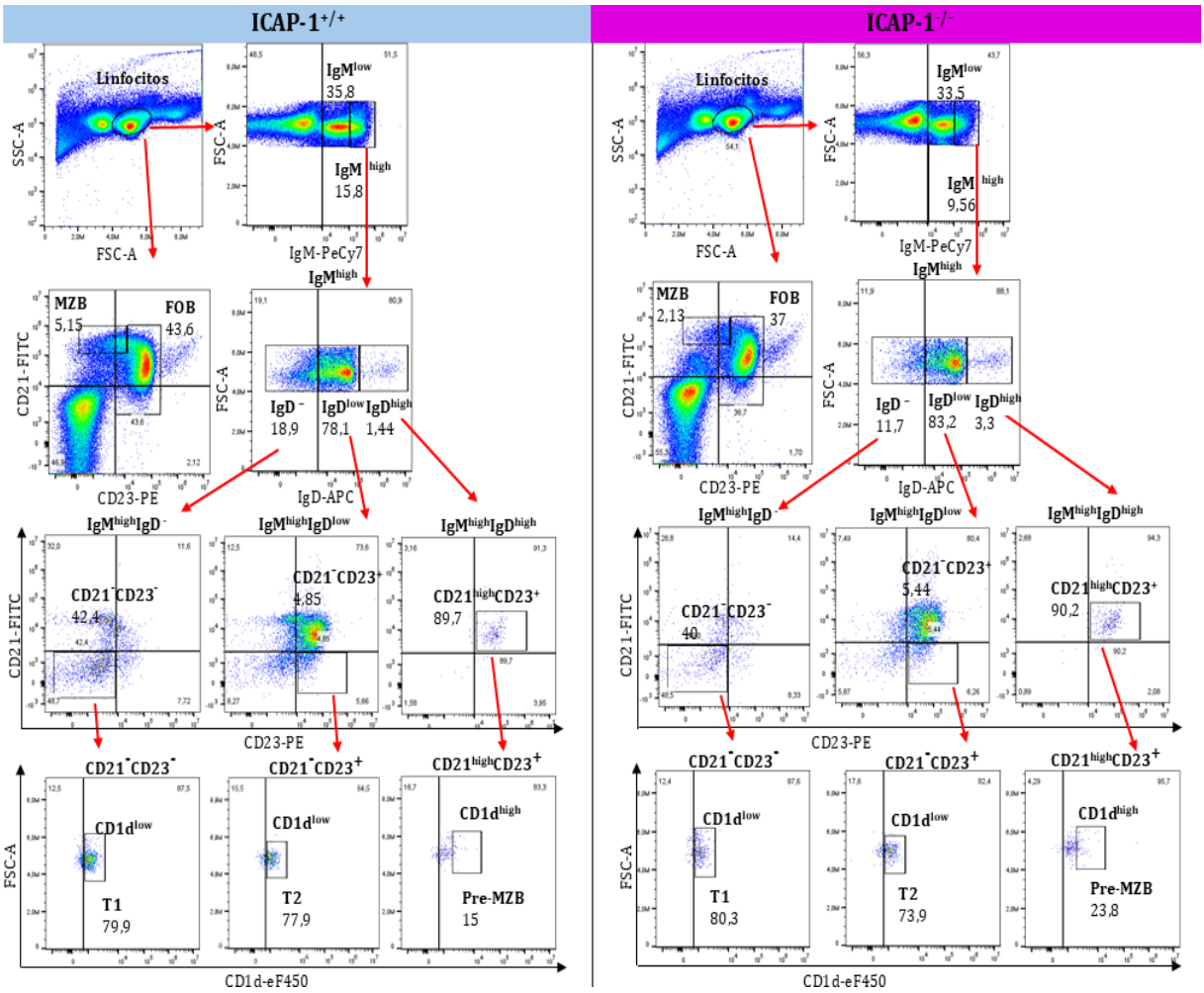


Figura 51. Estrategia de *gating* de las poblaciones de linfocitos B transicionales y maduros en bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Ejemplo representativo de la estrategia de selección por citometría de flujo de las poblaciones transicionales T1, T2 y pre-MZB, y de las poblaciones maduras FOB y MZB.

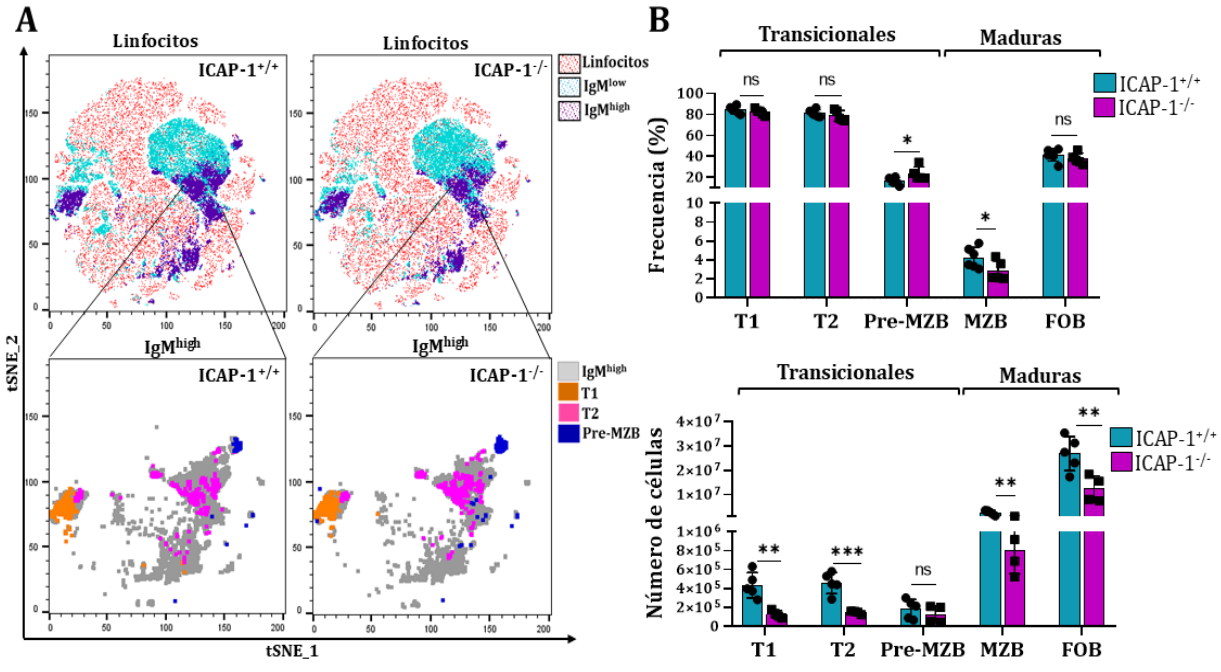


Figura 52. Cuantificación de las poblaciones transicionales y maduras de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (**A**) Mapa de puntos de datos agrupados de células con fenotipo similar obtenido

por citometría de flujo con el algoritmo de reducción dimensional t-SNE (*t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*). Se muestra la población total de linfocitos (puntos rojos), donde distinguimos la población IgM^{low} (azul) e IgM^{high} (morado). Dentro de la población IgM^{high} (puntos grises), distinguimos la población T1 (naranja), T2 (magenta) y pre-MZB (azul oscuro). (**B**) Cuantificación de la frecuencia y número de células de cada una de las poblaciones (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

Para analizar la morfología de las células B y la estructura de los folículos de los bazos de ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$, realizamos experimentos de inmunofluorescencia. Las secciones de los bazos fueron incubadas con anticuerpos frente a IgD, IgM y frente a una proteína de diferenciación presente en los macrófagos metalofílicos del bazo (MOMA), con el fin de distinguir las regiones de los folículos. De esta forma, el anticuerpo anti-MOMA marca la corona de macrófagos metalofílicos y nos permite distinguir el seno marginal. Las imágenes de inmunofluorescencia mostraron que el número de folículos es similar entre los bazos de ratones ICAP-$1^{-/-}$ e ICAP-$1^{+/+}$, aunque observamos que el área de los folículos de los bazos deficientes en ICAP-1 era significativamente menor que el de los ratones control (**Figura 53A**). Sin embargo, la estructura global de los folículos no estaba alterada en los ratones deficientes en ICAP-1, y no hallamos alteraciones remarcables en la zona marginal cercana a la región MOMA-1^{+} de los macrófagos metalofílicos (**Figura 53B**).

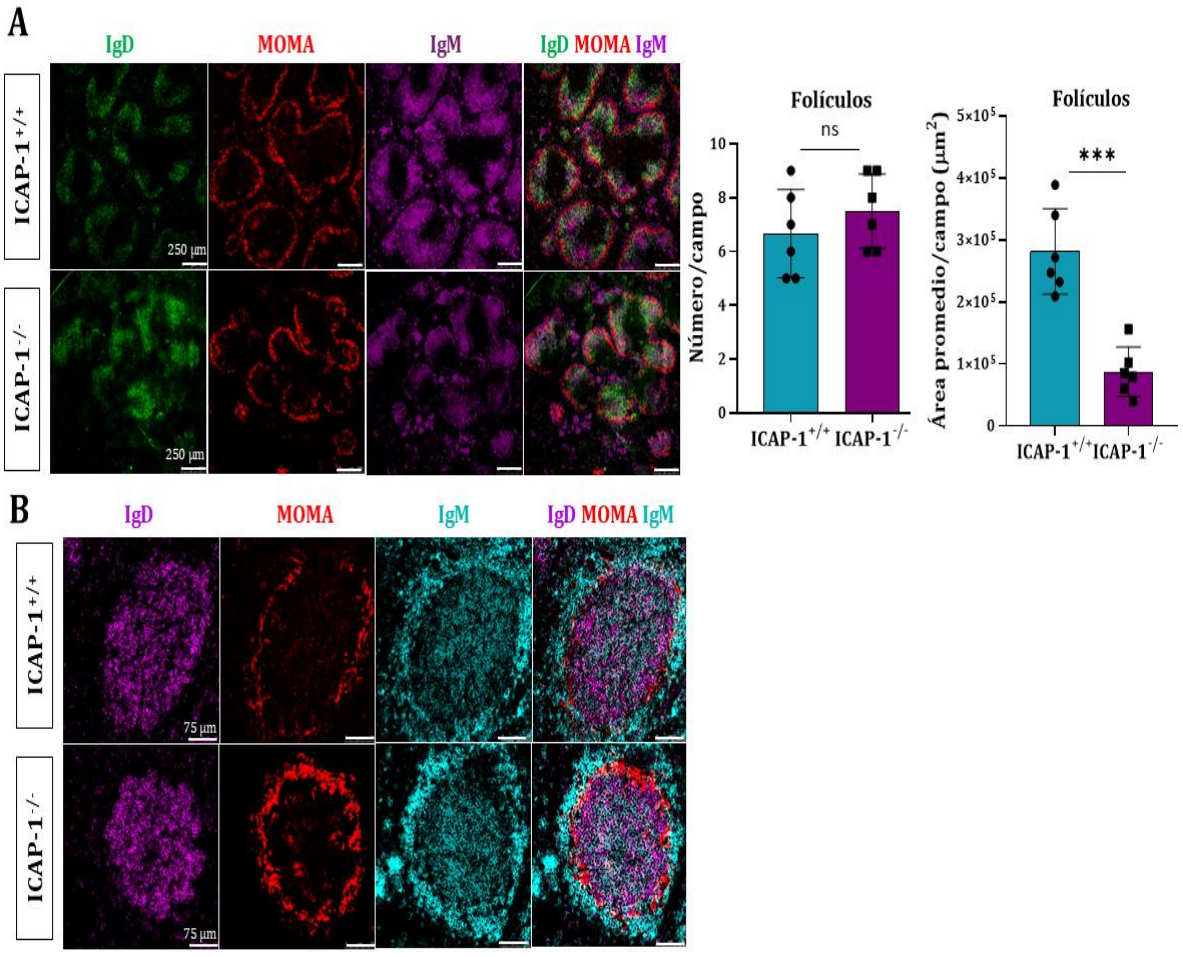


Figura 53. Análisis de los folículos de bazos de ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$. (**A**, Izquierda) Imágenes representativas de fluorescencia de folículos de bazos, detectados mediante anticuerpos anti-IgD-AF488, anti-MOMA-Biotina+*Streptavidin*-AF568 y anti-IgM-AF647. Barra de escala 250 µm. (Derecha) Cuantificación del número de folículos (n=3 ratones), y del área promedio de los folículos por campo de imagen (n=3 ratones). (**B**) Imágenes amplificadas de folículos, con una barra de escala de 75 µm (ns, no significativo, ***p<0.001).

Para analizar si la reducción de la población de células MZB en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ se debe a defectos intrínsecos de los linfocitos, realizamos experimentos con ratones quimeras. Los ratones huésped CD45.1 B6.SJL fueron irradiados letalmente, y posteriormente reconstituidos con células de la MO obtenidas de ratones donantes CD45.2/ICAP-1$^{+/+}$ o CD45.2/ICAP-1$^{-/-}$. Tras seis semanas analizamos la distribución de las poblaciones CD19^{+}, así como de las subpoblaciones FOB y MZB. Los resultados mostraron que los ratones huésped reconstituidos con células procedentes de ratones CD45.2/ICAP-1$^{-/-}$ presentan una frecuencia menor de células MZB que la de los ratones reconstituidos con células CD45.2/ICAP-1$^{+/+}$, mientras que la proporción de células FOB no estaba alterada (**Figura 54**). Estos datos indican que la disminución de células MZB en bazos de ratones deficientes en ICAP-1 implica defectos intrínsecos de los linfocitos, aunque no se puede descartar la contribución del microambiente no hematopoyético del bazo en esta disminución.

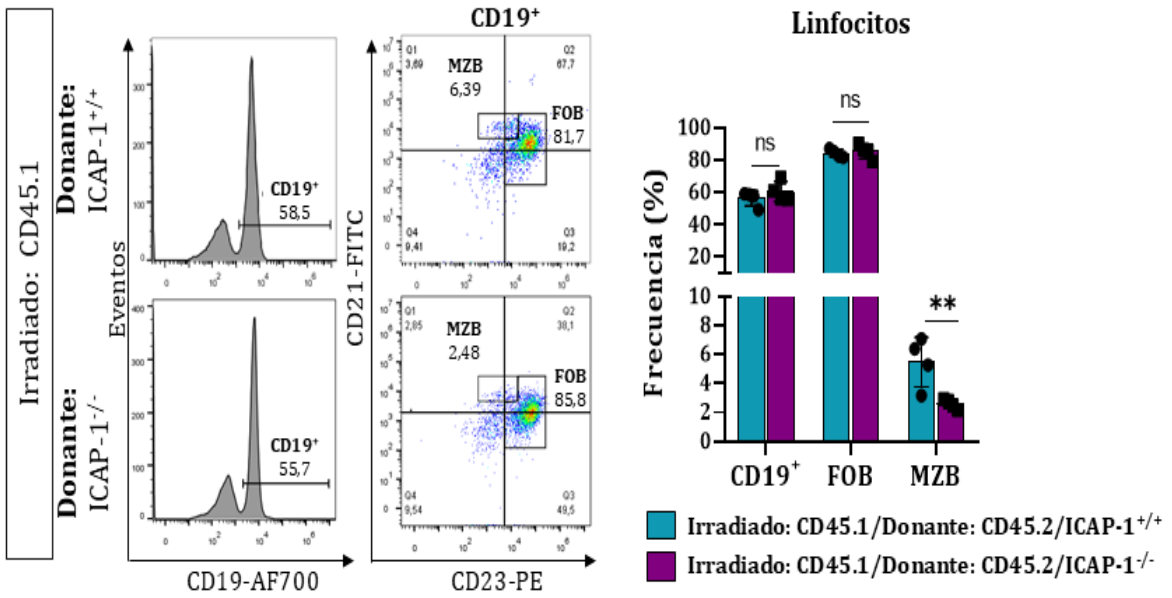


Figura 54. Cuantificación de las poblaciones CD19^{+}, FOB y MZB en bazos de ratones quimeras. Las células CD19^{+} de bazos de ratones CD45.1 reconstituidos con células de la MO de ratones CD45.2/ICAP-1$^{+/+}$ o CD45.2/ICAP-1$^{-/-}$ fueron seleccionadas mediante citometría de flujo, analizándose posteriormente la distribución de las poblaciones FOB y MZB con anticuerpos frente a CD21 y CD23 (ns, no significativo, **p<0.01).

2.6. Análisis de la proliferación y apoptosis de células B en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$

Una de las posibles causas de la reducción de la población de células MZB en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ podría estar basada en un defecto de su proliferación. Para estudiar si las células CD19^{+} de ratones deficientes en ICAP-1 presentan alteraciones en su proliferación, analizamos mediante inmunofluorescencia *in situ*, en secciones de bazos, el grado de expresión de Ki67 en estas células. Los resultados mostraron un menor número de células CD19^{+} positivas para Ki67 en los ratones ICAP-1$^{-/-}$ relativo a los ratones control (**Figura 55**). Asimismo, la cuantificación del porcentaje de proliferación reveló que las células CD19^{+} de los ratones mutantes presentan una marcada reducción de su proliferación *in situ*. Adicionalmente, obtuvimos una intensidad media de fluorescencia (MFI) del marcaje de Ki67 en los linfocitos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ menor que en los ratones ICAP-1$^{+/+}$ (**Figura 55**).

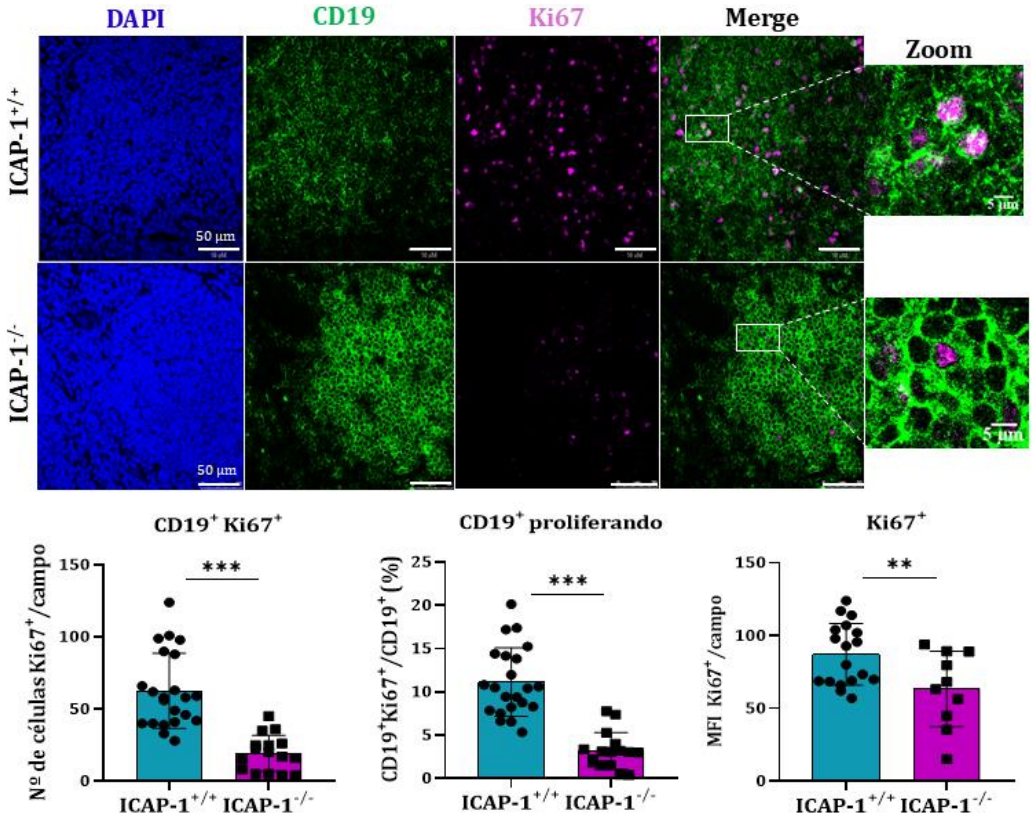


Figura 55. Análisis de la proliferación *in situ* de linfocitos CD19⁺. (Superior) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para analizar la expresión de Ki67 (anti-Ki67+AF647) en linfocitos CD19⁺ (anti-CD19+AF488), utilizando secciones de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Inferior) Se muestra la cuantificación de diferentes parámetros de las imágenes superiores (n=3 ratones). Barras de escala de 50 µm y 5 µm (*zoom*), (***p<0.001, **p<0.01).

En experimentos preliminares empleando anticuerpos anti-MOMA para delimitar la región folicular y la zona marginal, observamos un mayor número de células Ki67⁺ en el interior y en el exterior de la corona de macrófagos MOMA⁺ en los folículos de ratones control comparado con los ratones ICAP-1$^{-/-}$ (**Figura 56**). Serán necesarios futuros experimentos empleando anticuerpos para distinguir las poblaciones FOB y MZB con el fin de determinar específicamente la capacidad proliferativa de estas poblaciones en ratones que carecen de ICAP-1.

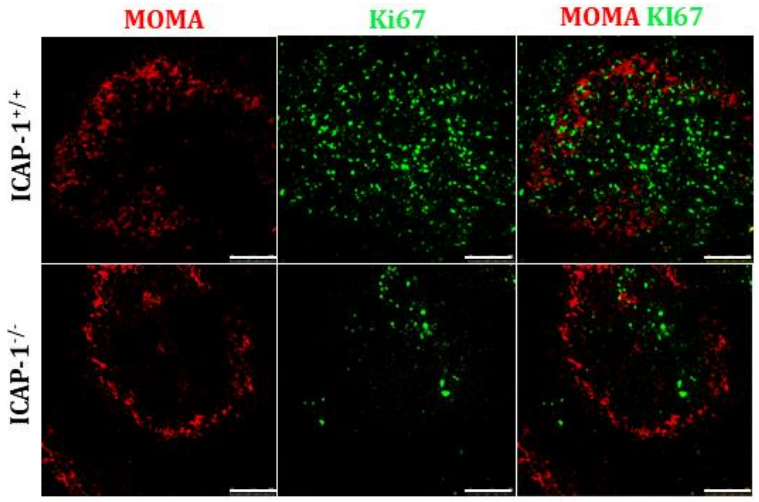


Figura 56. Análisis de la distribución de la proliferación en folículos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Imágenes representativas de inmunofluorescencia para analizar la expresión de Ki67 en los folículos (anti-MOMA-Biotina+*Streptavidin*-AF568), utilizando secciones de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ (n=3 ratones). Barras de escala de 75 µm.

Para investigar la posibilidad de que la reducción de la proliferación de las células B CD19⁺ en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ pudiera estar relacionada con un incremento de su apoptosis, realizamos ensayos TUNEL analizando el grado de apoptosis en linfocitos CD19⁺ de secciones de bazo. De modo similar a las células T, los resultados mostraron un menor número y porcentaje de linfocitos CD19⁺ positivos para TUNEL en ratones deficientes en ICAP-1 en comparación con los ratones control (**Figura 57**).

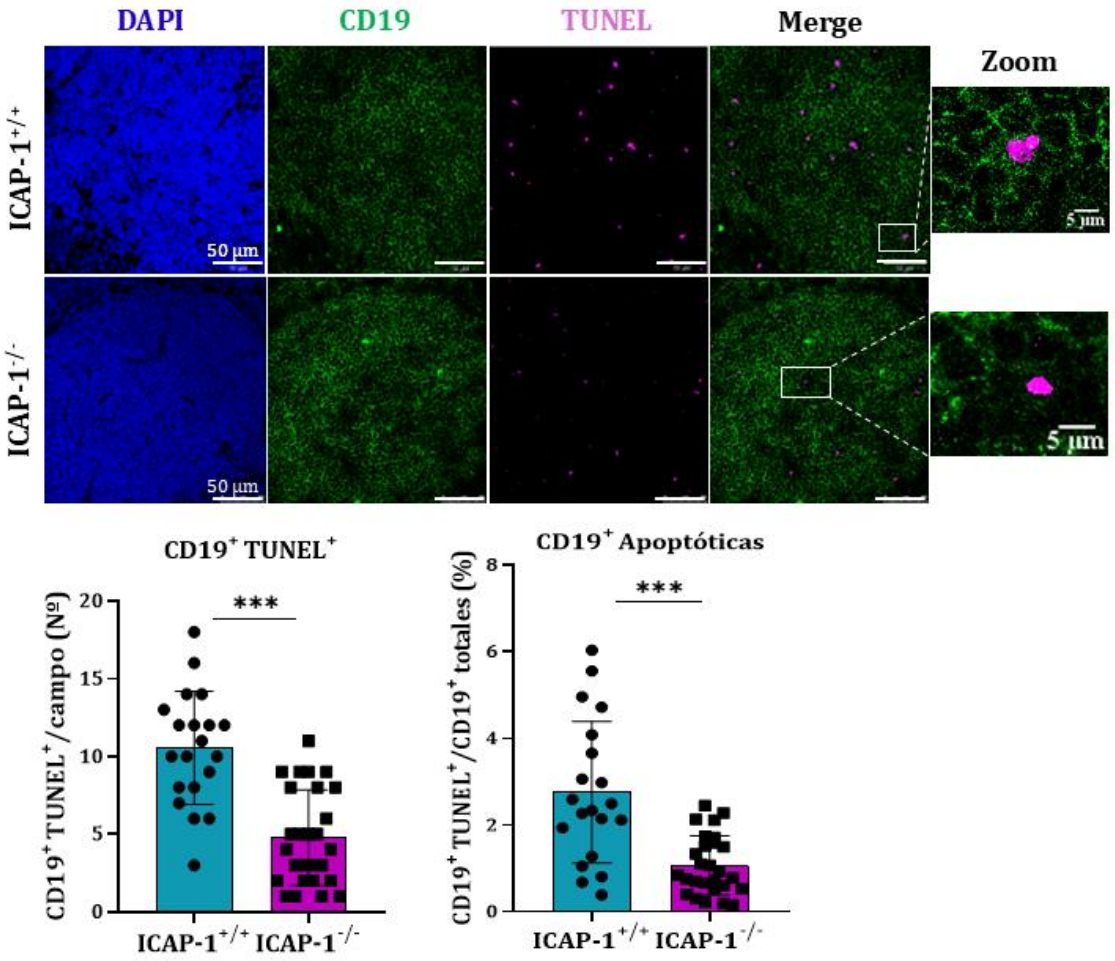


Figura 57. Análisis *in situ* de la apoptosis de linfocitos B CD19⁺. (Superior) Imágenes representativas de células CD19⁺ TUNEL⁺ (TUNEL-AF647) en secciones de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Inferior) Cuantificación del número y porcentaje de células CD19⁺TUNEL⁺ por campo de imagen de cada ratón (n=3-4 ratones). Barras de escala de 50 µm y 5 µm (*zoom*), (***p<0.001).

Para complementar estos experimentos, empleamos anticuerpos frente a CD19 y MOMA en secciones de bazos para distinguir las células CD19⁺TUNEL⁺ localizadas dentro y fuera de la región delimitada por los macrófagos metalofílicos. Los resultados mostraron de nuevo una menor cantidad de células CD19⁺TUNEL⁺, tanto en el interior como en el exterior de la corona de dichos macrófagos, en ratones deficientes en ICAP-1 comparado con los ratones control (**Figura 58**). En conjunto, estos datos indican que la disminución de la proliferación de células B CD19⁺ deficientes en ICAP-1 no se asocia con un incremento de su apoptosis.

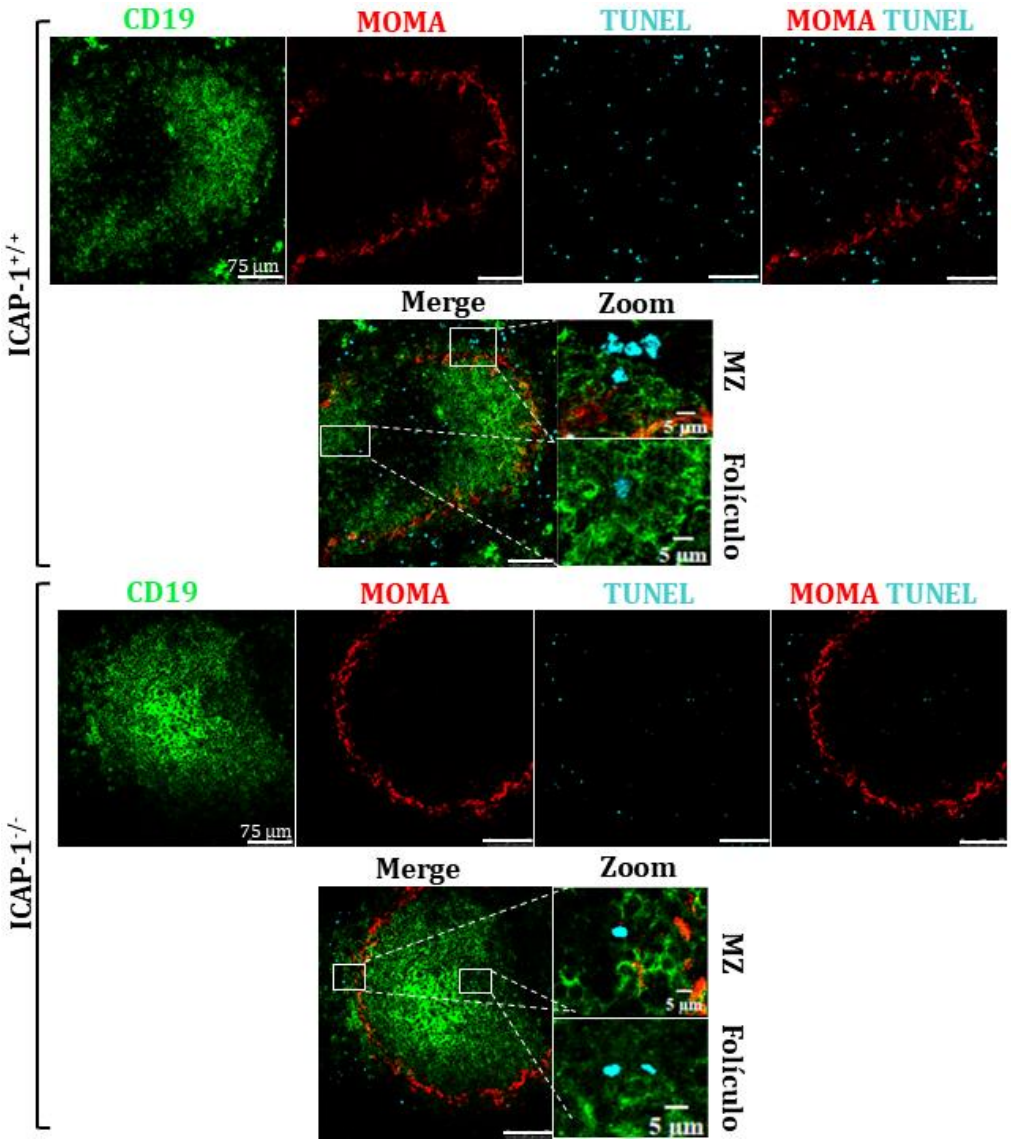


Figura 58. Análisis de la distribución de la apoptosis *in situ* en folículos de bazo. Imágenes representativas de fluorescencia de la expresión de TUNEL en linfocitos B del interior y exterior de folículos de bazos de ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$, detectados mediante los anticuerpos anti-MOMA y anti-CD19 (n=3 ratones). Barras de escala de 75 µm y 5 µm *(zoom)*.

Adicionalmente, evaluamos mediante citometría de flujo la apoptosis tardía de linfocitos B de bazos de ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ incubados durante diferentes tiempos en medio RPMI-1640 en ausencia o presencia de FBS 10%. Para ello, seleccionamos células B $CD19^{+}$ mediante anticuerpos anti-CD19-APC, y analizamos los marcadores Anexina V-FITC y DAPI. Los resultados revelaron un nivel de apoptosis tardía de células B $CD19^{+}$ de bazos de ratones deficientes en ICAP-1 comparable a las células de ratones control (**Figuras 59** y **60**). Asimismo, no se observaron diferencias significativas del grado de apoptosis tardía en células FOB y MZB de bazos de ratones control e ICAP-$1^{-/-}$ incubadas en ausencia de suero (no mostrado).

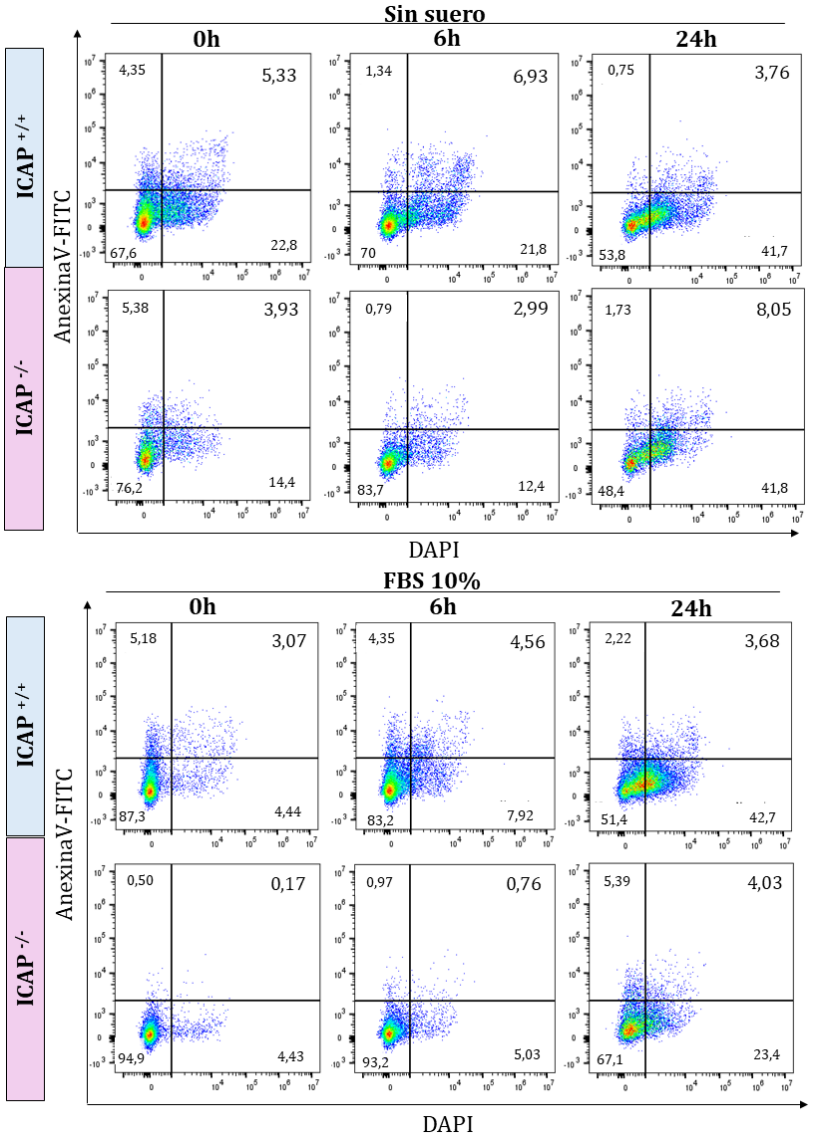


Figura 59. Análisis de apoptosis *in vitro* de células B CD19⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. *Dot plots* representativos del análisis por citometría de flujo de células CD19⁺ seleccionadas con anti-CD19-APC tras su incubación durante los tiempos indicados con RPMI-1640 sin suero o con FBS 10%. Se distinguen células vivas (AnexinaV⁻ DAPI⁻), células apoptóticas (AnexinaV⁺DAPI⁻), células apoptóticas tardías (AnexinaV⁺DAPI⁺) y células necróticas (AnexinaV⁻DAPI⁺), (n=4 ratones).

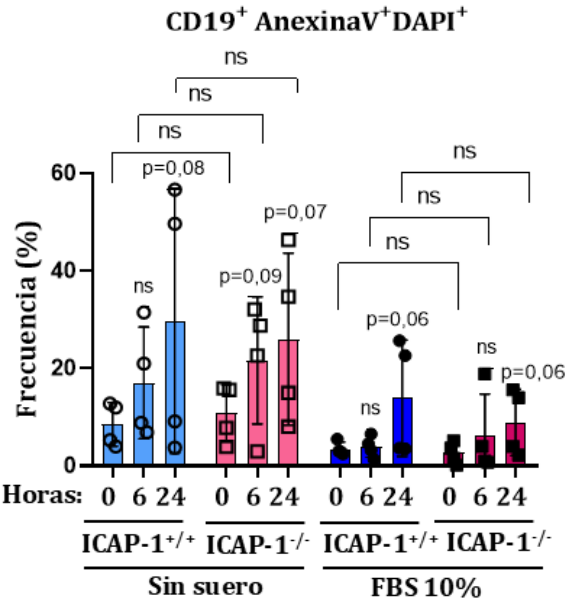


Figura 60. Cuantificación de la apoptosis *in vitro* de células CD19⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Cuantificación de la apoptosis tardía (AnexinaV⁺DAPI⁺) de las células CD19⁺ incubadas en ausencia o presencia de FBS 10% (n=4), (ns, no significativo).

Debido a la reducción de la población de linfocitos B de bazos ICAP-1$^{-/-}$, analizamos la respuesta inmune humoral de células B independiente de células T. Para ello, inmunizamos con TNP-Ficoll un grupo de 5 ratones ICAP-1$^{+/+}$ y 5 ratones ICAP-1$^{-/-}$. Se tomaron muestras de sangre periférica el día previo a la inmunización (suero preinmune), y a los 7, 14 y 21 días posteriores a la inmunización, obteniéndose los respectivos sueros inmunes, los cuales fueron analizados mediante ELISA para determinar la producción de IgM e IgG (**Figura 61A**). Los resultados mostraron que los niveles de IgM e IgG aumentaron significativamente en ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ tras inmunización en comparación con el suero preinmune. No observamos diferencias remarcables en la producción de IgM e IgG entre ambos grupos de ratones (**Figura 61B**), lo que indica que ICAP-1 no tiene un papel relevante en la estimulación de la producción de anticuerpos IgM e IgG por células B en respuesta a antígenos de manera independiente de linfocitos T.

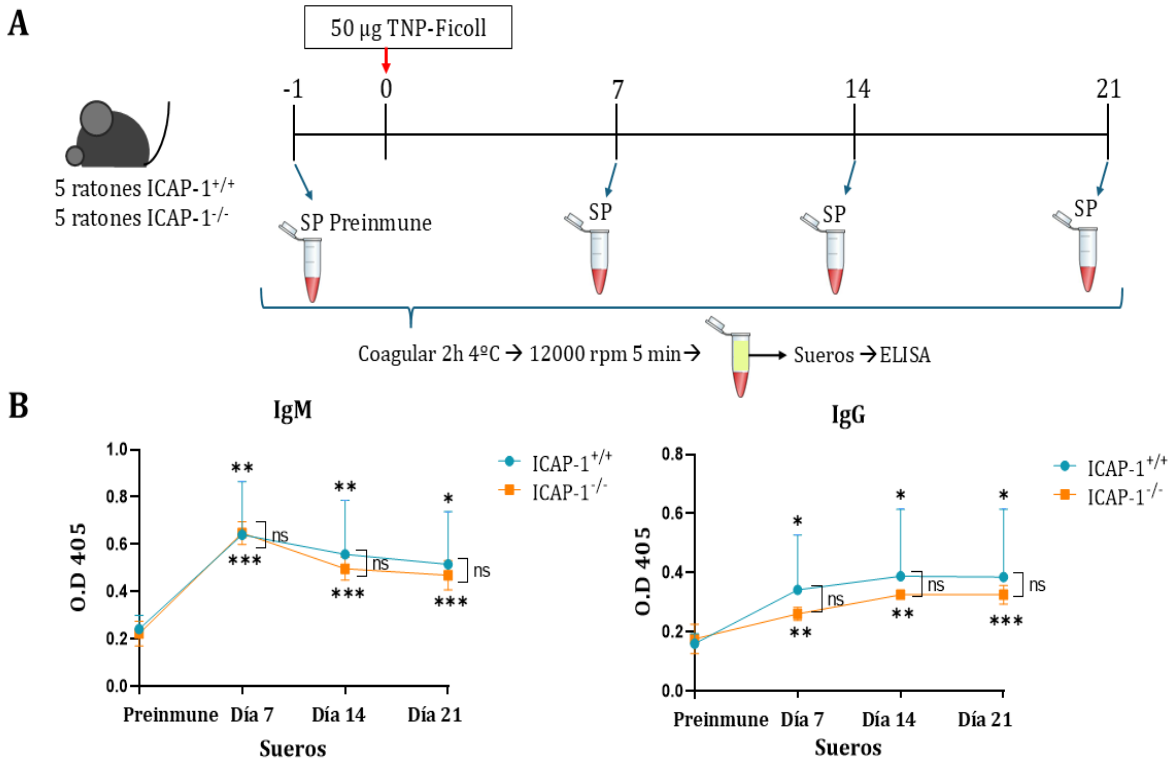


Figura 61. Análisis de la producción de IgM e IgG tras inmunización T-independiente en ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (**A**) Esquema temporal de la inmunización de los ratones con TNP-Ficoll, y la obtención de sueros a partir de sangre periférica (SP). (**B**) Cuantificación mediante ELISA de los niveles de IgM e IgG en los sueros de ambos grupos de ratones (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

Para caracterizar en un contexto *in vitro* el potencial proliferativo de las células B de bazo de ratones ICAP-1$^{-/-}$, marcamos con *Cell Trace Violet* (CTV) linfocitos B CD19^{+} purificados mediante selección negativa, los cuales se incubaron durante 96 horas en medio completo de proliferación de células B, en ausencia o en presencia de anticuerpos frente a IgM e IL-4, una citoquina que proporciona señales necesarias para la proliferación además de la estimulación (Hodgkin *et al.*, 1991; Nomura *et al.*, 1995). Las células fueron recogidas a tiempo 0 y analizadas por citometría de flujo para detectar la señal máxima de CTV. Previo al análisis por citometría de flujo a las 96 h, realizamos micrografías de la formación de blastos en las dos condiciones. Notablemente, el número de blastos formados por los linfocitos B ICAP-1$^{-/-}$ en presencia de anti-IgM+IL-4 y el tamaño de los mismos fue significativamente menor que los formados por los linfocitos ICAP-1$^{+/+}$ (**Figura 62**).

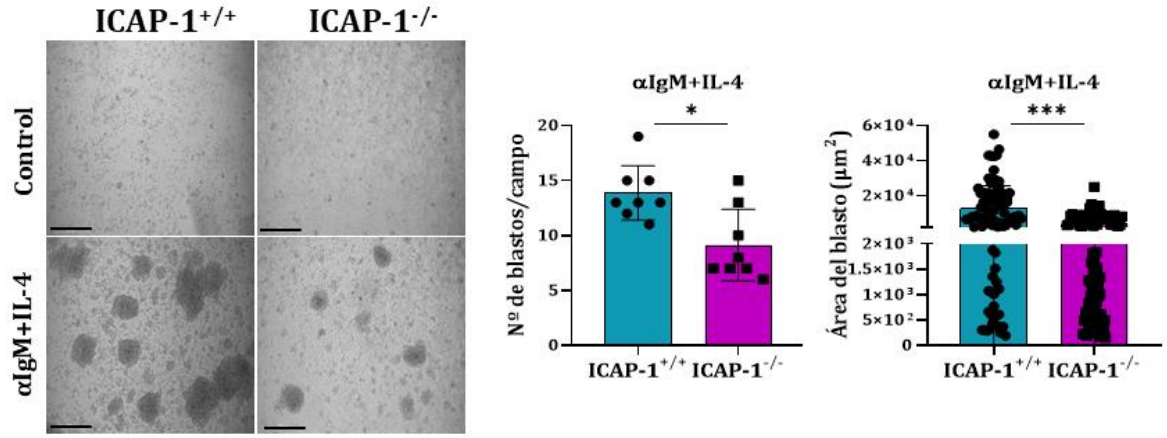


Figura 62. Generación de blastos de linfocitos B de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ tras proliferación en presencia de anti-IgM+IL-4. (Izquierda) Imágenes representativas de blastos de linfocitos CD19^{+} tras 96 h de incubación en ausencia (control) o en presencia del estímulo indicado. (Derecha) Cuantificación del número de blastos y sus áreas por campo de imagen. Se emplearon 3 ratones y 2-3 campos de imagen por ratón. Barras de escala de 200 μm (***p<0.001, *p<0.05).

Los análisis mediante citometría de flujo a las 96 horas de incubación con los estímulos se llevaron a cabo usando los anticuerpos anti-CD19-APC, anti-CD21-FITC y anti-CD23-PE, para cuantificar los niveles de CTV en la población total CD19^{+}, y en las subpoblaciones de células FOB y MZB. Los resultados mostraron una disminución del índice de proliferación tanto de las células CD19^{+} como de las células FOB deficientes en ICAP-1 en comparación con las células control (**Figuras 63** y **64**). Por su parte, las células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ proliferaron de forma similar a las de los ratones ICAP-1$^{+/+}$, reflejando la observación previa de que las células FOB representan la principal diana de la estimulación con anti-IgM+IL-4 (Oliver *et al.*, 1997; Su & Rawlings, 2002).

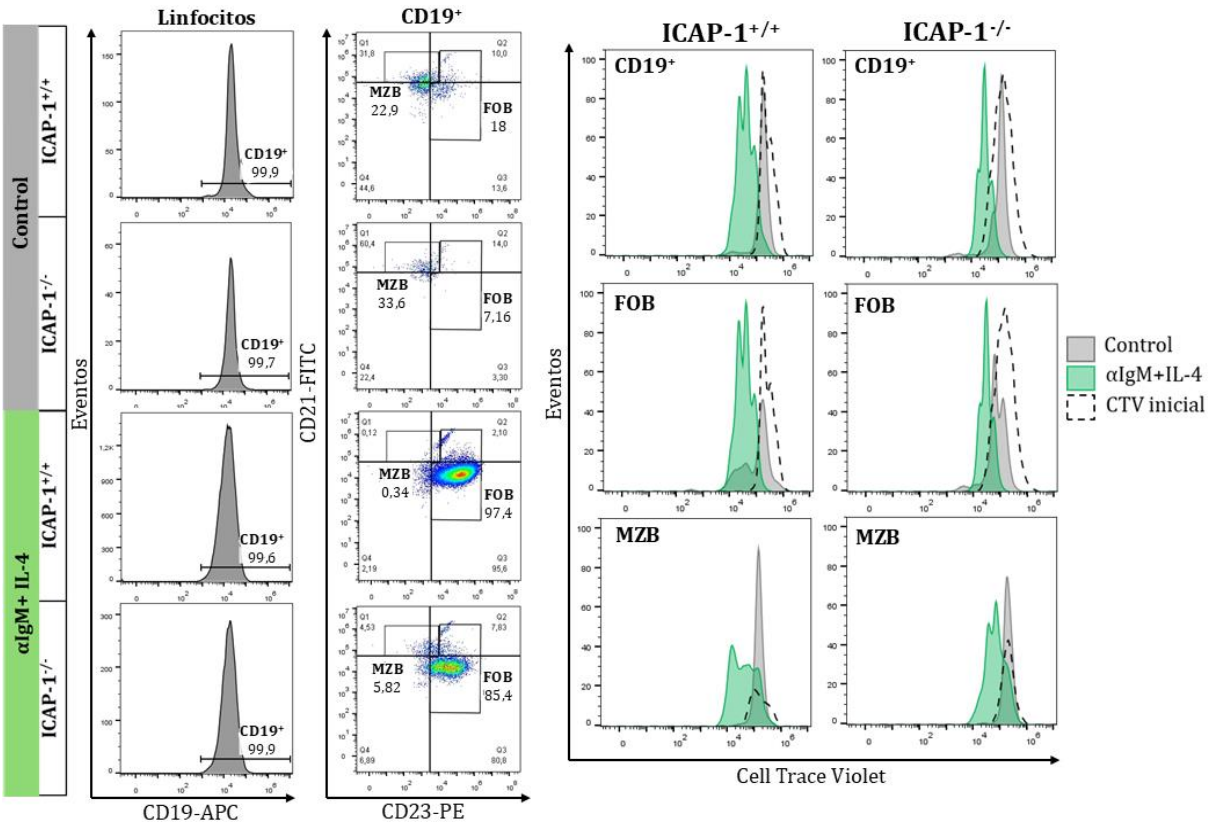


Figura 63. Proliferación de linfocitos B en presencia de αIgM+IL-4. Linfocitos CD19^{+} de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron marcados con CTV e incubados durante 96 h en ausencia (control), o en presencia de αIgM+IL-4. Los *dot plots* muestran el *gating* de las células FOB y MZB a partir de los

histogramas de las células CD19⁺. En los histogramas de la derecha se muestran resultados representativos de la señal máxima de CTV a tiempo cero (CTV inicial), y la señal de CTV en las condiciones control y estimulada.

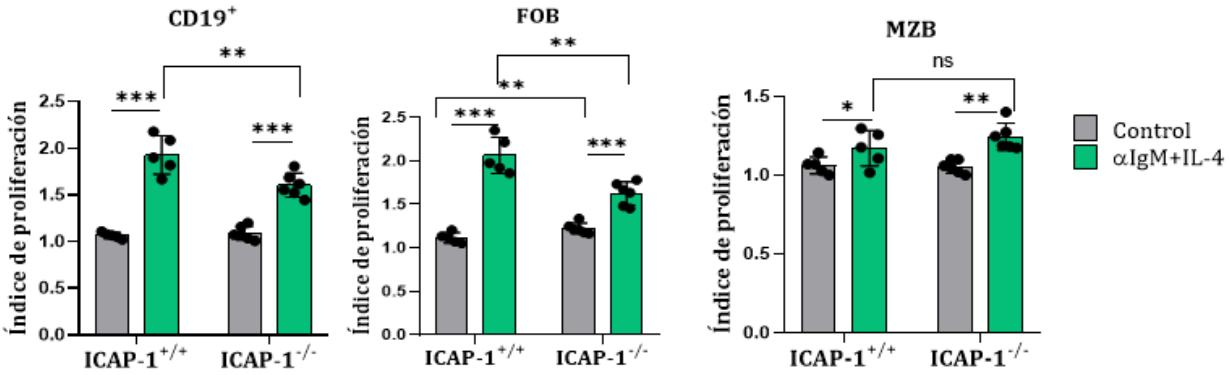


Figura 64. Cuantificación de la proliferación *in vitro* de linfocitos B en presencia de αIgM+IL-4. Se muestra el índice de proliferación de cada una de las poblaciones en ausencia (control) o en presencia de αIgM+IL-4 (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

Puesto que los linfocitos B de ratones ICAP-1$^{-/-}$ proliferan en menor medida que los de los ratones control, decidimos analizar su ciclo celular. Los linfocitos CD19⁺ purificados de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron incubados durante cuatro días en ausencia o en presencia de αIgM+IL-4, y posteriormente analizamos mediante citometría de flujo la proporción de las fases del ciclo celular. Los resultados revelaron una reducción significativa de la frecuencia de células en la fase G2/M, asociada a un pequeño aumento de la fase G1 de los ratones ICAP-1$^{-/-}$ tras estimulación con αIgM+IL-4 en comparación con los linfocitos control (**Figura 65**).

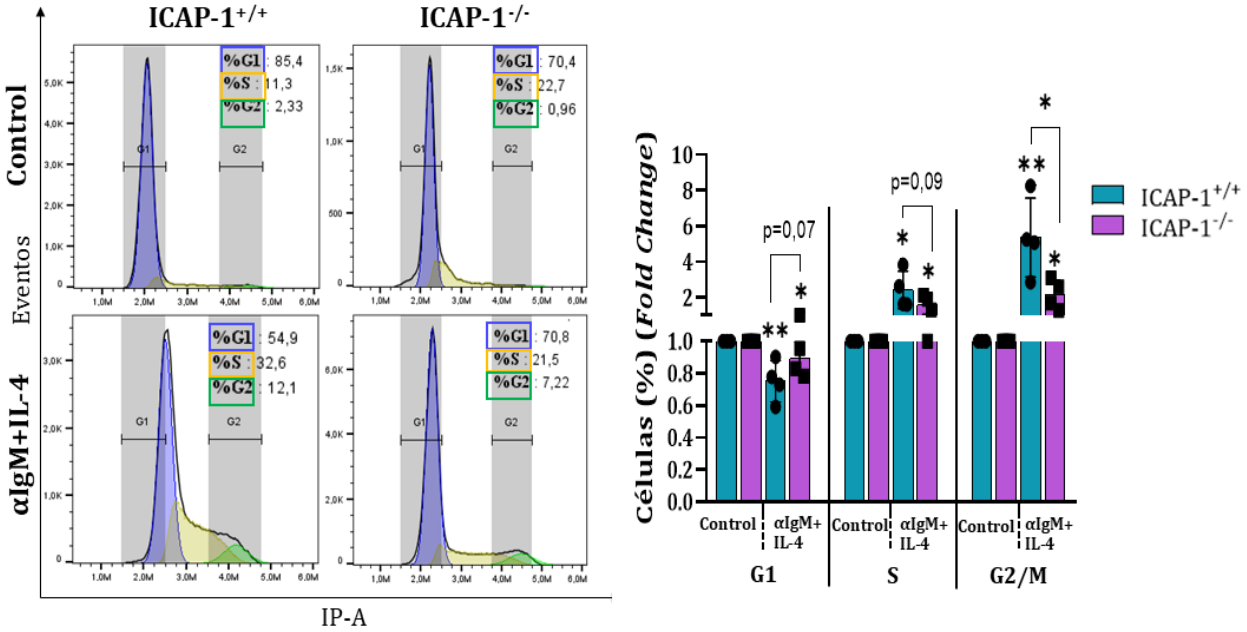


Figura 65. Análisis del ciclo celular de linfocitos B estimulados con anti-IgM+IL-4. Linfocitos CD19⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron incubados en ausencia (control) o en presencia de αIgM+IL-4, analizándose posteriormente el ciclo celular mediante citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos (izquierda), y la cuantificación de las fases G1, S y G2/M (derecha), (ns, no significativo, **p<0.01, *p<0.05).

A continuación analizamos el potencial proliferativo de las células B en presencia de estímulos adicionales, como el anticuerpo frente a CD40 combinado con IL-4 (Nomura *et al.*, 1995; Oliver *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2011), o el LPS de *E.coli* (Kearney & Lawton, 1975). Para

ello, marcamos con CTV linfocitos B CD19⁺ purificados mediante selección negativa de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$, y los incubamos durante 96 h en ausencia o en presencia de anti-CD40+IL-4 o de LPS. Las células fueron recogidas a tiempo 0 y analizadas por citometría de flujo para detectar la señal máxima de CTV. Como en el caso anterior, realizamos a las 96 h micrografías de los blastos generados en las mencionadas condiciones. El número y el tamaño de los blastos formados por los linfocitos B deficientes en ICAP-1 en presencia de anti-CD40+IL-4 fue menor que los formados por los linfocitos B ICAP-1$^{+/+}$ (**Figura 66**). En el caso de la estimulación con LPS, el número de blastos formados por los linfocitos B control fue similar al de los linfocitos ICAP-1$^{-/-}$, mientras que el tamaño de los blastos de estos últimos fue menor que el de los linfocitos control (**Figura 66**).

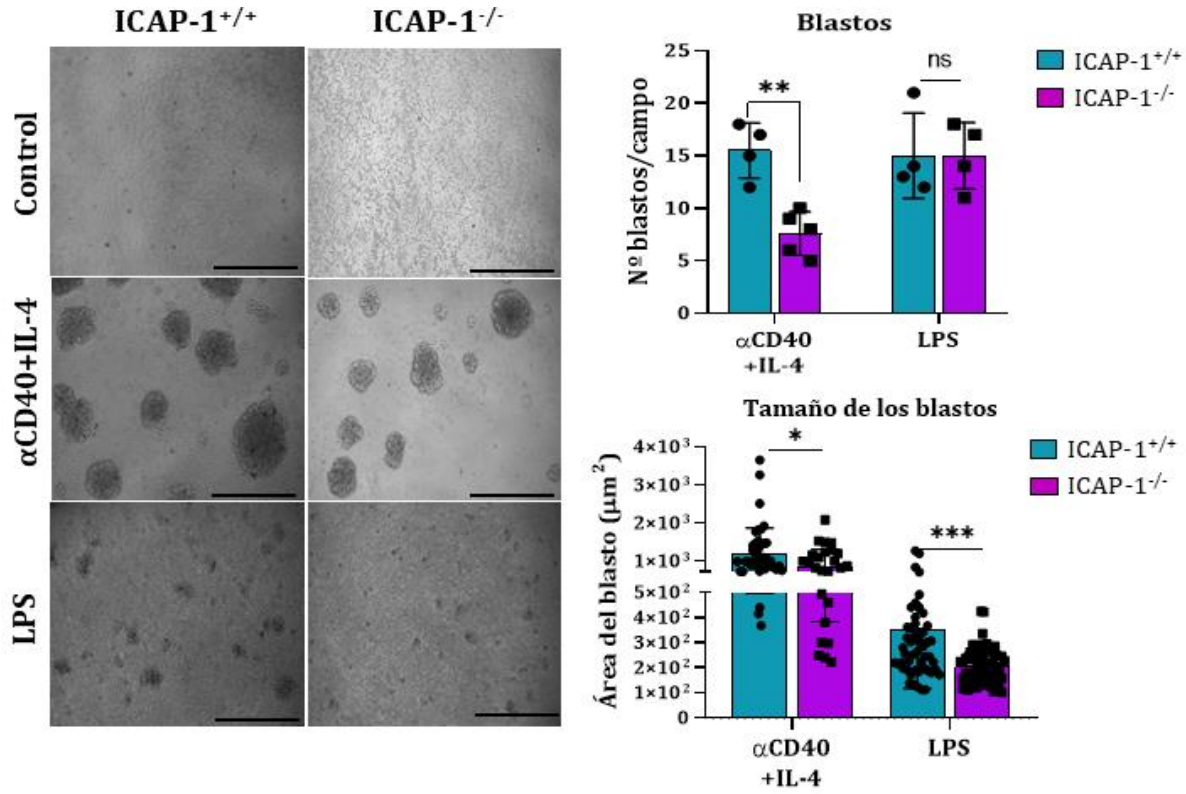


Figura 66. Generación de blastos de linfocitos B de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ tras proliferación en presencia de anti-CD40+IL-4 o LPS. (Izquierda) Imágenes representativas de blastos de linfocitos CD19⁺ tras 96 h de incubación en ausencia (control) o en presencia de los estímulos indicados. Barras de escala de 100 µm. (Derecha) Cuantificación del número de blastos y sus áreas por campo de imagen. Se emplearon 2 ratones, midiendo 2-3 campos de imagen por ratón (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

Al igual que en el caso de los análisis de proliferación en presencia de anti-IgM e IL-4, analizamos mediante citometría de flujo la expresión de CTV en la población total CD19⁺, y en las células FOB y MZB tras estimulación con anti-CD40+IL-4 o con LPS. Los resultados mostraron una reducción del índice de proliferación en todas las condiciones de estimulación, tanto de las células CD19⁺ como de las células FOB y MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ en comparación con las células de ratones control (**Figuras 67** y **68**).

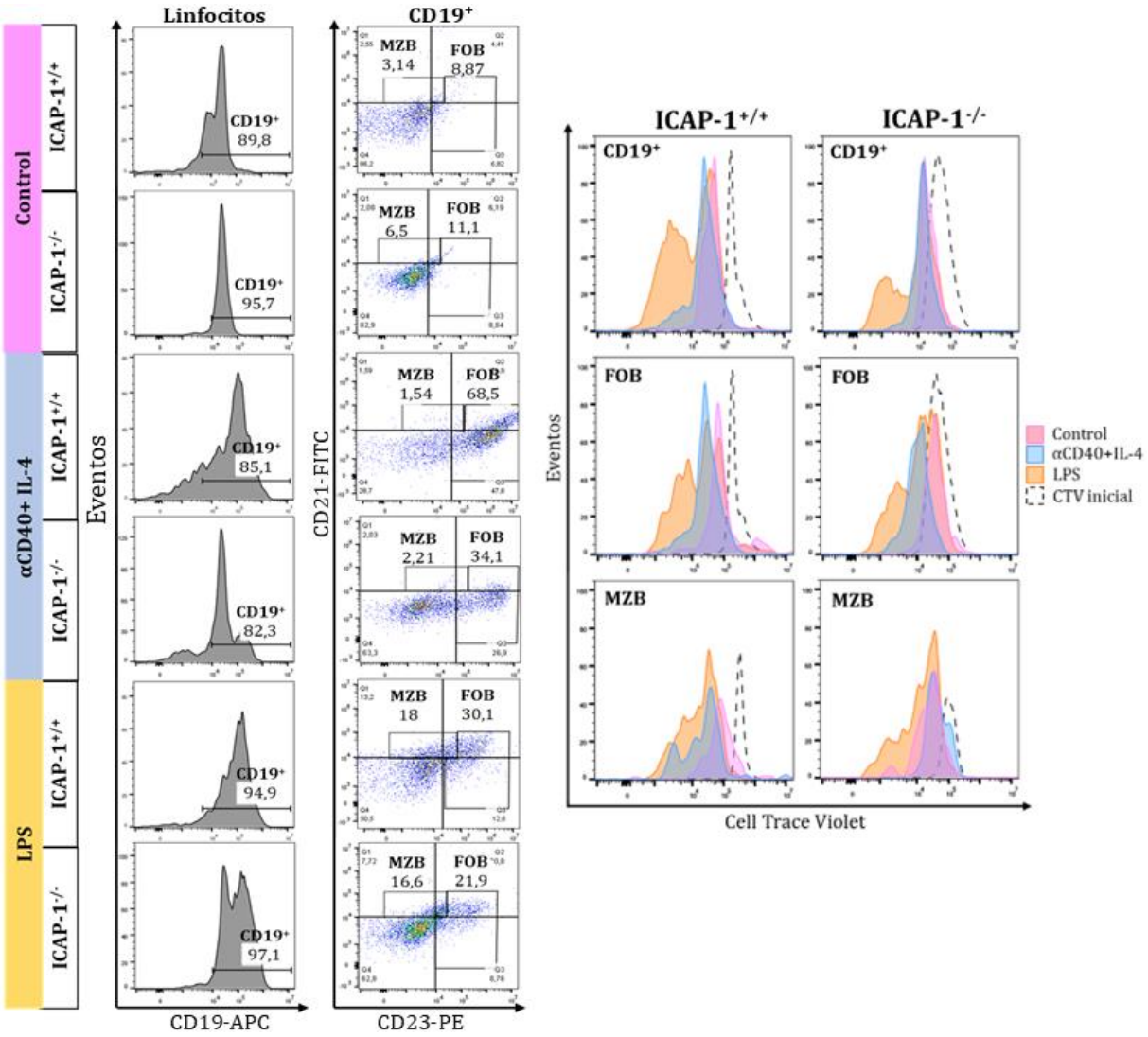


Figura 67. Proliferación de linfocitos B en presencia de αCD40+IL-4 o LPS. Linfocitos CD19⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron marcados con CTV e incubados durante 96 h en ausencia (control) o en presencia de los estímulos indicados. Los *dot plots* muestran el *gating* de las células FOB y MZB a partir de los histogramas de las células CD19⁺. En los histogramas de la derecha se muestran resultados representativos de la señal máxima de CTV a tiempo cero (CTV inicial), y la señal de CTV en las condiciones control y estimulada.

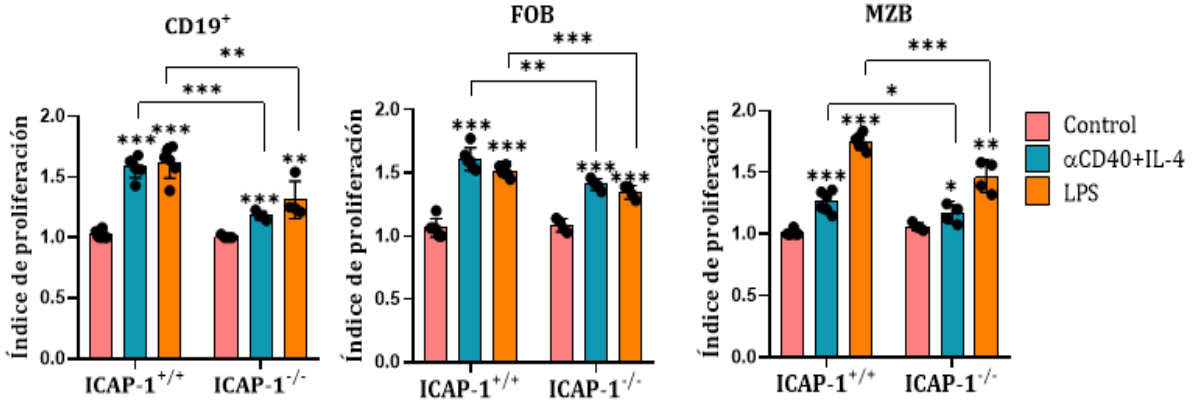


Figura 68. Cuantificación de la proliferación *in vitro* de linfocitos B en presencia de αCD40+IL-4 o LPS. Se muestra el índice de proliferación de cada una de las poblaciones en ausencia (control) o en presencia de los estímulos indicados (***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

2.7. Las células B de ratones deficientes en ICAP-1 muestran alteraciones en sus respuestas a estimulación

Para investigar si la señalización dependiente de BCR se encuentra afectada en ratones ICAP-1$^{-/-}$, analizamos la expresión de los receptores CD69 y CD86, los cuales representan marcadores de activación y de coestimulación, respectivamente (Freeman *et al.*, 1993; Testi *et al.*, 1994; Kohm *et al.*, 2002; Minguet *et al.,* 2008). Los linfocitos B CD19^{+} de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron purificados mediante selección negativa, y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de anticuerpos anti-IgM, utilizados como estímulo de activación. A las 24 horas analizamos por citometría de flujo la expresión de CD69 y CD86 en la población CD19^{+}, así como en las células FOB y MZB. Para determinar la expresión de estos marcadores en las células CD19^{+}, empleamos los anticuerpos anti-CD69-FITC, anti-CD86-PE y anti-CD19-APC. La expresión de CD69 y CD86 en las células FOB y MZB se llevó a cabo utilizando anticuerpos anti-CD21-FITC, anti-CD23-PE, anti-CD69-APC y CD86-eF450. Los resultados mostraron una inducción de la expresión de CD69 tras estimulación con anti-IgM equiparable entre los linfocitos B deficientes en ICAP-1 y los linfocitos control en todas las poblaciones (**Figura 69A**). Mientras que no observamos diferencias significativas en la expresión de CD86 tras estimulación en las células CD19^{+} y FOB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ e ICAP-1$^{+/+}$, la inducción de la expresión de CD86 fue drásticamente inhibida en las células MZB de ratones deficientes en ICAP-1 en comparación con las células de los ratones control (**Figura 69B**).

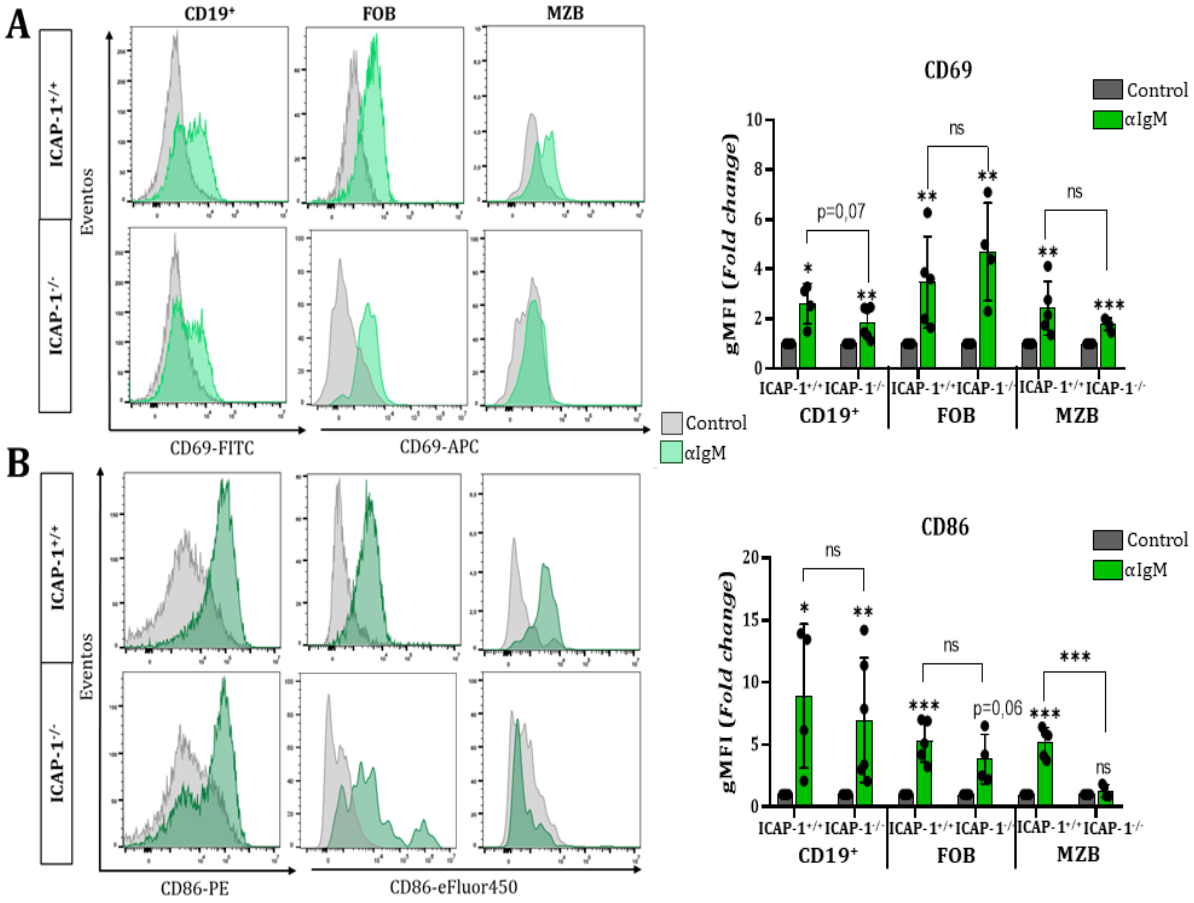


Figura 69. Análisis de la expresión de CD69 y CD86 en células B tras estimulación con anti-IgM. (Izquierda) Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de CD69 (**A**) y CD86 (**B**) en las poblaciones celulares indicadas de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$, tras 24 horas de incubación en ausencia (control) o en presencia de anticuerpos anti-IgM. (Derecha) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) de CD69 y CD86, normalizada respecto a la condición sin estimular (control=1), (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

Asimismo, determinamos la expresión de CD69 y CD86 en linfocitos B CD19⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ tras la incubación durante 24 h en ausencia o en presencia de anticuerpos anti-CD40 o LPS. La expresión de CD69 y CD86 en células CD19⁺ se analizó por citometría de flujo mediante los anticuerpos anti-CD69-FITC, anti-CD86-eF450 y anti-CD19-APC. Para determinar la expresión de estos marcadores en células FOB y MZB, utilizamos anticuerpos anti-IgM-PE y anti-IgD-APC (**Figura 70**). Los resultados mostraron niveles de inducción de la expresión de CD69 y CD86 en las células CD19⁺ y FOB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ similares a los de las células de ratones control tras estimulación tanto con anti-CD40 como con LPS (**Figura 71A** y **B**). La expresión de estos dos marcadores mostró una pequeña disminución en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ en comparación con las células de los ratones control (**Figura 71A** y **B**).

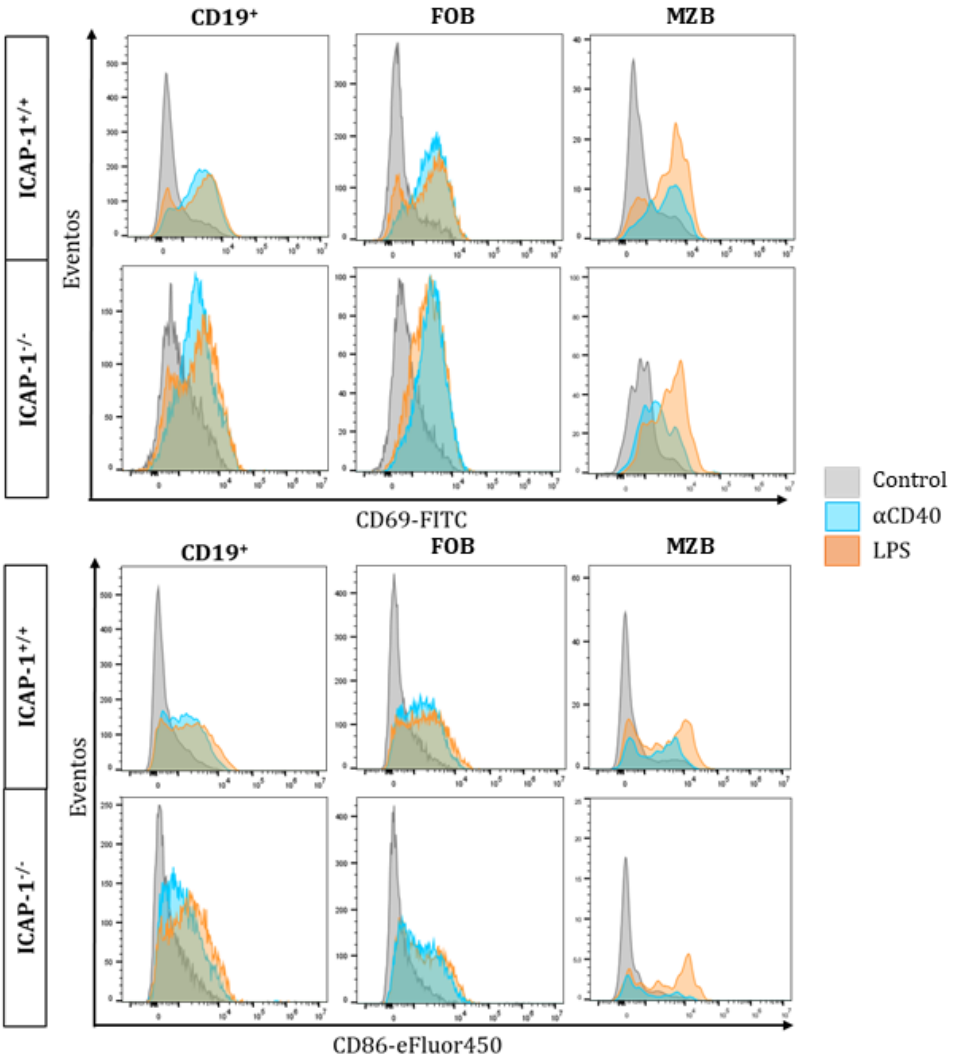


Figura 70. Expresión de CD69 y CD86 en células B tras estimulación con anticuerpos anti-CD40 o LPS. Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de CD69 y CD86 en las células CD19⁺, FOB y MZB de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$, tras 24 h de incubación en ausencia (control) o en presencia de los estímulos indicados (n=4).

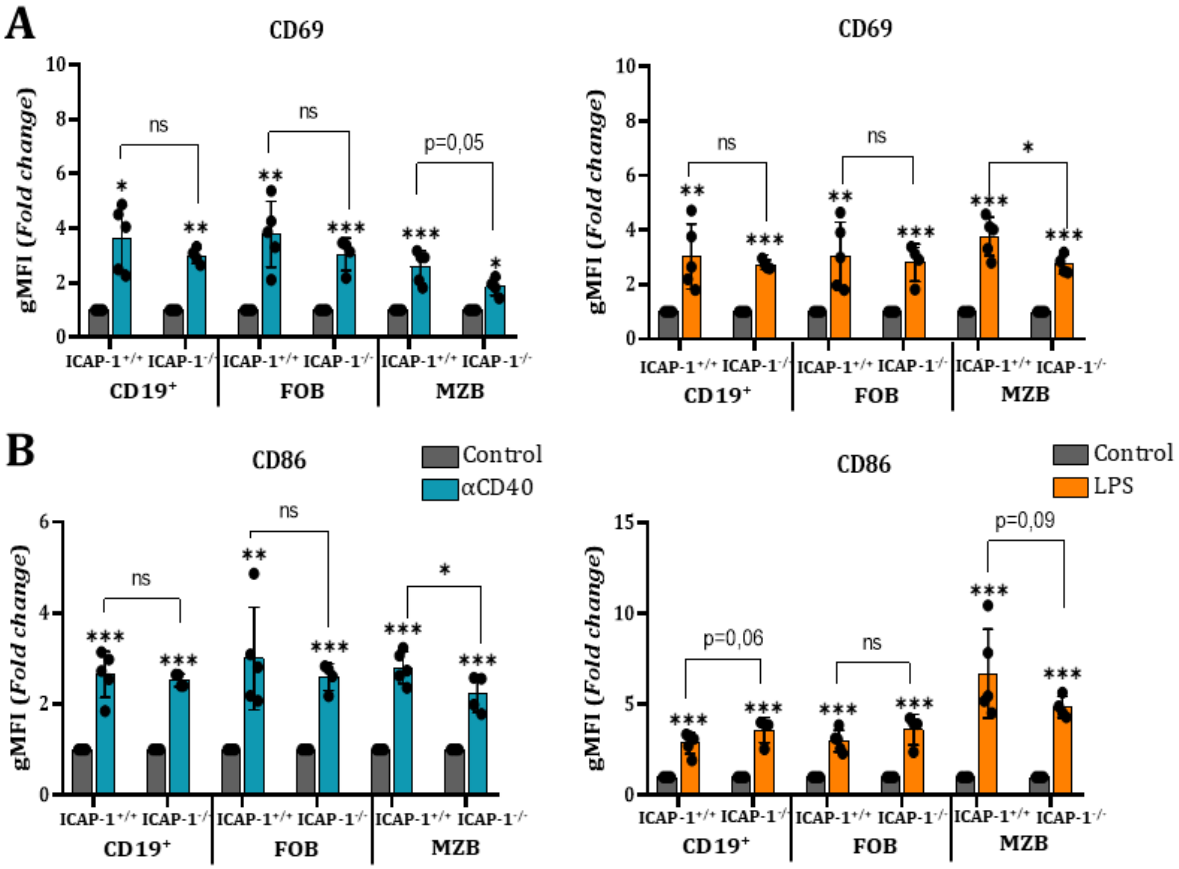


Figura 71. Cuantificación de la expresión de CD69 y CD86 en células B tras estimulación con anticuerpos anti-CD40 o LPS. Se muestran las cuantificaciones de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI), normalizadas respecto a la condición sin estimular (control=1), de la expresión de CD69 (**A**) y CD86 (**B**) en las poblaciones CD19⁺, FOB y MZB de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ tras 24 horas de estimulación (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

La activación de la vía de las MAP quinasas y de PI3K/Akt constituyen eventos tempranos tras la estimulación del BCR, y contribuyen a la proliferación y supervivencia celular (Kurosaki, 2002; Niiro & Clark, 2002; Oh-Hora *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2009; Rowland *et al.*, 2010; Werner *et al.*, 2010). Para determinar si la ausencia de ICAP-1 pudiera afectar a la activación de estas vías de señalización tras estimulación del BCR, los linfocitos CD19⁺ purificados de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron incubados en ausencia o en presencia de anticuerpos anti-IgM, analizando a continuación la fosforilación de Akt y ERK1/2 mediante *Western blotting*. Los resultados revelaron aumentos similares de pERK1/2 y pAkt en células control y deficientes en ICAP-1 en relación con las muestras no estimuladas en todos los tiempos analizados (**Figura 72**). Tan sólo observamos que mientras que las células CD19⁺ de ratones ICAP-1$^{+/+}$ presentan un notable incremento del nivel de pERK1/2 tras 1 minuto de estimulación, dicho incremento es menor en las células ICAP-1$^{-/-}$, las cuales muestran un aumento estable de pERK1/2 a lo largo de la cinética.

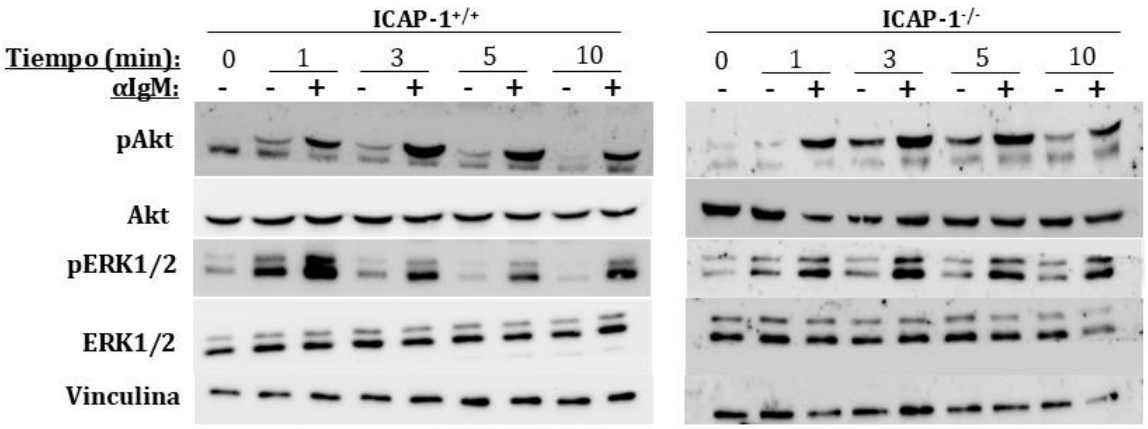


Figura 72. Activación de Akt y ERK1/2 en linfocitos B tras estimulación con anti-IgM. Análisis mediante *Western blotting* de la fosforilación de Akt y ERK1/2 en linfocitos B CD19⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ tras incubación durante los tiempos indicados, en ausencia (-) o en presencia de αIgM (+). Se muestra un resultado representativo de tres experimentos.

2.8. Análisis transcriptómicos de células MZB deficientes en ICAP-1

Además de unirse a la subunidad β1 de las integrinas, ICAP-1 contiene una secuencia de localización nuclear que permite su translocación al núcleo (Fournier *et al.*, 2005; Draheim *et al.*, 2017). Ensayos de fraccionamiento celular a partir de células CD19⁺ purificadas de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ mostraron mayores niveles de expresión de ICAP-1 en el núcleo que en el citosol (**Figura 73**). Basándonos en estudios previos, la banda nuclear de 21 kDa correspondería a la forma no fosforilada de ICAP-1, mientras que la banda de 24 kDa correspondería a la forma fosforilada de ICAP-1, habiéndose documentado que esta fosforilación impide su localización nuclear (Chang *et al.*, 1997; Zhang & Hemler, 1999; Su *et al.*, 2020). Este resultado nos planteó la posibilidad de que ICAP-1 nuclear pudiera regular la expresión génica.

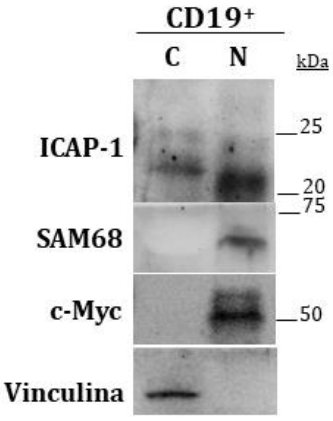


Figura 73. Análisis de la expresión subcelular de ICAP-1 en linfocitos B CD19⁺. Las células CD19⁺ de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ fueron sometidas a ensayos de fraccionamiento celular y posteriormente *Western blotting*, para analizar la expresión de ICAP-1 en las fracciones citoplasmática (C) y nuclear (N). SAM68 y c-Myc fueron empleados como marcadores nucleares, mientras que la vinculina se utilizó como marcador citoplásmico. Se muestra un resultado representativo de cuatro experimentos.

Dado que la población de células MZB estaba especialmente afectada en ratones ICAP-1$^{-/-}$, decidimos llevar a cabo análisis transcriptómicos mediante RNAseq para poder identificar genes expresados diferencialmente entre células MZB de ratones deficientes en ICAP-1 y ratones control. Para ello, purificamos mediante *cell sorting* las células MZB a partir de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$, usando anticuerpos frente a CD21 y CD23 (**Figura 74**). Tras preparar el RNA de las células purificadas, se procedió a su secuenciación, que se llevó a cabo en la empresa Novogene (Cambridge, UK).

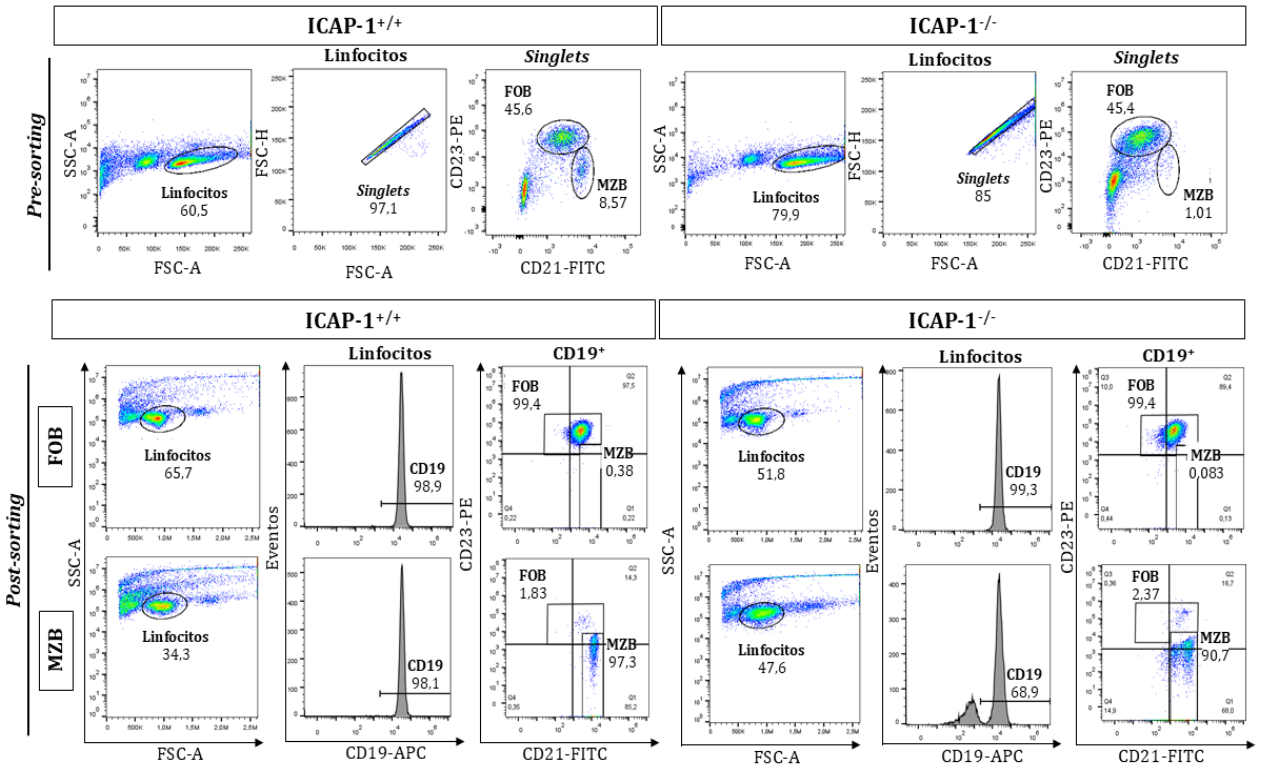


Figura 74. *Cell sorting* de células MZB y FOB de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Superior) Las células FOB y MZB fueron seleccionadas positivamente mediante *cell sorting* con los anticuerpos anti-CD21-FITC y anti-CD23-PE, según la estrategia de selección indicada (*pre-sorting*). (Inferior) Se muestra el análisis *post-sorting* realizado sobre las poblaciones FOB y MZB una vez seleccionadas positivamente, para comprobar la eficiencia de la selección, empleando los anticuerpos anti-CD19-APC, anti-CD21-FITC y anti-CD23-PE.

La expresión diferencial y significativa de genes fue representada con un *volcano plot,* el cual mostró la presencia de un mayor número de genes sobreexpresados en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ comparado con sus controles (**Figura 75A**). Los términos GO (*Gene Ontology)* más implicados en las diferencias entre las células MZB de ambos grupos de ratones mostraron relación con la regulación de la activación celular inmune, las respuestas inmunes, señalización intracelular, y adhesión y migración celular, entre otros (**Figura 75B**).

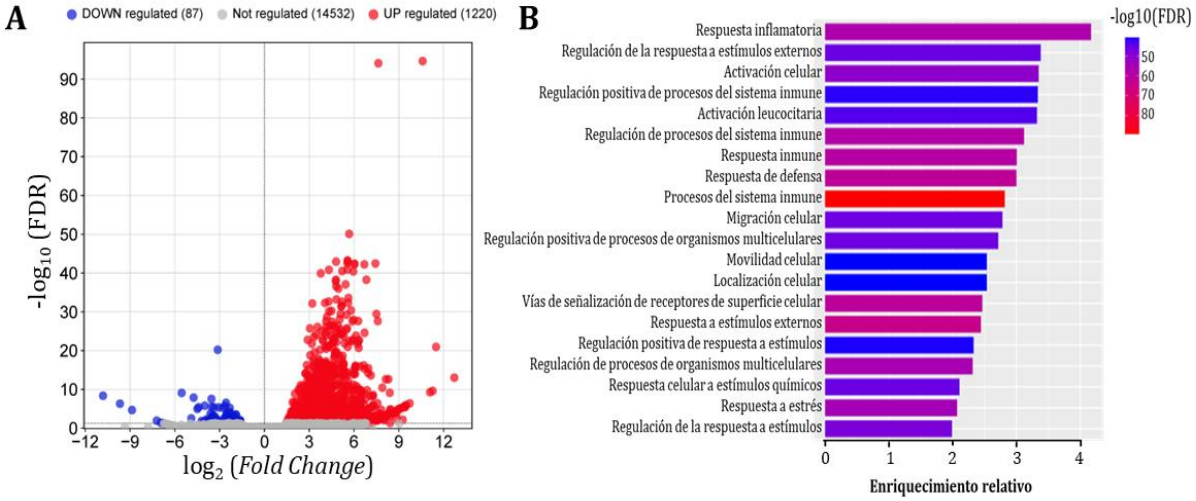


Figura 75. Análisis del RNAseq de células MZB. (**A**) *Volcano plot* de los datos de secuenciación de RNA obtenidos a partir de células MZB purificadas de ratones ICAP-1$^{-/-}$ respecto a las células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$. Se indican en azul los genes cuya expresión disminuye, y en rojo los genes que se sobreexpresan. (**B**) Gráfico de los términos GO (*Gene Ontology*) más alterados entre las células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Resultados obtenidos con un |FC|≥2.

2.9. Expresión alterada de genes reguladores de la transcripción en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$

Los *heatmap* de los análisis de RNAseq revelaron una serie de genes implicados en la regulación de la transcripción expresados diferencialmente en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ respecto a los ratones control (**Figura 76A**). Una de las principales vías requeridas para el desarrollo de las células MZB es la ruta de Notch2. Tras la unión de Notch2 a su ligando DLL-1, expresado principalmente por células endoteliales y reticulares, Notch2 es proteolíticamente procesado en la membrana celular, generando el dominio intracelular (Notch2-ICD) que se transloca al núcleo, donde heterodimeriza con el factor de transcripción RBP-Jk, formando un complejo de unión a DNA (Saito *et al*., 2003; Witt *et al*., 2003; Radtke *et al*., 2010; Lechner *et al*., 2021). Los resultados de secuenciación mostraron una reducción de la expresión de *Notch2* y de sus dianas *Hes1* (Artavanis-Tsakonas *et al*., 1999; Shimizu *et al*., 2000; Saito *et al*., 2003) y *Myc* (Ryan *et al*., 2017; Gaudette *et al*., 2021) en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ comparado con las células control (**Figura 76A**). La reducción de la expresión de *Notch2*, *Hes1* y *Myc* fue confirmada por RT-qPCR en las células MZB de ratones deficientes en ICAP-1 (**Figura 76B**). La expresión de *Notch2* en células FOB ICAP-1$^{-/-}$ mostró asimismo una pequeña reducción, mientras que los niveles de *Hes1* y *Myc* en estas células fueron comparables a los de las células control (**Figura 76B**). Asimismo, observamos una reducción de expresión de *Dtx1*, otra de las principales dianas de Notch2 (Ordentlich *et al*., 1998; Saito *et al*., 2003), en células MZB deficientes en ICAP-1, mientras que sus niveles de expresión fueron similares entre las células FOB control e ICAP-1$^{-/-}$ (**Figura 76B**).

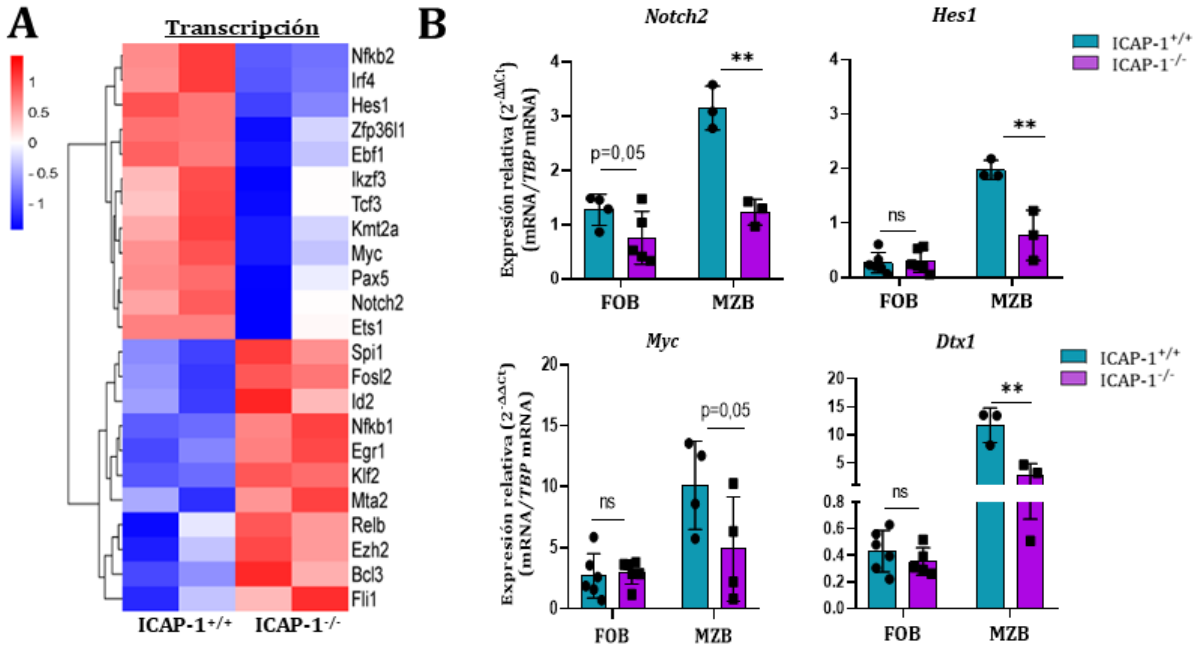


Figura 76. Análisis comparativo de la expresión de genes reguladores de la transcripción en células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (**A**) *Heatmap* mostrando diferencias en la expresión de genes que regulan la transcripción, con un |FC|≥1.5. (**B**) Análisis por RT-qPCR de la expresión de los genes indicados en células MZB y FOB de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ (ns, no significativo, **p<0.01).

La expresión de Notch2 fue analizada mediante citometría de flujo en las poblaciones de células B transicionales y maduras, empleando los anticuerpos anti-IgM-PeCy7, anti-IgD-AF700, anti-CD21-FITC, anti-CD23-PE y anti-CD1d-eF450. Las células fueron posteriormente fijadas, permeabilizadas e incubadas con el anticuerpo purificado anti-Notch2, el cual fue detectado mediante un anticuerpo secundario conjugado con AF647. Los resultados mostraron que la reducción de *Notch2* correlaciona con una disminución significativa de sus niveles proteicos en células MZB ICAP-1$^{-/-}$, pero no en las células FOB (**Figura 77**).

Adicionalmente, observamos que las células pre-MZB de ratones deficientes en ICAP-1 presentan una clara tendencia hacia una reducción de la expresión de Notch2 en comparación con las células control. No detectamos alteraciones remarcables de la expresión de Notch2 en las subpoblaciones T1 y T2 de bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$.

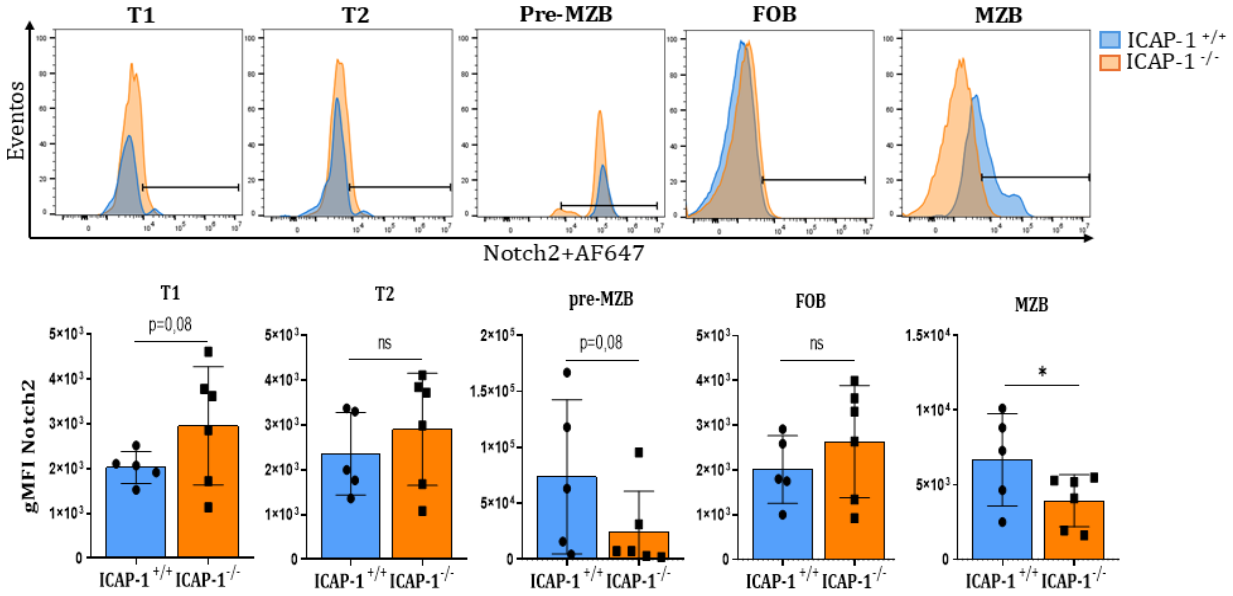


Figura 77. Expresión de Notch2 en linfocitos B transicionales y maduros de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Superior) Se muestran histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de Notch2 en las distintas poblaciones de bazo. (Inferior) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) de Notch2 en cada una de las poblaciones (ns, no significativo, *p<0.05).

La expresión transgénica de una forma de Notch2 constitutivamente activa y compuesta por su dominio intracelular (Notch2-ICD), se traduce en un incremento de la expresión de *Hes1* y *Hes5,* lo que se asocia a una disminución de los niveles del factor de transcripción *Krüppel-like factor 2* (Klf2) (Lechner *et al.*, 2021; Wittner & Schuh, 2023). Klf2 contribuye al mantenimiento de la identidad de células FOB y a la quiescencia celular (Winkelmann *et al*., 2011; Wittner & Schuh, 2023). Notablemente, los ratones que carecen de Klf2 muestran una expansión del número total de células MZB (Hart *et al*., 2011; Winkelmann *et al*., 2011). El análisis de la expresión de *Klf2,* tanto por RNAseq como por RT-qPCR, mostró que la disminución de los niveles de *Notch2* correlaciona con un aumento de *Klf2* en células MZB deficientes en ICAP-1, sin que detectáramos cambios en su expresión en células FOB (**Figuras 76A** y **78**). Zfp36l1 es una proteína de unión a RNA que juega un importante papel en la generación de células MZB, limitando la expresión de *Klf2* (Newman *et al.*, 2017). Los resultados de RNAseq junto con los de RT-qPCR mostraron una menor expresión de *Zfp36l1* en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ que en las células control, mientras que sus niveles fueron similares en las células FOB (**Figuras 76A** y **78**).

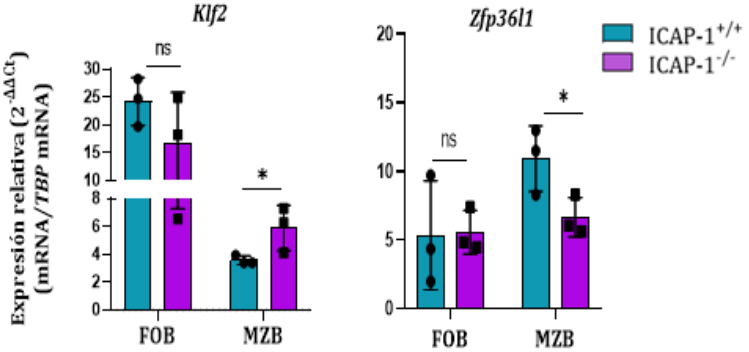


Figura 78. Expresión diferencial de *Klf2* y *Zfp36l1* en células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Análisis por RT-qPCR de la expresión de los genes indicados en células FOB y MZB (ns, no significativo, *p<0.05).

Los factores de transcripción Ebf1 y Pax5 juegan un importante papel durante etapas tempranas de la linfopoyesis de células B en la médula ósea, y ha sido demostrado que son requeridos asimismo para el mantenimiento de las células MZB (Horcher *et al*., 2001; Györy *et al*., 2012; Revilla-i-Domingo *et al*., 2012; Vilagos *et al*., 2012; Calderón *et al*., 2021). Nuestros resultados de RNAseq revelaron una disminución de los niveles de *Ebf1* y *Pax5* en células MZB deficientes en ICAP-1 en comparación con las células control (**Figura 76A**), lo que fue confirmado en ensayos de RT-qPCR. Por el contrario, la expresión de *Ebf1* mostró un pequeño aumento en células FOB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ comparado con las células control, mientras que la expresión de *Pax5* no varió en dichas células (**Figura 79**). Los resultados de RNAseq mostraron asimismo que, comparado con las células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$, las células deficientes en ICAP-1 presentaban niveles superiores de *Id2* y *Egr1,* e inferiores de *Ets1* y *Tcf3* (**Figura 76A**), cuatro factores de transcripción que han sido implicados en el desarrollo de células MZB (Becker-Herman *et al.*, 2002; Quong *et al*., 2004; Wang *et al.*, 2005; Gururajan *et al*., 2008). Sin embargo, aunque los resultados de RT-qPCR mostraron la misma tendencia que los datos de secuenciación, sólo los cambios en la expresión de *Ets1* alcanzaron significancia estadística (**Figura 79**). Otro factor de transcripción involucrado en el desarrollo de las células MZB es Aiolos (*Ikzf3*) (Wang *et al*., 1998; Cariappa *et al*., 2001). Los resultados de secuenciación mostraron una disminución de los niveles de *Ikzf3* en células MZB deficientes en ICAP-1 comparado con las células control (**Figura 76A**). Asimismo, el análisis por RT-qPCR reveló una moderada reducción de la expresión de *Ikzf3* en células MZB ICAP-1$^{-/-}$, sin que detectáramos cambios en sus niveles en células FOB (**Figura 79**).

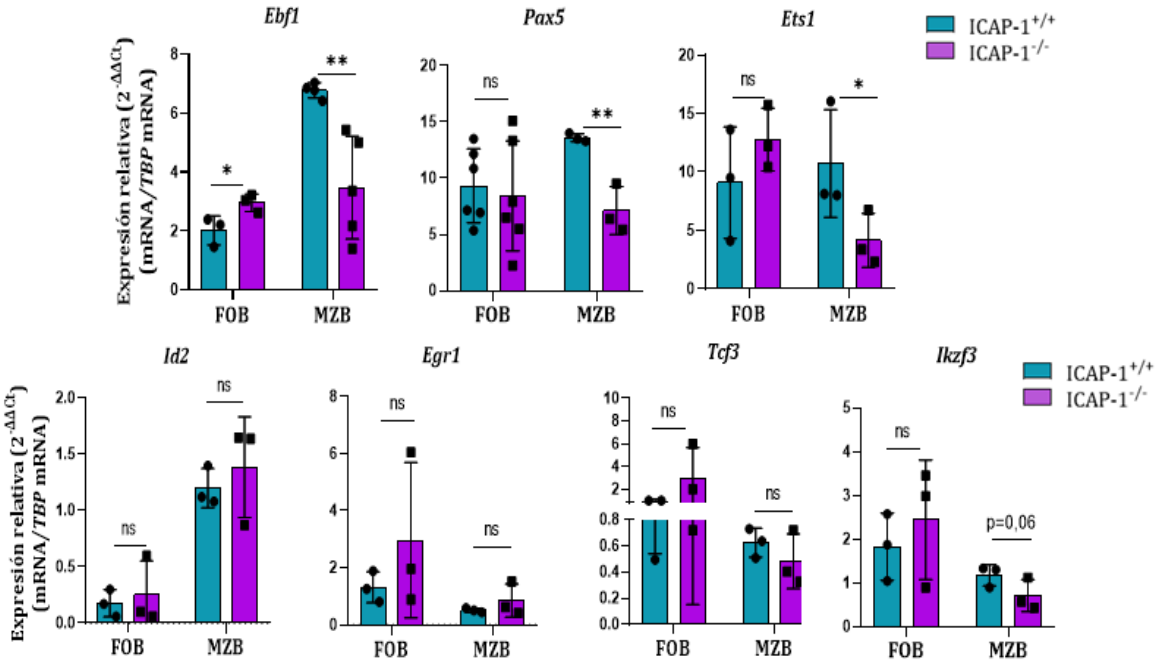


Figura 79. Reducción de la expresión de *Ebf1*, *Pax5* y *Ets1* en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$. Se muestra el análisis de expresión por RT-qPCR de los genes indicados en células FOB y MZB de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ (ns, no significativo, **p<0.01, *p<0.05).

2.10. Expresión de receptores linfocitarios y moléculas de señalización en células MZB deficientes en ICAP-1

La señalización originada tras la interacción de BAFF con su receptor BAFFR es crítica para el desarrollo, activación, diferenciación y supervivencia de las células B, y tiene un papel clave para la generación de células MZB (Rolink & Melchers, 2002; Sasaki *et al*., 2004; Mackay & Schneider, 2009). Los resultados de secuenciación y RT-qPCR revelaron una marcada reducción de la expresión de *Tnfrsf13c*, el gen que codifica para BAFFR, en células MZB de ratones deficientes en ICAP-1 comparado con las células control (**Figura 80**). Sin embargo, el

análisis mediante citometría de flujo mostró tan sólo una pequeña disminución en los niveles de BAFFR en la membrana de células MZB ICAP-1$^{-/-}$, así como en las células FOB (**Figura 81**).

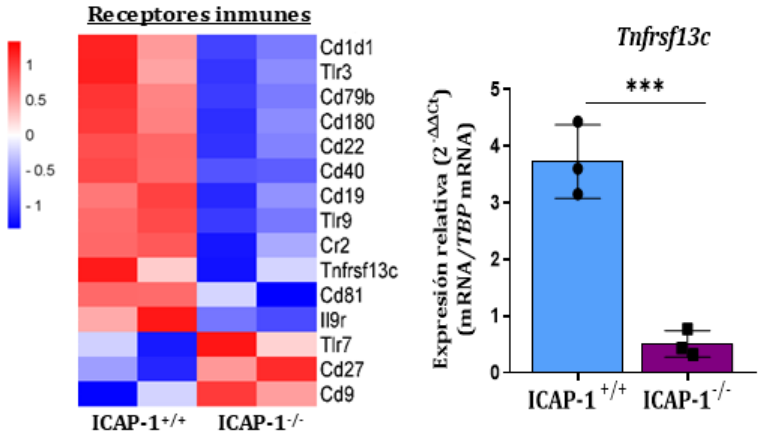


Figura 80. Análisis de la expresión de genes de receptores linfocitarios en células MZB. (Izquierda) *Heatmap* mostrando la expresión diferencial de genes de receptores linfocitarios en células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ (|FC|≥1.5). (Derecha) Análisis por RT-qPCR de la expresión de *Tnfrsf13c* en células MZB (***p<0.001).

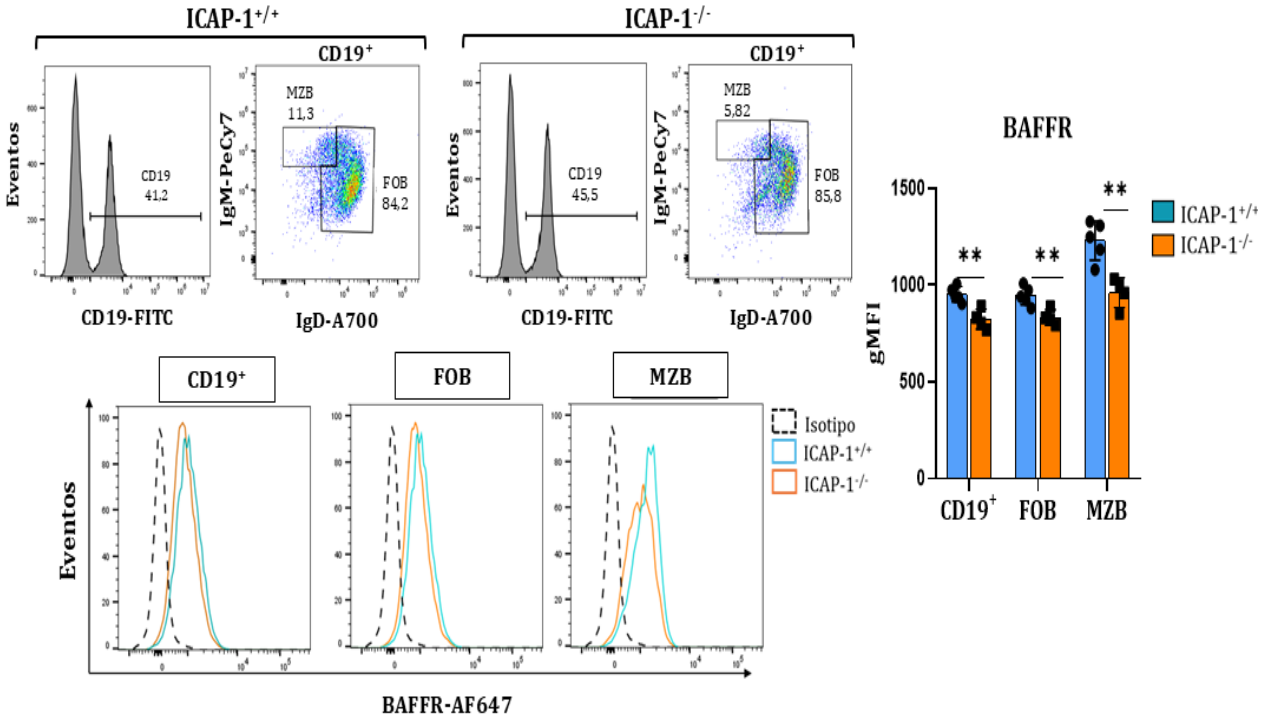


Figura 81. Expresión de BAFFR en linfocitos B de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Se muestran *dot plots* e histogramas representativos de la estrategia de selección del análisis por citometría de flujo de la expresión de BAFFR en linfocitos CD19^{+}, FOB y MZB (izquierda), y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI; derecha), (**p<0.01).

La generación de células MZB implica asimismo a CD19, un correceptor del BCR (Martin & Kearney, 2000; Pillai & Cariappa, 2009; You *et al.*, 2009). Los datos transcriptómicos indicaron que la expresión de *Cd19* era menor en las células MZB deficientes en ICAP-1 que en las células control (**Figura 80**, izquierda). El análisis por citometría de flujo reveló una moderada reducción de los niveles de CD19 en las células MZB que carecen de ICAP-1, mientras que no observamos diferencias significativas de su expresión en las células FOB (**Figura 82**).

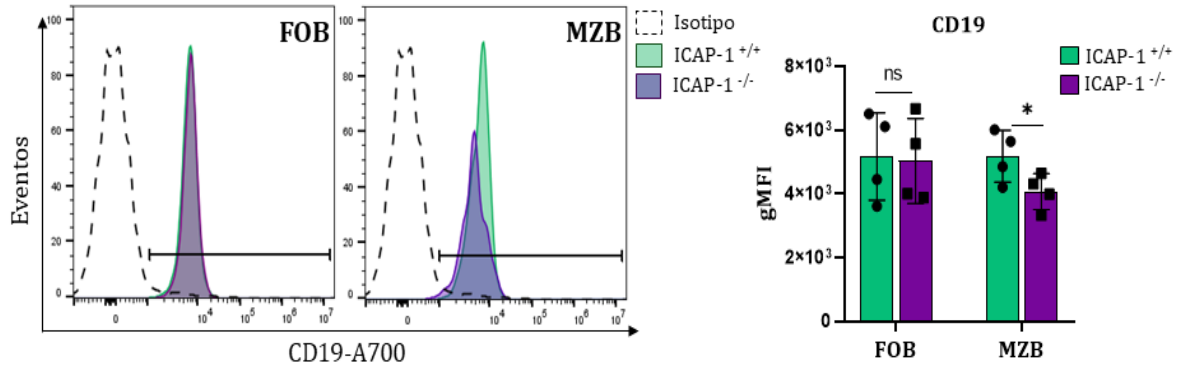


Figura 82. Análisis comparativo de la expresión de CD19 en linfocitos B de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Izquierda) Se muestran histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de CD19 en linfocitos FOB y MZB, identificados con los anticuerpos anti-IgM-PE y anti-IgD-APC. (Derecha) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI), (ns, no significativo, *p<0.05).

CD40 es un receptor implicado en la activación, tanto de células FOB como MZB, tras su unión con su ligando CD40L (CD154) expresado en linfocitos T (Nomura *et al.*, 1995; Oliver *et al.*, 1997; Grewal & Flavell, 1998). Los resultados de secuenciación mostraron que la expresión de *Cd40* era menor en las células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ que en las células ICAP-1$^{+/+}$ (**Figura 80**, izquierda). El análisis por citometría de flujo confirmó la disminución de la expresión de CD40 en las células MZB deficientes en ICAP-1 (**Figura 83A**), mientras que no se observaron alteraciones notables en los niveles de CD40 en las células FOB. CD1d es un receptor utilizado por las células MZB para el reconocimiento de antígenos lipídicos procedentes de la sangre (Roark *et al.*, 1998; Martin & Kearney, 2002; Pillai & Cariappa, 2009). Los datos de RNAseq revelaron una disminución de la expresión de *Cd1d* en células MZB deficientes en ICAP-1 (**Figura 80**, izquierda). Sin embargo, los resultados de citometría de flujo mostraron cambios mínimos en la expresión de CD1d, tanto en células MZB como FOB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ (**Figura 83B**).

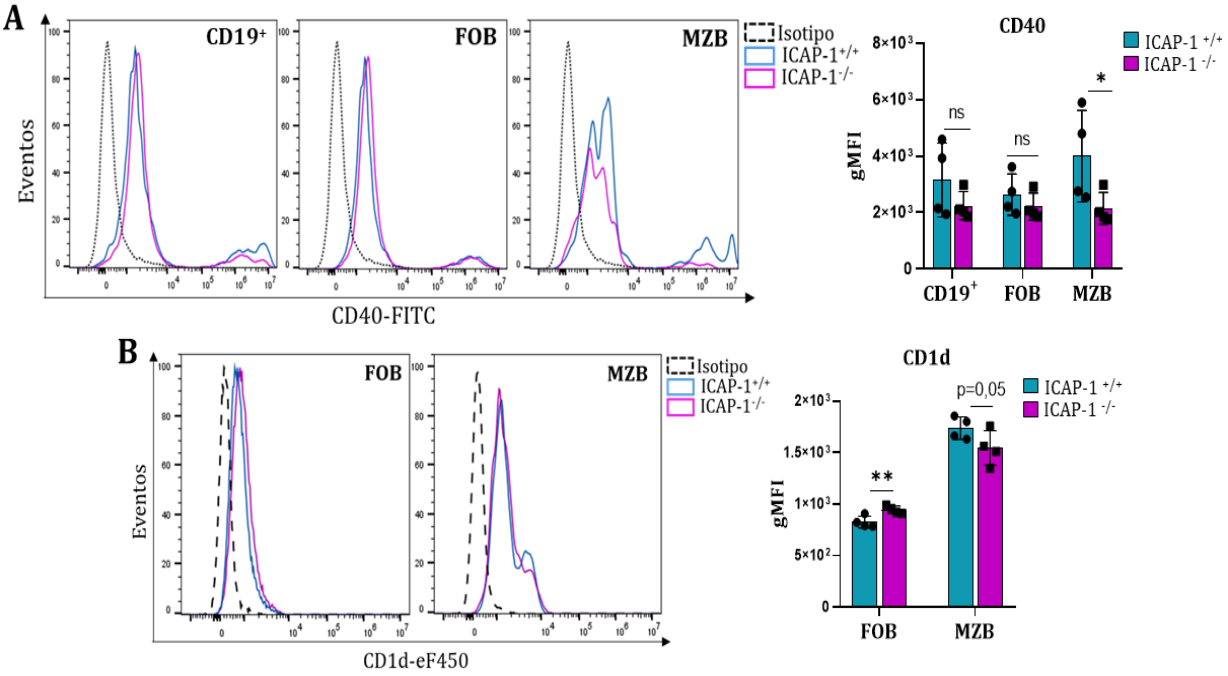


Figura 83. Análisis de la expresión de CD40 y CD1d en linfocitos B de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Izquierda) Se muestran histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de CD40 (**A**) y CD1d (**B**), en linfocitos B de bazo. En los paneles derechos se presentan los datos cuantitativos de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI), (ns, no significativo, **p<0.01, *p<0.05).

Entre los diversos genes implicados en señalización celular y que muestran una expresión diferencial entre las células MZB deficientes en ICAP-1 y las células control, se observa una reducción en la expresión de *Blnk* (**Figura 84A**, superior), cuya proteína Blnk (también denominada SLP-65) juega un papel importante en la señalización desde el BCR y en la proliferación y el desarrollo de células B (Hayashi *et al*., 2000; Xu *et al.,* 2000). Asimismo, los datos transcriptómicos muestran una disminución de los niveles de *Gpr174* en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$. La proteína Gpr174 se acopla a GPCR (*G protein-coupled receptors*), y está implicada en la regulación del desarrollo de células MZB (Wolf *et al*., 2022). La reducción de la expresión de *Blnk* y *Gpr174* en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ fue confirmada mediante RT-qPCR, mientras que sus niveles fueron comparables en células FOB de ratones deficientes en ICAP-1 y ratones control (**Figura 84A**, inferior). La inducción de la expresión de CD86 en respuesta a la activación del BCR depende tanto de Blnk como de Gpr174 (Xu *et al*., 2000; Wolf *et al*., 2022), y por tanto, la disminución de la expresión de ambos genes correlaciona con el bloqueo de la estimulación de la expresión de CD86 en respuesta a la activación del BCR en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ (ver **Figura 69**).

Adicionalmente, los datos de RNAseq mostraron una expresión diferencial de genes implicados en la regulación de la apoptosis, entre los cuales observamos un aumento de la expresión de *Gpx4* en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ comparado con las células control (**Figura 84B**). La proteína Gpx4 (*Glutathione peroxidase-4*) protege a las células de la peroxidación lipídica, y es requerida para prevenir la ferroptosis durante el desarrollo de células MZB (Muri *et al*., 2019). No se han llevado a cabo todavía ensayos de qPCR para confirmar los cambios de los niveles de *Gpx4* en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$. Asimismo, los datos de secuenciación mostraron un aumento en estas células de los niveles de *Casp3,* un factor pro-apoptótico que regula el ciclo de las células B (Woo *et al*., 2003).

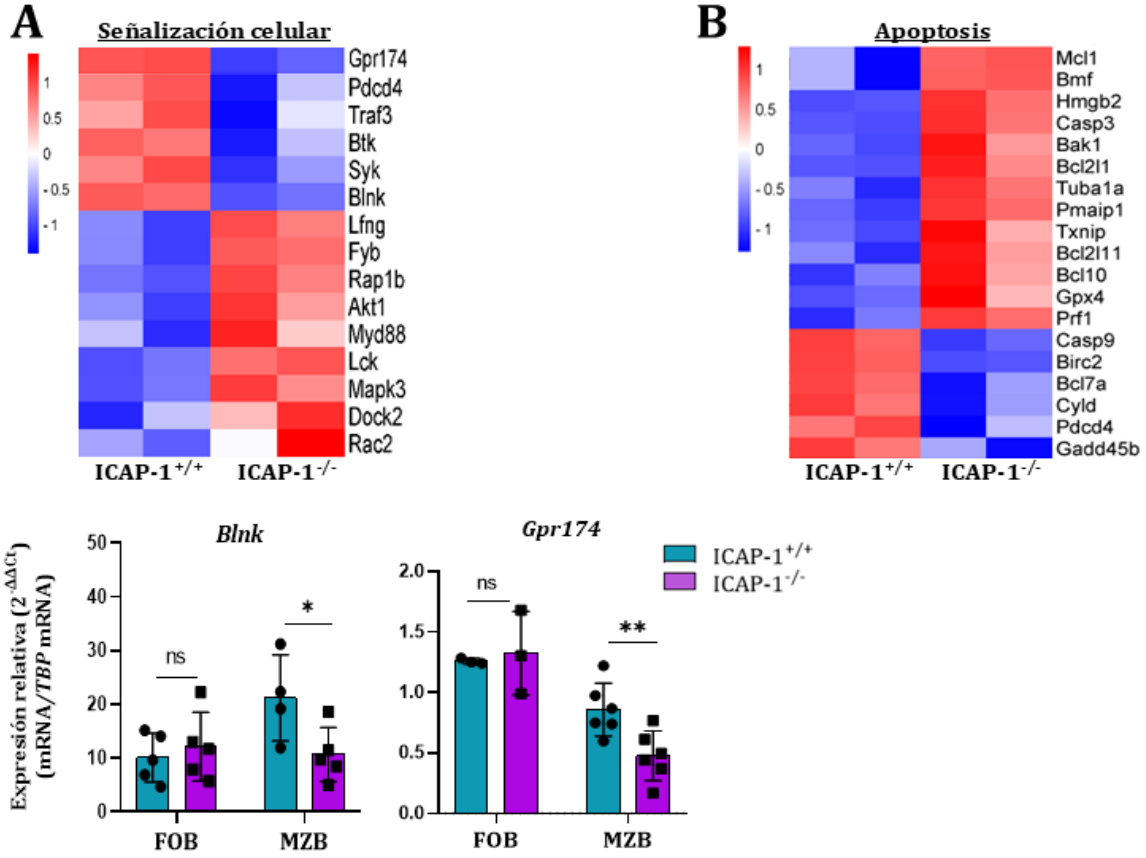


Figura 84. Expresión de genes implicados en señalización celular y apoptosis en células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Superior) *Heatmaps* de genes expresados diferencialmente y que codifican para proteínas de señalización celular (**A**), y de apoptosis (**B**) (|FC|≥1.5). (Inferior) Análisis por RT-qPCR de la expresión de los genes indicados en células MZB y FOB (ns, no significativo, **p<0.01, *p<0.05).

2.11. Expresión de moléculas de migración y posicionamiento en linfocitos B de ratones deficientes en ICAP-1

Alteraciones en la capacidad migratoria de las células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ podrían afectar a su tráfico y posicionamiento, y contribuir a su déficit en la zona marginal. Resultados anteriores mostraron niveles normales de células B B220^{+} en sangre periférica (SP) de ratones ICAP-1$^{-/-}$ (Tesis Doctoral, Silvia Sevilla Movilla, 2019; Sevilla-Movilla *et al*., 2022). Los análisis de citometría de flujo de las poblaciones celulares con fenotipo MZB (CD21^{high}CD23^{-}) y FOB (CD21^{med}CD23^{+}) en SP mostraron niveles mínimos de células MZB, tanto control como deficientes en ICAP-1, y un aumento de la frecuencia de células FOB en los ratones ICAP-1$^{-/-}$ (**Figura 85**).

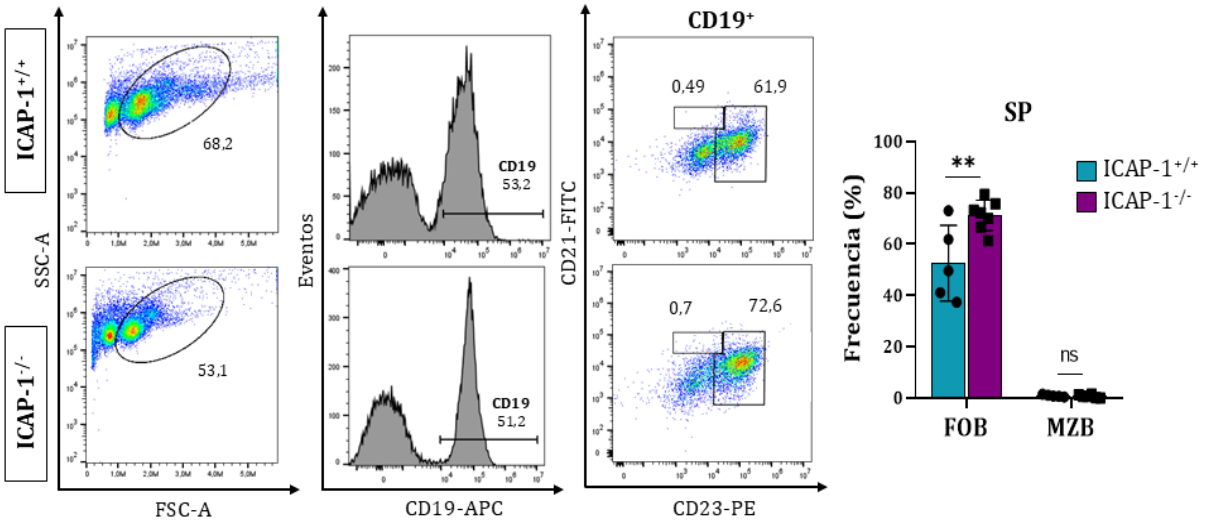


Figura 85. Distribución de poblaciones de células B en sangre periférica de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Izquierda) *Dot plots* e histogramas representativos del análisis por citometría de flujo para la detección de las poblaciones CD19^{+} y de células con fenotipo FOB o MZB en sangre periférica (SP). Se utilizaron anticuerpos anti-CD19-APC, anti-CD21-FITC y anti-CD23-PE para seleccionar las diferentes poblaciones. (Derecha) Se muestra la frecuencia de las poblaciones celulares indicadas (ns, no significativo, **p<0.01).

Para investigar si la reducción de la población de células MZB (CD21^{high}CD23^{-}) en bazos de ratones deficientes en ICAP-1 correlacionaba con un aumento de estas células en LNs, analizamos mediante citometría de flujo su posible presencia empleando anticuerpos frente a CD21 y CD23. Utilizando un *pool* de LNs inguinales, axilares y cervicales, estos análisis no detectaron cantidades significativas de células con un fenotipo MZB en los LNs (**Figura 86**). Estos resultados indican que la disminución de las células MZB de bazos de los ratones ICAP-1$^{-/-}$ no se debía a una distribución anómala de estas células en los LNs. Asimismo, no detectamos diferencias significativas en las poblaciones CD19^{+} y FOB en LNs de ratones ICAP-1$^{-/-}$ en comparación con los ratones control (**Figura 86**).

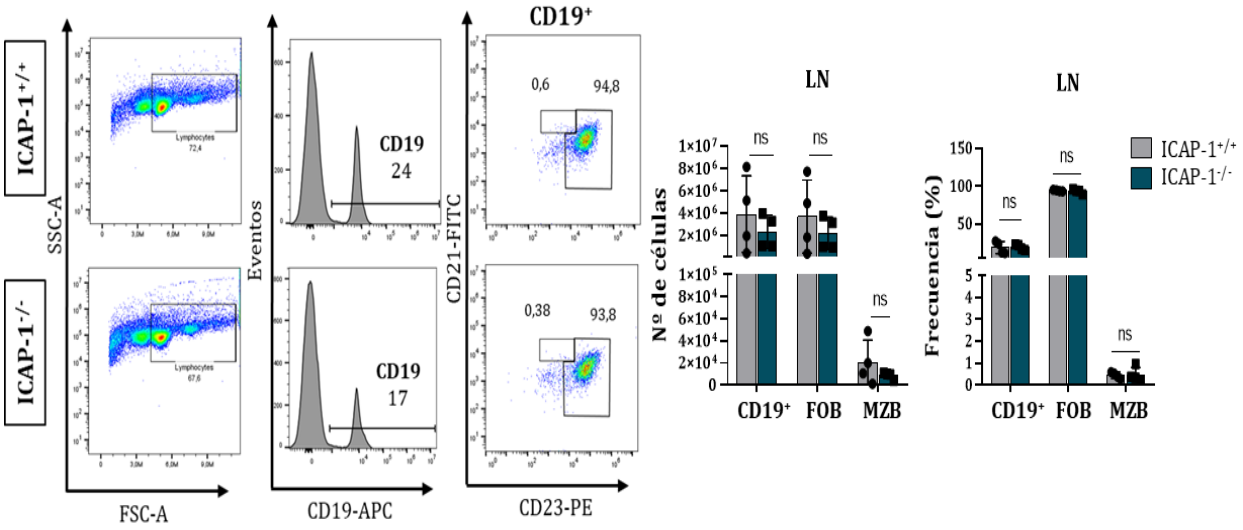


Figura 86. Distribución de células B en LNs de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Izquierda) *Dot plots* e histogramas representativos del análisis por citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-CD19-APC, anti-CD21-FITC y anti-CD23-PE, para la detección de las poblaciones con fenotipos FOB o MZB en LNs. (Derecha) Se muestra la cuantificación de las distintas poblaciones celulares (ns, no significativo).

Los resultados de RNAseq revelaron una expresión diferencial entre células MZB deficientes en ICAP-1 y las células control de genes implicados en procesos de migración y adhesión celular (**Figura 87**). Entre estos genes observamos una disminución de expresión de *S1pr1* y *Cxcr5* en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ comparado con las células control. S1PR1 es un receptor que utilizan los leucocitos para su salida a sangre periférica en respuesta a gradientes de S1P (Chiba *et al.*, 2006; Cyster & Schwab, 2012), y juega un importante papel en la retención y localización de las células MZB en la zona marginal (Cinamon *et al.*, 2004; Cinamon *et al.*, 2008; Cyster & Schwab, 2012). Para el análisis de expresión por citometría de flujo de S1PR1, los linfocitos totales de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron marcados con el anticuerpo anti-CD19-PE para seleccionar la población celular CD19^{+}, o con los anticuerpos anti-CD21-FITC y anti-CD23-PE para distinguir las células FOB y MZB, determinando finalmente la expresión de S1PR1 con anticuerpos anti-S1PR1-APC. Los resultados mostraron niveles significativamente menores de S1PR1 en la población total de células CD19^{+}, así como en las subpoblaciones FOB y MZB deficientes en ICAP-1, que en las células ICAP-1$^{+/+}$ (**Figura 88**).

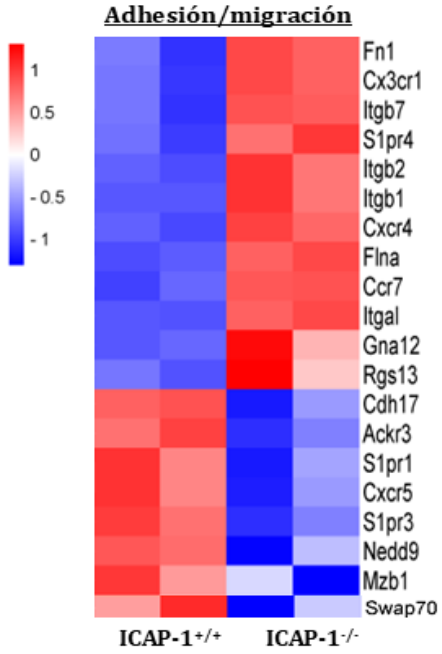


Figura 87. Análisis de la expresión diferencial de genes de adhesión y migración en células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. *Heatmap* de genes implicados en migración y adhesión celular expresados en las células MZB de los ratones ICAP-1$^{-/-}$ e ICAP-1$^{+/+}$ (|FC|≥1.5).

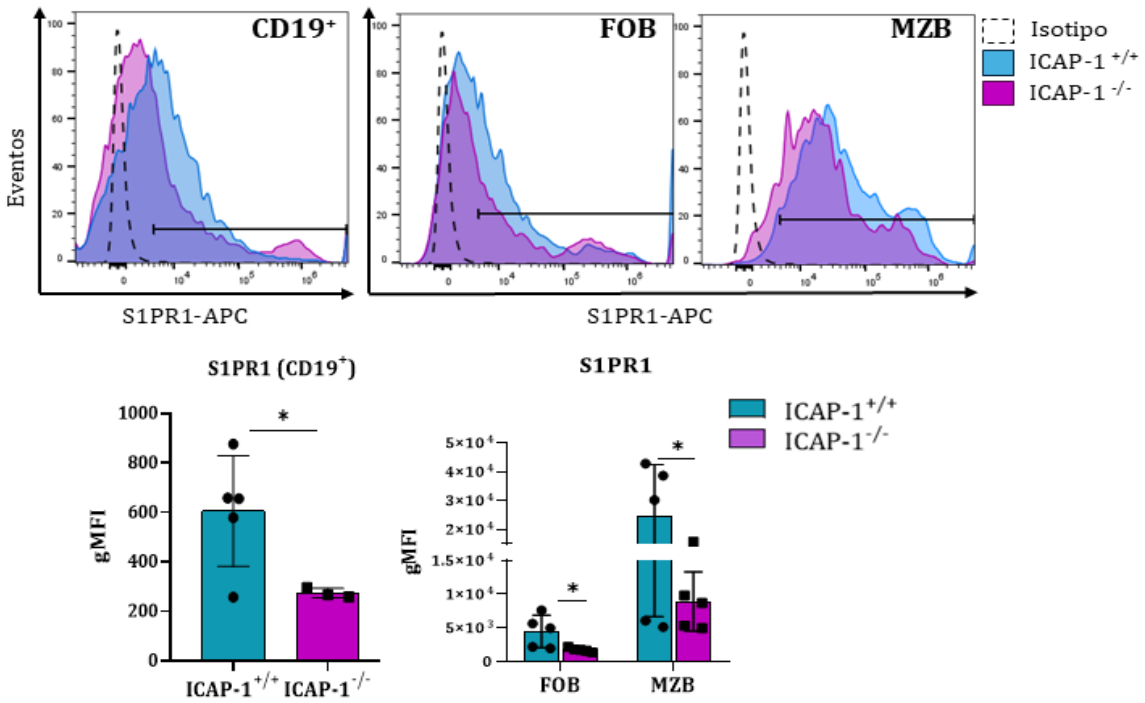


Figura 88. Análisis de la expresión de S1PR1 en células FOB y MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Superior) Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de S1PR1 en las poblaciones celulares indicadas. (Inferior) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI), (*p<0.05).

CXCR5 proporciona capacidad migratoria a los linfocitos B en su tráfico hacia el interior de los folículos en respuesta a CXCL13 (Förster *et al.*, 1996; Ansel *et al.*, 2000). Las células MZB utilizan CXCR5 para desplazarse entre la MZ y los folículos (Cinamon *et al.*, 2008; Cyster & Schwab, 2012). Los análisis mediante citometría de flujo mostraron una expresión significativamente menor de CXCR5 en células MZB ICAP-1$^{-/-}$ que en las de los ratones control, de manera consistente con los resultados de RNAseq, mientras que las células FOB deficientes en ICAP-1 mostraron una mínima reducción (**Figura 89**).

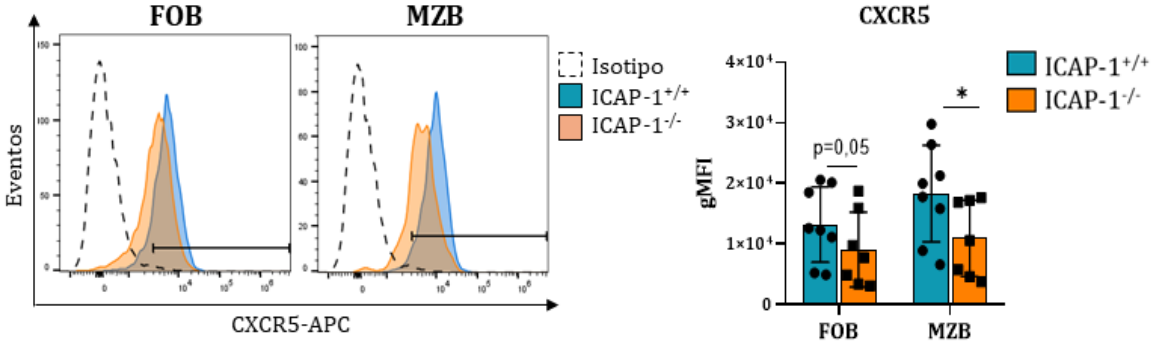


Figura 89. Expresión de CXCR5 en linfocitos FOB y MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Izquierda) Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de CXCR5. (Derecha) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) en las poblaciones indicadas (ns, no significativo, *p<0.05).

Posteriormente analizamos mediante citometría de flujo la expresión de S1PR1 y CXCR5 en nódulos linfáticos. Los linfocitos de un *pool* de LNs inguinales, axilares y cervicales de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ fueron marcados con el anticuerpo anti-CD19-AF700, y a continuación se incubaron con los anticuerpos anti-S1PR1-APC o anti-CXCR5-APC. A diferencia de lo observado en bazo, no detectamos diferencias significativas en la expresión de S1PR1 y de CXCR5 en linfocitos CD19^{+} de LNs entre ambos grupos de ratones (**Figura 90A, B**).

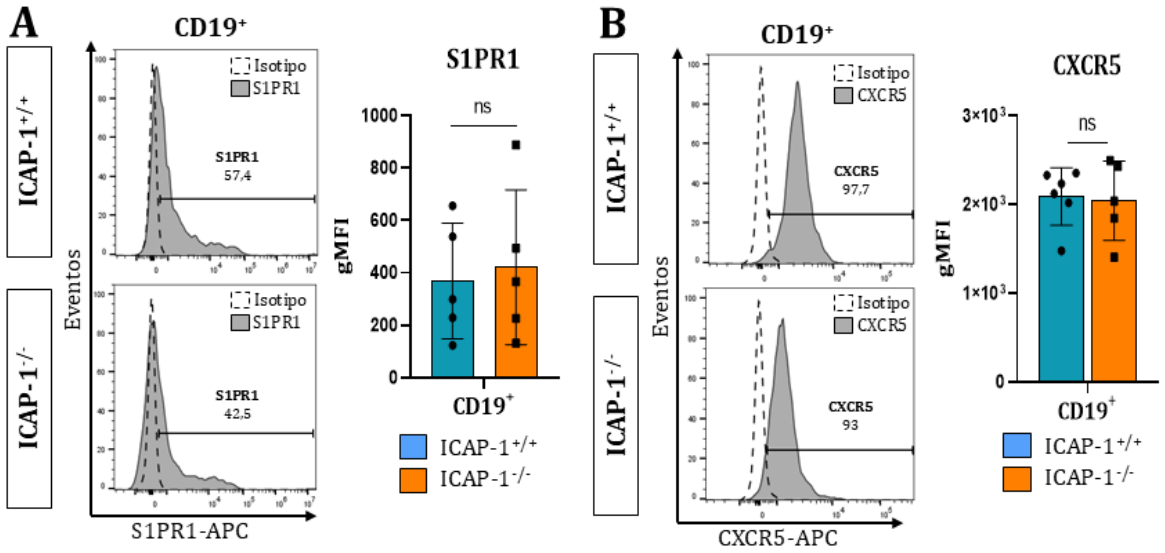


Figura 90. Análisis de la expresión de S1PR1 y CXCR5 en linfocitos de LNs de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. Se muestran histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de S1PR1 y CXCR5 (**A**, **B**; paneles de la izquierda). Los paneles de la derecha presentan las cuantificaciones de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI), (ns, no significativo).

Dado que las células MZB y FOB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ muestran una reducción de la expresión de CXCR5, analizamos su capacidad migratoria hacia la quimioquina CXCL13, el ligando de CXCR5. Para ello, realizamos ensayos de quimiotaxis en respuesta a CXCL13 utilizando células CD19^{+} purificadas de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. El porcentaje de migración de las poblaciones de células FOB y MZB fue cuantificado mediante citometría de flujo, cuyos resultados revelaron una reducción de la migración de ambos tipos celulares deficientes en ICAP-1 en comparación con las células control (**Figura 91**). Estos resultados abren la posibilidad de que una migración alterada pudiera afectar el posicionamiento de células B deficientes en ICAP-1 en diferentes localizaciones del bazo.

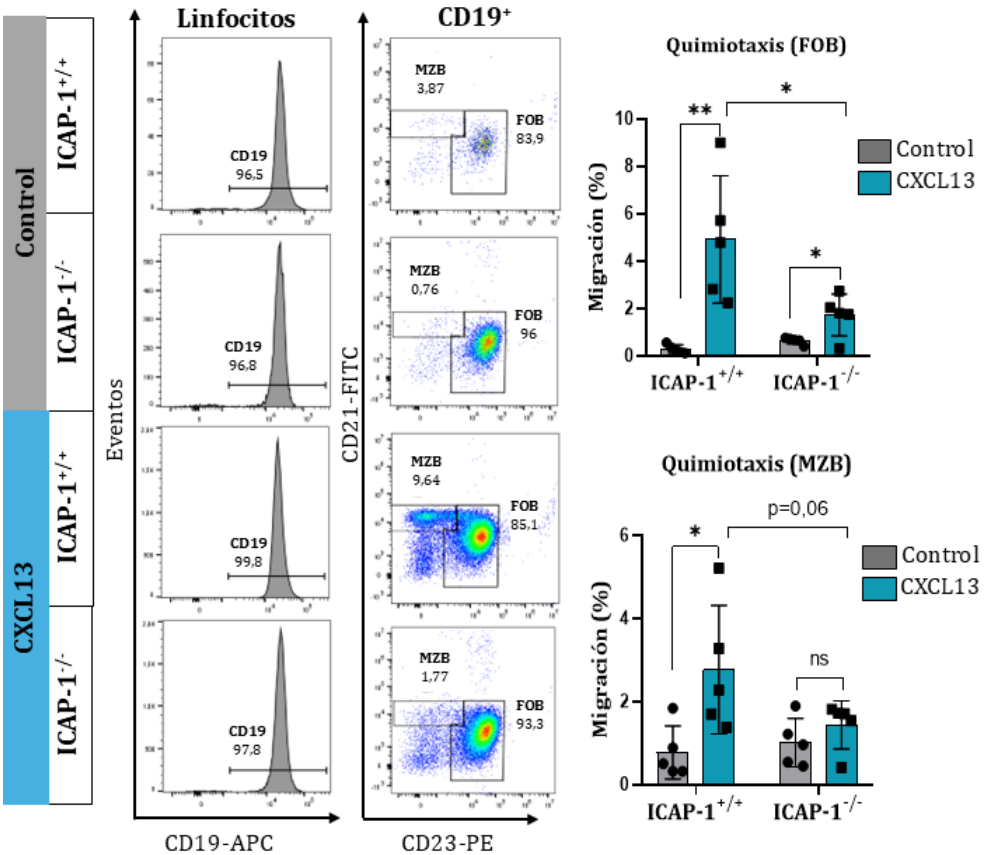


Figura 91. Quimiotaxis de linfocitos FOB y MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ en respuesta a

CXCL13. (Izquierda) *Dot plots* e histogramas representativos de citometría de flujo de la quimiotaxis de linfocitos CD19⁺ hacia CXCL13. (Derecha) Se muestra el porcentaje de migración referido al total de cada población (ns, no significativo, **p<0.01, *p<0.05).

Los resultados de secuenciación mostraron asimismo una expresión incrementada de *Cxcr4* en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ en comparación con las células control (**Figura 87**). El receptor CXCR4 contribuye a la migración de los linfocitos B hacia y dentro de los OLS, donde quedan retenidos en respuesta a la quimioquina CXCL12, la cual se expresa en la médula de los LNs y en la pulpa roja del bazo (Nie *et al.*, 2004; Mueller & Germain, 2009; Griffith *et al.*, 2014). Los análisis de la expresión de CXCR4 por citometría de flujo revelaron niveles similares de CXCR4 en las células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$, mientras que detectamos una expresión menor de CXCR4 en células FOB de ratones deficientes en ICAP-1 que en las células control (**Figura 92A**). Asimismo, analizamos por citometría de flujo la expresión de CXCR4 en linfocitos CD19⁺ de LNs, cuyos resultados mostraron una reducción de la expresión de CXCR4 en linfocitos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ en comparación con los linfocitos control (**Figura 92B**).

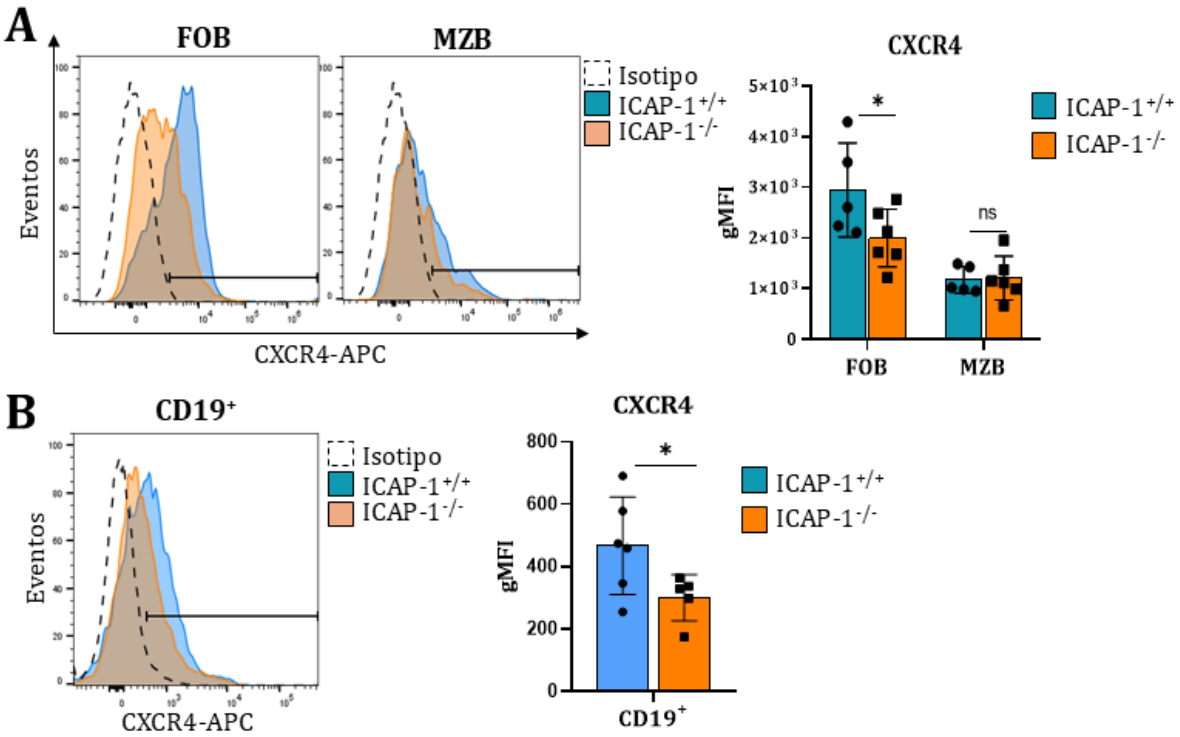


Figura 92. Expresión de CXCR4 en linfocitos B de bazo y LNs de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Izquierda) Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de CXCR4 en células FOB y MZB de bazo (**A**) o en células CD19⁺ de LNs (**B**). (Derecha) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) en las poblaciones indicadas (ns, no significativo, *p<0.05).

Además de S1PR1 y CXCR5, las integrinas α4β1 y αLβ2 (LFA-1) contribuyen al tráfico y posicionamiento de las células MZB en el bazo (Lu & Cyster, 2002). Los resultados de RNAseq revelaron un aumento de expresión de β1 (*Itgb1*) y β2 (*Itgb2*) en células MZB deficientes en ICAP-1 relativo a las células control (**Figura 87**). Los análisis de citometría de flujo mostraron un moderado incremento en la expresión de β1 (CD29) en las células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$, pero no en células FOB (**Figura 93A**). Por el contrario, la expresión de α4 (CD49d) y β2 (CD18) fue comparable entre ambos grupos de animales (**Figura 93B**, **C**).

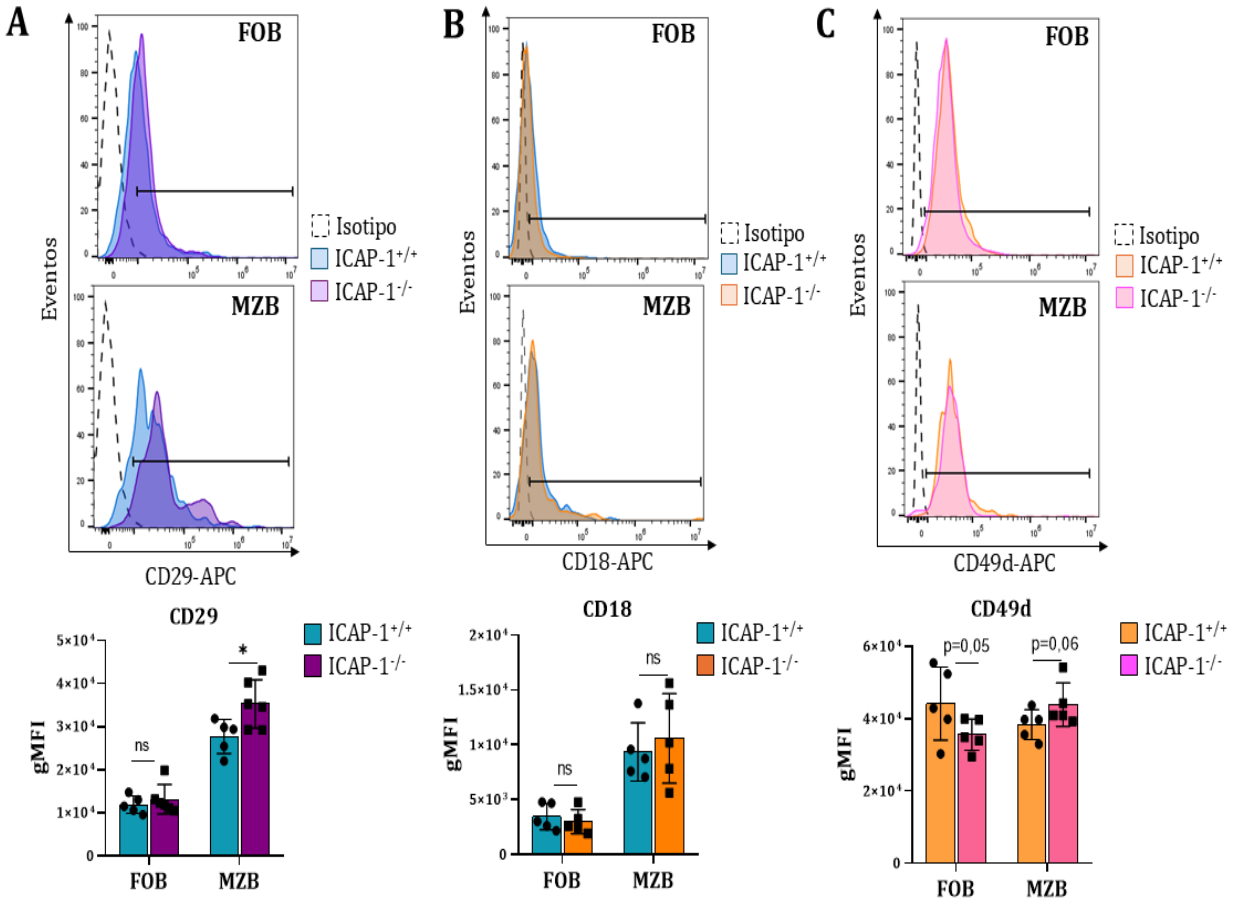


Figura 93. Expresión de β1, β2 y α4 en linfocitos B de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (Superior) Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la expresión de la subunidad β1 (**A**), de la subunidad β2 (**B**) y de la subunidad α4 (**C**), en linfocitos FOB y MZB. (Inferior) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) de las subunidades indicadas de las integrinas (ns, no significativo, *p<0.05).

Los resultados de secuenciación mostraron asimismo una expresión diferencial entre células MZB deficientes en ICAP-1 y células control de genes que regulan la migración y adhesión celular (**Figura 87**). Entre ellos destacan *Mzb1, Nedd9*, *Swap70, Itgβ7* y *Rgs13. Mzb1* codifica para Mzb1, una proteína del retículo endoplasmático de las células MZB que está implicada en la regulación de la activación de las integrinas β1 y en adhesión celular (Flach *et al*., 2010; Andreani *et al*., 2018). *Nedd9* codifica para la proteína Cas-L, la cual regula la migración linfocitaria y está involucrada en el mantenimiento de las células MZB (Seo *et al*., 2005). Asimismo, SWAP-70 está implicada en el desarrollo de las células MZB y en la formación de la zona marginal (Chopin *et al*., 2010). De manera consistente con los resultados de secuenciación (**Figura 87**), el análisis por RT-qPCR reveló una expresión reducida de *Mzb1, Nedd9* y *Swap70* en células MZB deficientes en ICAP-1 (**Figura 94**). Asimismo, estas células mostraron un aumento de *Rgs13*, el cual codifica para Rgs13, una proteína que presenta actividad GTPasa y que regula la migración y quimiotaxis de linfocitos B (Shi *et al*., 2002). El análisis por RT-qPCR de la expresión de *Itgβ7* en células ICAP-1$^{-/-}$ reveló niveles comparables con los obtenidos en células control (**Figura 94**), no pudiéndose así confirmar los resultados de secuenciación (**Figura 87**).

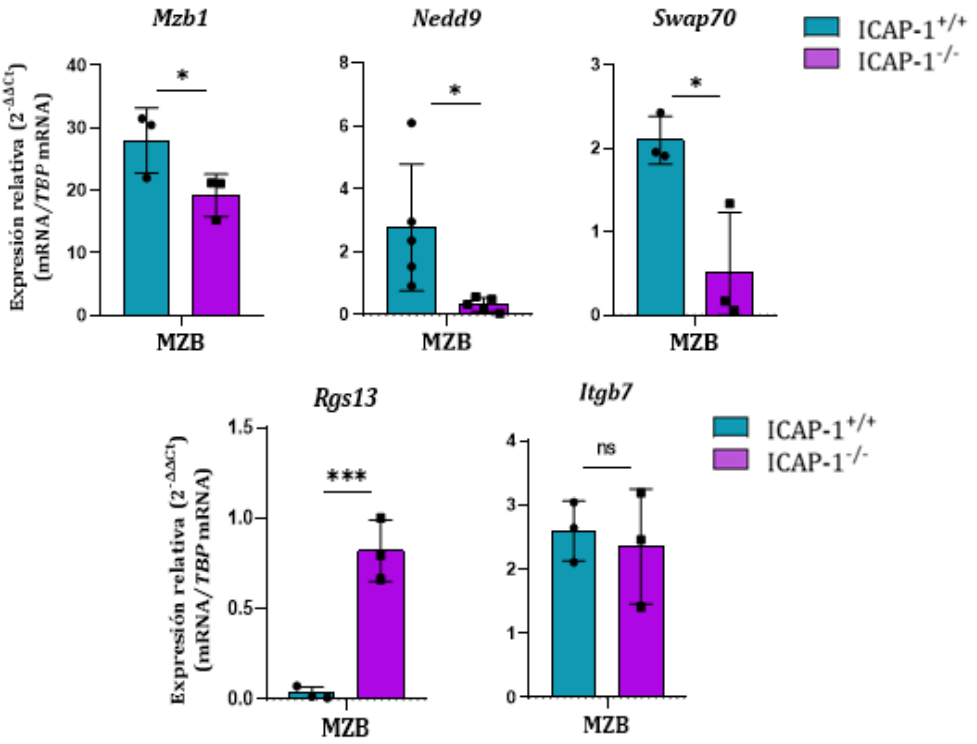


Figura 94. Expresión de genes de adhesión y migración en células MZB. Análisis por RT-qPCR de la expresión de los genes indicados en células MZB de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ (ns, no significativo, ***p<0.001, *p<0.05).

2.12. Los bazos de ratones deficientes en ICAP-1 muestran una inducción de senescencia

Hemos mostrado anteriormente una reducción de la proliferación y apoptosis de linfocitos B CD19^{+} (**Figuras 55** y **57**, respectivamente) y linfocitos T CD4^{+} y CD8^{+} (**Figuras 34** y **35**, respectivamente) en bazos de ratones deficientes en ICAP-1. Estos datos nos llevaron a estudiar la posibilidad de que tenga lugar una inducción de senescencia en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$, dado que la senescencia se caracteriza por un fenotipo de parada estable del ciclo celular, y por resistencia a la apoptosis (Gorgoulis *et al.*, 2019). Para su estudio, y en colaboración con Marta Menéndez García y la Dra. Ana O'Loghlen (Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas), realizamos tinciones de criosecciones de bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ para determinar la actividad β-Galactosidasa (SA-β-Gal), un biomarcador ampliamente utilizado para detectar senescencia (Gorgoulis *et al.*, 2019; Kumari & Jat, 2021). Los resultados mostraron un notable incremento de la actividad de β-Galactosidasa en bazos de ratones deficientes en ICAP-1 en comparación con los ratones ICAP-1$^{+/+}$ (**Figura 95A**). Asimismo, realizamos tinciones de inmunofluorescencia de LaminB1, proteína cuya pérdida actúa como biomarcador de senescencia (Freund *et al.*, 2012), y cuyos resultados mostraron una reducción significativa de la expresión de LaminB1 en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ relativo a la de los ratones control (**Figura 95B**).

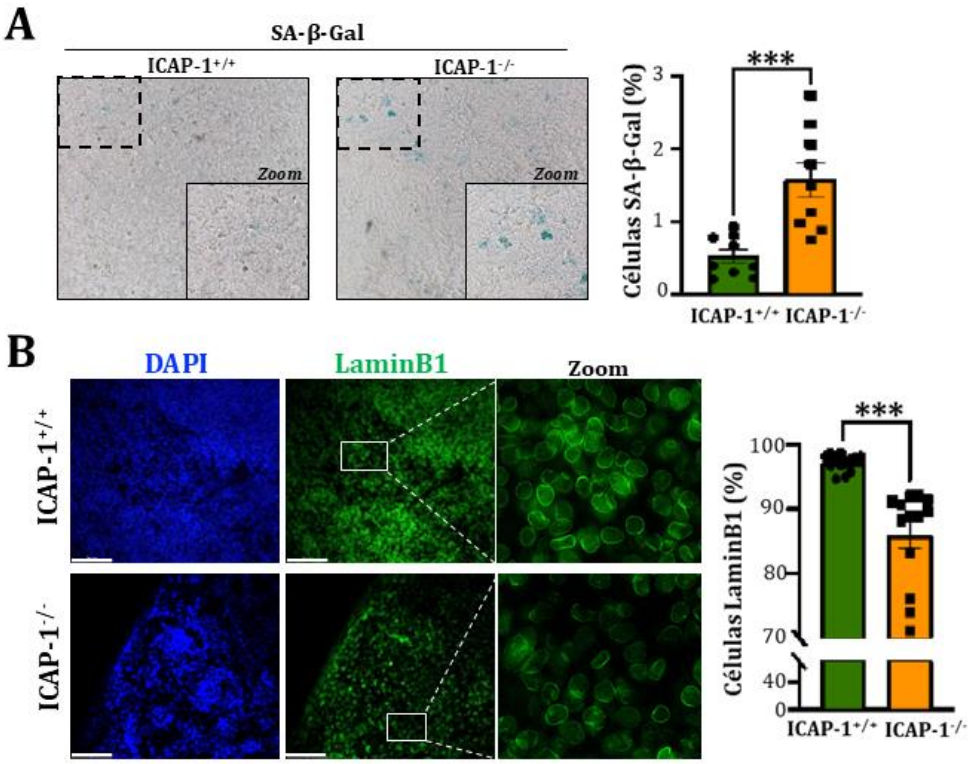


Figura 95. Análisis de senescencia en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$. (**A**) Se muestran imágenes representativas (izquierda) y cuantificación (derecha) de la tinción de actividad β-galactosidasa (SA-β-Gal; células azules) en bazos de ratones ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$. (**B**) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de la expresión en bazos de LaminB1 (detectada mediante el anticuerpo anti-LaminB1+AF488) (izquierda), y cuantificación del porcentaje de células positivas para LaminB1 (derecha). Los datos muestran la media ± SEM de 2-5 áreas diferentes por imagen de cada ratón (n=3 ratones). Barras de escala 75 μm (***p<0.001).

Para confirmar la activación de la senescencia en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$, realizamos una co-tinción de SA-β-Gal y LaminB1, cuantificando los niveles de coexpresión de LaminB1 en las áreas positivas y negativas para la actividad de SA-β-Gal. Los resultados mostraron que la proporción del marcaje con LaminB1 disminuyó significativamente en las áreas positivas para SA-β-Gal en comparación con las áreas negativas para SA-β-Gal (**Figura 96**). Todos estos datos sugieren una inducción de senescencia en las células de bazos deficientes en ICAP-1.

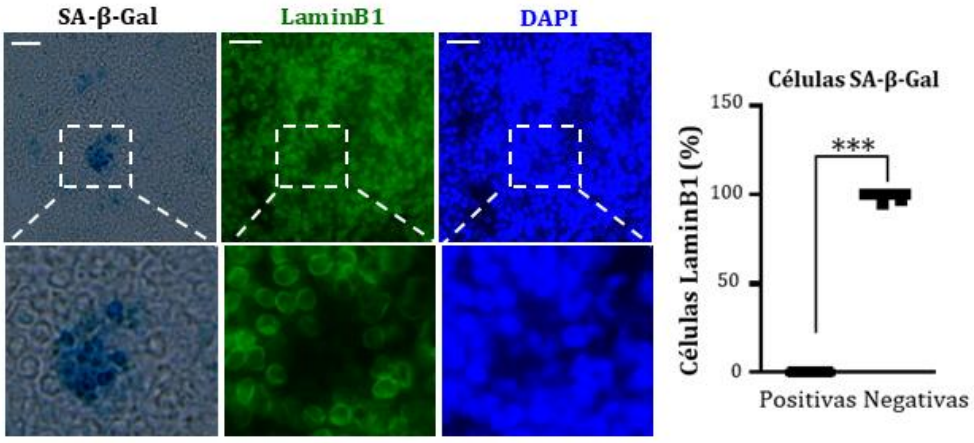


Figura 96. Análisis de coexpresión de actividad β-Galactosidasa y de LaminB1. (Izquierda) Imágenes representativas de histología e inmunofluorescencia mostrando simultáneamente la tinción negativa para LaminB1 en células positivas para SA-β-Gal en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$. (Derecha) Cuantificación del porcentaje de tinción de LaminB1 en las áreas positivas y negativas para la tinción de SA-β-Gal. Los datos muestran la media ± SEM de 2-5 áreas diferentes por imagen de cada ratón (n=3 ratones). Barras de escala 50 μm (***p<0.001).

3. Regulación de la expresión de miRNAs en la adhesión dependiente de la integrina α4β1 en células de mieloma múltiple.

3.1. Análisis diferencial de la expresión de miRNAs en células de MM adheridas a ligandos de α4β1

La adhesión dependiente de la integrina α4β1 es esencial para el alojamiento y tráfico de células de mieloma múltiple (MM) en la médula ósea (MO), y contribuye a la progresión de la enfermedad (Sanz-Rodriguez *et al.,* 1999; Mori *et al.,* 2004; Olson *et al*., 2005). Para investigar si la adhesión mediada por esta integrina puede regular la expresión de miRNAs en células de MM, empleamos tres líneas celulares de MM que expresan α4β1: NCI-H929, MM.1S y U266. Uno de los principales ligandos de α4β1 es la fibronectina (FN) (Wayner *et al.*, 1989; Guan *et al*., 1990), la cual está altamente expresada en el microambiente de la MO, y para el presente estudio se ha utilizado el fragmento recombinante FN-H89, el cual contiene el fragmento CS-1 de la FN (Mould *et al.*, 1994). Los resultados mostraron una adhesión específica de las tres líneas celulares de MM a FN-H89 (**Figura 97**), la cual fue totalmente bloqueada por el anticuerpo anti-α4 ALC 1/63 (no mostrado), confirmando la especificidad de la adhesión. La adhesión a tiempos largos no afectó a la viabilidad de las células, como se comprobó en ensayos utilizando CCK8 (datos no mostrados; Rodríguez-García *et al*., 2023).

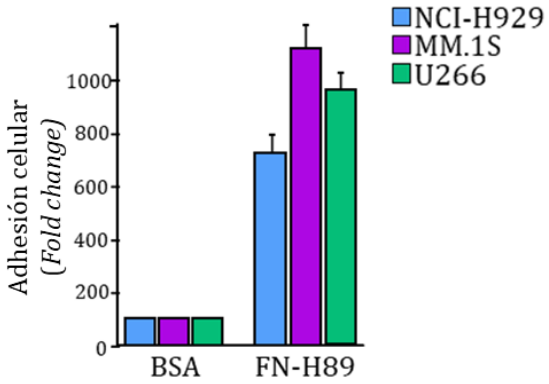


Figura 97. Adhesión de células de MM dependiente de la integrina α4β1. Cuantificación normalizada (BSA=100) del número de células adheridas (18 h) en ausencia (BSA) o presencia de FN-H89 de las líneas celulares de MM indicadas (n=4).

Una vez puesta a punto la adhesión dependiente de α4β1, procedimos al análisis de la posible inducción de la expresión de miRNAs tras la adhesión. Las células NCI-H929, MM.1S y U266 en suspensión y adheridas a FN-H89 fueron lisadas para la obtención de sus RNAs, los cuales fueron sometidos a secuenciación de *small RNA* para detectar miRNAs que se expresen diferencialmente entre la condición de células adheridas a FN-H89 y la condición de células en suspensión. Los resultados mostraron un total de 40 miRNAs expresados diferencialmente en la condición de adhesión frente a suspensión, de los cuales el 42% mostraban un aumento de expresión, mientras que el 57% presentó una disminución de sus niveles en la condición de adhesión (**Figura 98**). El modelo estadístico utilizado para este análisis incorporó la condición de interés, suspensión *versus* adherente, teniendo en cuenta asimismo el factor de línea celular.

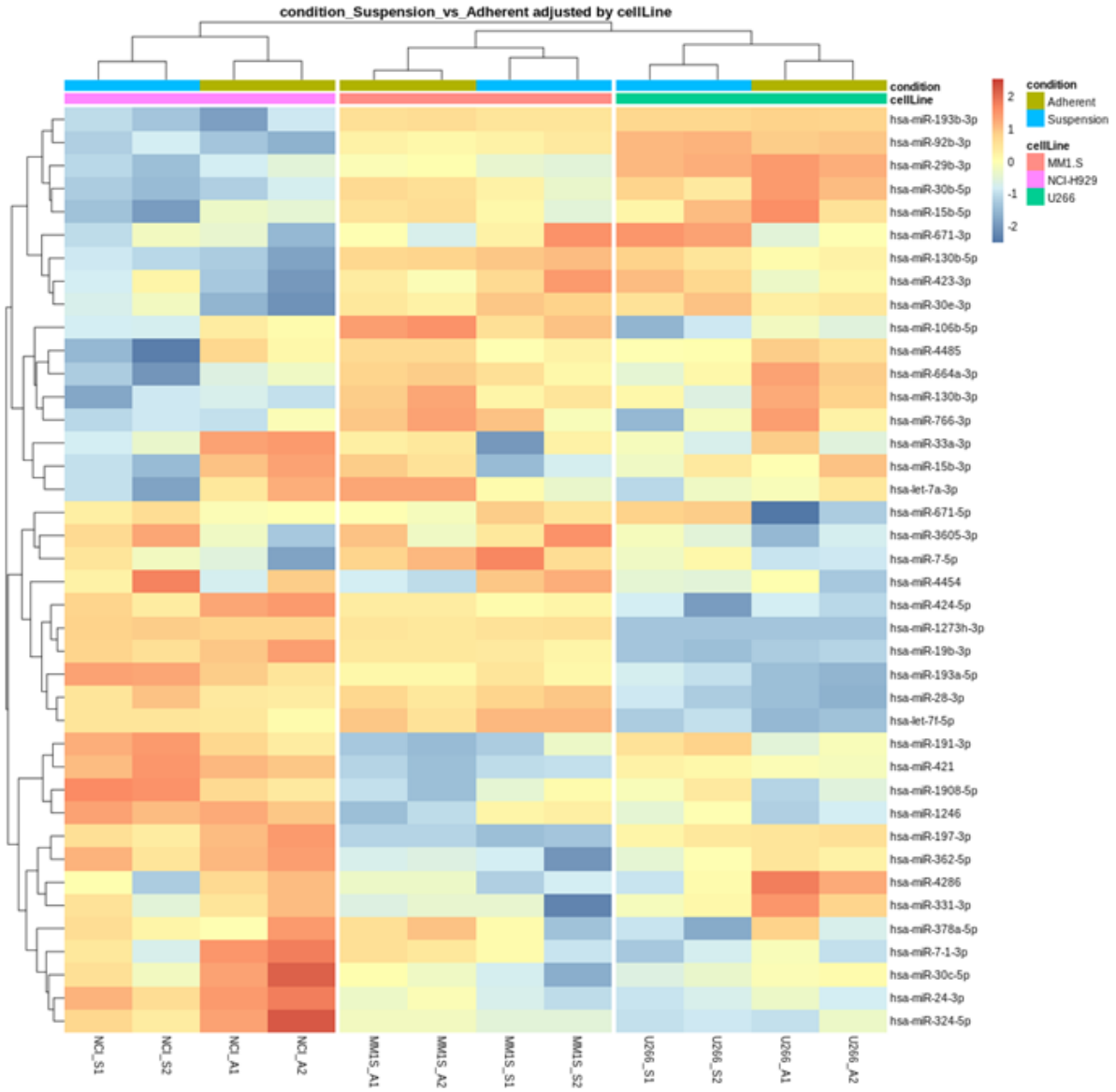


Figura 98. Secuenciación de miRNAs en células NCI-H929, MM.1S y U266 en suspensión y adheridas a FN-H89. *Heatmap* de las cuentas normalizadas log10 de los 40 miRNAs con expresión diferencial obtenidos con una tasa de FDR 0.10 (Suspensión/adherente). Se muestran las condiciones adherentes (A1 y A2) y en suspensión (S1 y S2).

De estos 40 miRNAs, se seleccionaron aquellos que mostrasen un Log_2 *fold change* absoluto mayor de 0.5 y un *baseMean* mínimo de 65. El *baseMean* se refiere a la media de cuentas normalizadas a lo largo de todas las muestras para un miRNA específico. De los 40 miRNAs iniciales, se seleccionaron únicamente 14 que cumplían con las condiciones previas, y que mostraron cambios significativos en su expresión entre las condiciones de Suspensión *versus* Adhesión (**Tabla 11**). De estos 14 microRNAs, 9 de ellos mostraron una expresión reducida, lo que indica un aumento de expresión en células adheridas a FN-H89, lo que sugiere que estos 9 miRNAs podrían participar en la regulación de procesos celulares asociados a la adhesión mediada por α4β1. Varios de dichos miRNAs han sido relacionados previamente con diferentes etapas de la progresión del MM, entre ellos miR-193b-3p, miR-324-5p, miR-331-3p y miR-424-5p (Unno *et al.*, 2009; Zhou *et al.,* 2010; Corthals *et al.*, 2011; Tang *et al*., 2018).

	baseMean	log_2FC	padj		baseMean	log_2FC	padj
hsa-let-7a-3p	15	-1.17	0.00776373	hsa-miR-30e-3p	994	0.26	0.03392761
hsa-let-7f-5p	54355	0.25	0.07974571	→ hsa-miR-324-5p	68	-0.54	0.09917113
hsa-miR-106b-5p	835	-0.21	0.04361873	→ hsa-miR-331-3p	134	-0.77	0.03284187
→ hsa-miR-1246	114	0.71	0.01858221	hsa-miR-33a-3p	17	-1,00	0.03284187
hsa-miR-1273h-3p	52	0.64	0.06082913	hsa-miR-3605-3p	14	1.40	0.03322701
→ hsa-miR-130b-3p	1291	-0.62	0.00495146	→ hsa-miR-362-5p	126	-0.58	0.04361873
→ hsa-miR-130b-5p	141	0.51	0.01467974	hsa-miR-378a-5p	44	-0.67	0.09789865
→ hsa-miR-15b-3p	280	-0.56	0.00230029	hsa-miR-421	1024	0.32	0.05540024
hsa-miR-15b-5p	2029	-0.29	0.05609010	→ hsa-miR-423-3p	5026	0.61	0.00044633
hsa-miR-1908-5p	23	0.94	0.00764918	→ hsa-miR-424-5p	173	-1.07	0.01333190
→ hsa-miR-191-3p	160	0.70	0.00046507	hsa-miR-4286	14	-1.20	0.01467974
hsa-miR-193a-5p	27	1.03	0.01858221	→ hsa-miR-4454	571	0.62	0.09336752
→ hsa-miR-193b-3p	304	-0.65	0.00764918	hsa-miR-4485	36	-2.52	0.00000029
hsa-miR-197-3p	1300	-0.45	0.02063071	→ hsa-miR-664a-3p	76	-0.87	0.00087373
hsa-miR-19b-3p	2205	-0.35	0.07941021	hsa-miR-671-3p	463	0.33	0.05946799
hsa-miR-24-3p	373	-0.32	0.04361873	hsa-miR-671-5p	14	0.79	0.09158251
hsa-miR-28-3p	2724	0.31	0.03999384	hsa-miR-7-1-3p	51	-0.71	0.01858221
hsa-miR-29b-3p	257	-0.48	0.01145095	hsa-miR-7-5p	34	0.67	0.09917113
hsa-miR-30b-5p	2069	-0.25	0.03949914	→ hsa-miR-766-3p	75	-0.96	0.03284187
hsa-miR-30c-5p	351	-0.38	0.02023448	hsa-miR-92b-3p	13120	0.40	0.01858221

Tabla 11. Expresión diferencial de miRNAs en células de MM dependiente de la adhesión mediada por α4β1. Se ajustó por cada línea celular la condición *_Supension_versus_Adherent_*. Las flechas indican los miRNAs con log_2FC absoluto> 0.5 y lecturas en *baseMean* >65.

3.2. Aumento de expresión de miR-324-5p y miR-331-3p en células de MM tras adhesión a ligandos de la integrina α4β1

Decidimos enfocar nuestro estudio en los miRNAs miR-324-5p y miR-331-3p, utilizándolos como modelos en células NCI-H929 adheridas a FN-H89, dado que estos miRNAs tienen como diana la señalización de *Hedgehog* (Hh), la cual contribuye a la progresión del MM (Peacock *et al*., 2007; Blotta *et al*., 2012). El aumento de expresión de miR-324-5p y miR-331-3p fue corroborado por RT-qPCR tras adhesión celular a FN-H89, confirmando los datos de secuenciación (**Figura 99A**).

Para determinar que el incremento de expresión de estos miRNAs es debido a la adhesión mediada por α4β1, silenciamos su subunidad α4 mediante nucleofección en las células NCI-H929. Este silenciamiento fue comprobado mediante citometría de flujo, observándose una disminución de los niveles de α4 (**Figura 99B**, izquierda). Los transfectantes silenciados y sus respectivos controles, fueron sometidos a adhesión a FN-H89, tras lo cual se extrajo su RNA para realizar RT-qPCR y analizar la expresión de los miRNAs. Detectamos una disminución significativa de la adhesión de las células NCI-H929 silenciadas para α4 en comparación con las células transfectadas con siRNA control (**Figura 99B**, centro), lo que correlacionó con una menor expresión de miR-324-5p y miR-331-3p (**Figura 99B**, derecha). Estos datos confirman que la inducción de la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p es dependiente de la adhesión mediada por α4β1.

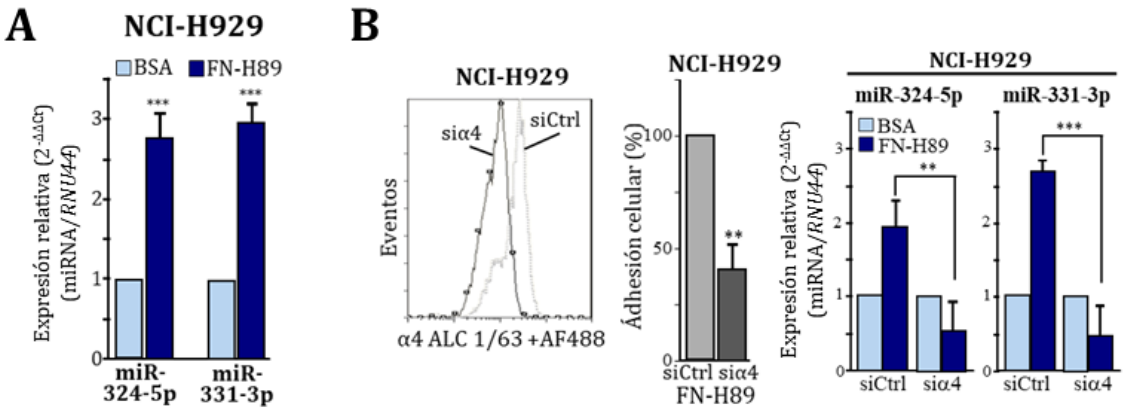


Figura 99. Inducción de la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p tras adhesión de células de MM mediada por α4β1. (**A**) Análisis por RT-qPCR de la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p en células NCI-H929 tras 18 h de adhesión a FN-H89. La condición BSA fue normalizada a 1 (n=3-4). (**B**, izquierda) Análisis por citometría de flujo de la expresión de la subunidad α4 en células NCI-H929 trasfectadas con siRNA control o siα4. (Centro) Cuantificación de la adhesión a FN-H89 (18 h) de los transfectantes indicados (n=2-3). (Derecha) Expresión de miR-324-5p y miR-331-3p en los transfectantes indicados tras 18 h de adhesión (n=2-3), (***p<0.001, **p<0.01).

Posteriormente, analizamos la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p en pacientes con MM. Para ello, obtuvimos muestras de RNA de células CD138⁺ de MO de pacientes con MM a diagnóstico, y muestras de RNA de células CD138⁺ de donantes sanos (colaboración con los Dres. Joaquín Martínez López y Antonio Valeri, Hospital 12 de Octubre, Madrid). Estas muestras fueron analizadas por RT-qPCR, mostrando que de los 14 pacientes, 6 de ellos expresaban miR-324-5p (43%), y 4 de ellos miR-331-3p (29%). Asimismo, tres de estas muestras (pacientes nº 2, 7 y 10) coexpresaban ambos microRNAs (**Figura 100**).

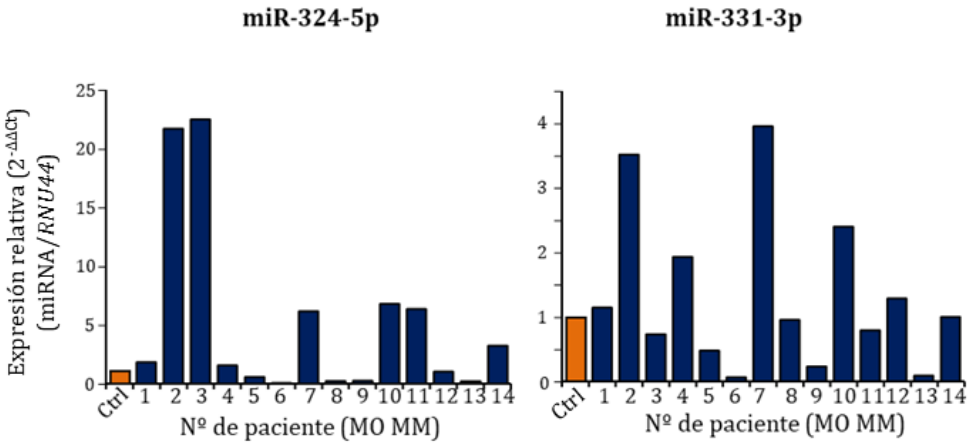


Figura 100. Expresión de miR-324-5p y miR-331-3p en muestras de MO de pacientes con MM. Análisis por RT-qPCR de la expresión de los miRNAs indicados en muestras de RNA de células CD138⁺ de MO de pacientes con MM a diagnóstico. Como control se empleó RNA de células CD138⁺ obtenidas de donantes sanos.

3.3. La inducción de la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p tras adhesión dependiente de α4β1 es dependiente de la activación de PI3K/Akt y ERK1/2

Dado que la adhesión mediada por las integrinas contribuye a la activación de rutas de señalización celular (Ivaska & Heino, 2011; Cooper & Giancotti, 2019), analizamos la posible contribución de las vías MAPK, PI3K/Akt y Src en la inducción de la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p en la adhesión dependiente de α4β1. Para ello, expusimos a las células NCI-H929 a triciribina (inhibidor de pAkt), SCH772984 (inhibidor de pERK1/2) o a saracatinib (inhibidor de pSrc) durante su adhesión a FN-H89. Las células mostraron una reducción significativa de su adhesión cuando se incubaron en presencia de triciribina o de

SCH772984 (**Figura 101A**, izquierda), lo que se correlacionó con una inhibición de la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p en comparación con los controles (**Figura 101A**, derecha). Por el contrario, la incubación con saracatinib no alteró significativamente la adhesión de las células de MM a FN-H89, ni la expresión de estos miRNAs (**Figura 101A**, izquierda y derecha). El correcto funcionamiento de los fármacos fue corroborado mediante ensayos de *Western blotting* a partir de lisados de células NCI-H929 adheridas a FN-H89 e incubadas en presencia de los inhibidores, utilizando anticuerpos frente a las formas fosforiladas y totales de Akt, ERK1/2 y Src (**Figura 101B**). Estos resultados demuestran que el incremento de la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p tras adhesión mediada por α4β1 implica la actividad de las vías PI3K/Akt y MAPK.

Una de las dianas de miR-324-5p es SMO (*Smoothened*), un componente de la vía *Hedgehog* (Ferretti *et al*., 2008; Tang *et al*., 2018). Para comprobar si *SMO* está regulado por miR-324-5p, silenciamos miR-324-5p en células NCI-H929 mediante un miRIDIAN *hairpin inhibitor* (**Figura 101C**, izquierda). Este silenciamiento se tradujo en un aumento de expresión de *SMO* en las células adheridas a FN-H89 en comparación con los transfectantes control (**Figura 101C**, derecha), lo que sugiere que miR-324-5p limita los niveles de *SMO* durante la adhesión de células de MM mediada por α4β1.

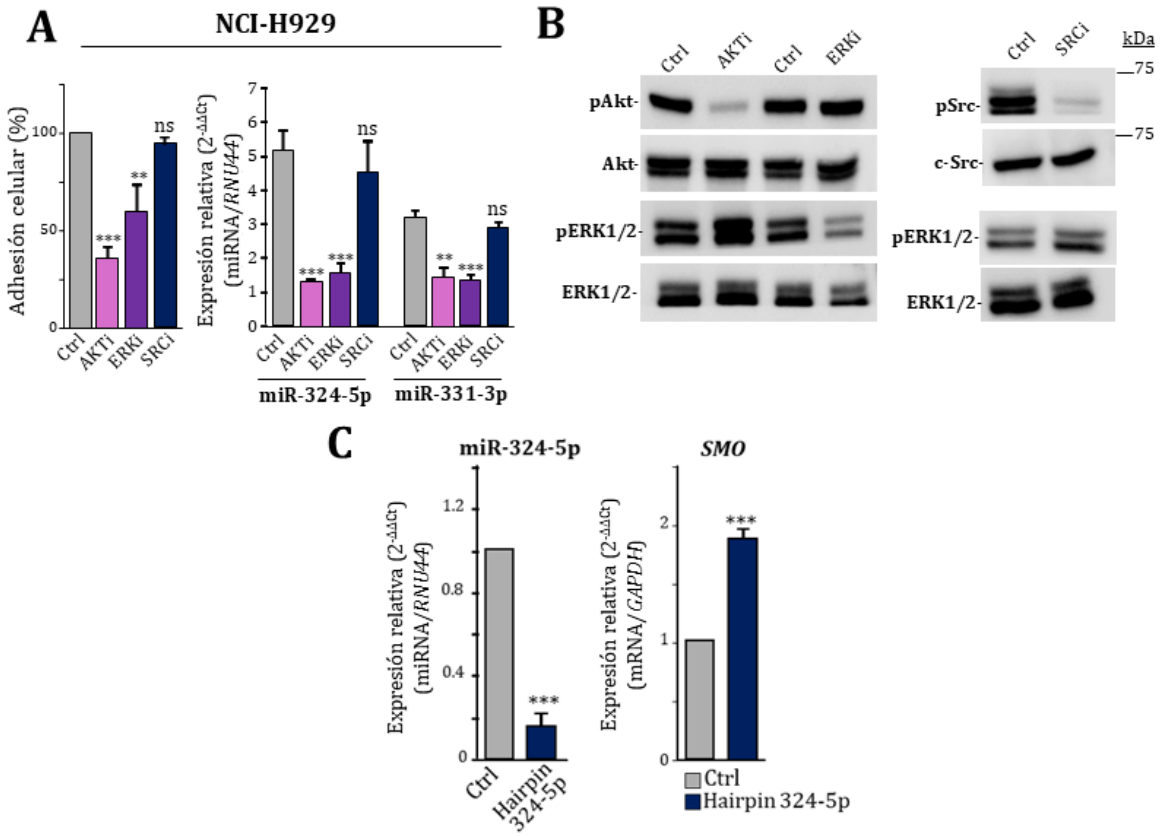


Figura 101. Señalización celular requerida para el aumento de expresión de miRNAs tras adhesión de células de MM dependiente de α4β1, e identificación del módulo miR-324-5p-*SMO* regulado por dicha adhesión. (**A**) Las células NCI-H929 fueron sometidas a ensayos de adhesión a FN-H89 (18 h) en ausencia (Ctrl) o en presencia de triciribina (AKTi; 1 μM), SCH772984 (ERKi; 1 μM) o saracatinib (SRCi; 0.5 μM), y la expresión de los miRNA indicados en las células adheridas analizados por RT-qPCR (n=3). (**B**) Se muestran resultados representativos de *Western blotting* de los niveles de fosforilación de Akt, ERK1/2 y Src en células NCI-H929 adheridas a FN-H89 en presencia de los inhibidores indicados previamente (n=3). (**C**) Las células NCI-H929 fueron transfectadas con un inhibidor control o con miRIDIAN *hairpin* 324–5p *inhibitor*, y se analizó la expresión de miR-324-5p (izquierda) y *SMO* (derecha) por RT-qPCR en las células adheridas a FN-H89 (n=2-3), (ns, no significativo, ***p<0.001, **p<0.01).

DISCUSIÓN

1. Papel de ICAP-1 en el desarrollo de los timocitos.

En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado el papel de ICAP-1 en el desarrollo y función de células inmunes utilizando ratones deficientes en ICAP-1. Resultados previos mostraron que la falta de ICAP-1 no afecta al compartimento de células HSC y MPP de la MO, ni a la linfopoyesis temprana de células B (Tesis Doctoral, Silvia Sevilla Movilla, 2019).

El análisis de las distintas subpoblaciones de timocitos mostró una deficiente generación de la población SP $CD8^+$ $TCR\alpha\beta^+$ madura en ratones ICAP-$1^{-/-}$, revelando la implicación de ICAP-1 en la diferenciación de los timocitos SP $CD8^+$. En base a la reducción en las proporciones de las poblaciones SP $CD8^+$ SM, M1 y M2, así como a la disminución de las frecuencias de los timocitos SP $CD8^+$ en las subpoblaciones $CD69^+CD3^+$ y en la más madura $CD69^-CD3^+$ en los ratones deficientes en ICAP-1, los resultados indican que la ausencia de ICAP-1 causa una maduración deficiente de las células SP $CD8^+$. Es probable que el incremento de la población $CD4^+CD8^+$ en la fase SM de ratones ICAP-$1^{-/-}$ pudiera corresponder a la población $CD4^+CD8^{low}$ a partir de la cual se diferencian las células SP (Singer *et al*., 2008). La alteración en la expresión de diferentes marcadores asociados a la selección positiva durante la timopoyesis sugiere un defecto en este proceso en el linaje de timocitos SP $CD8^+$ en los ratones ICAP-$1^{-/-}$, aunque no podemos descartar que ICAP-1 pudiera regular asimismo la selección negativa. Sería interesante realizar futuros experimentos para analizar la deleción clonal de células $CD8^+$ en ratones deficientes en ICAP-1 durante la selección negativa.

Los ensayos con ratones quimeras demostraron que la reducción de células SP $CD8^+$ en timos ICAP-$1^{-/-}$ se debe a un defecto autónomo de los timocitos. Los análisis de la distribución de las células epiteliales tímicas mostraron una pequeña reducción de las células mTEC, las cuales proporcionan los estímulos necesarios para la migración de los timocitos hacia la médula del timo y para el establecimiento de la tolerancia central (Hogquist *et al*., 2005; Moran & Hogquist, 2012; Ashby & Hogquist, 2023). Dado que los timocitos SP contribuyen al desarrollo de las mTEC (Surh *et al*., 1992; Hikosaka *et al*., 2008), cabe la posibilidad de que la deficiente generación de los timocitos SP $CD8^+$ en ratones ICAP-$1^{-/-}$ pudiera afectar el desarrollo de las mTECs.

La falta de ICAP-1 induce una conformación de alta afinidad de las integrinas β1 (Bouvard *et al*., 2007), y se traduce en un aumento de la adhesión dependiente de α4β1 de esplenocitos T y B (Sevilla-Movilla *et al*., 2022). Resultados previos han mostrado que los timocitos totales de los ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ muestran un nivel de adhesión similar a ligandos de α4β1, y una localización predominantemente nuclear de ICAP-1 (Tesis Doctoral, Silvia Sevilla Movilla, 2019; Sevilla-Movilla *et al*., 2022). Estos datos sugieren que la deficiente generación de células SP $CD8^+$ en ratones que carecen de ICAP-1 ocurre independientemente de la adhesión mediada por α4β1, lo que está en línea con estudios previos que indican que el papel de esta integrina no se requiere en la diferenciación de los timocitos (Brakebusch *et al*., 2002; Bungartz *et al*., 2006; Gribi *et al*., 2006). ICAP-1 presenta una secuencia de localización nuclear que permite su translocación al núcleo, donde podría regular la expresión génica (Fournier *et al*., 2005; Draheim *et al*., 2017; Su *et al*., 2020). El desarrollo de los linajes de timocitos $CD4^+$ o $CD8^+$ es regulado por distintos factores de transcripción tras la interacción de los TCR de las células DP con pMHC de las TECs durante la selección positiva (Singer *et al*., 2008; Steier *et al*., 2024). La diferenciación hacia timocitos SP $CD4^+$ es dependiente de ThPOK y GATA3 (Pai *et al*., 2003; He *et al*., 2005; Wang *et al*., 2008), mientras que el factor de transcripción requerido para la diferenciación del linaje $CD8^+$ en el timo es Runx3 (Taniuchi *et al*., 2002; Ehlers *et al*., 2003; Kohu *et al*., 2005; Egawa *et al*., 2007). Los timocitos SP $CD8^+$ de ratones ICAP-$1^{-/-}$ mostraron niveles de expresión de *Thpok* y *Gata3* similares a los de los ratones control. Los timocitos SP $CD8^+$ expresan un transcrito específico de *Runx3* denominado *Runx3d*, que corresponde al promotor distal P1 (Bangsow *et al*., 2001; Chung *et al*., 2007), y que no se expresa en timocitos DN, DP o SP $CD4^+$ (Egawa *et al*., 2007). Los

timocitos SP CD8$^+$ deficientes en ICAP-1 mostraron una fuerte disminución de la expresión de *Runx3d*, lo que correlacionó con el déficit de timocitos SP CD8$^+$. Además, los resultados de los experimentos con los ratones quimeras mostraron que la disminución de *Runx3d* es un defecto autónomo de los timocitos SP CD8$^+$. Todos estos datos sugieren la implicación de ICAP-1 en la regulación de la expresión de *Runx3d* en el núcleo, lo que se traduciría en la disminución de la población de timocitos SP CD8$^+$ en los ratones ICAP-1$^{-/-}$. Notablemente, la expresión del factor de transcripción Runx2, un marcador óseo de la familia de RUNX (Levanon & Groner, 2004), también se encuentra reducida en ratones deficientes en ICAP-1 (Bouvard *et al*., 2007). Para profundizar en la posible correlación de ICAP-1 y Runx3, hemos sobreexpresado ICAP-1 en células Jurkat, las cuales expresan bajos niveles de Runx3. Por el momento no hemos conseguido identificar una correlación directa entre la sobreexpresión de ICAP-1 y la inducción de Runx3. En estos momentos estamos utilizando el método BioID en células Jurkat para determinar el interactoma de ICAP-1 e identificar las posibles dianas reguladas por ICAP-1.

2. Papel de ICAP-1 en la maduración y función de linfocitos de órganos linfoides secundarios.

2.1. Distribución, proliferación y activación de linfocitos T periféricos en ratones deficientes en ICAP-1

El análisis de los linfocitos T en periferia reveló una reducción tanto de la frecuencia como del número de células CD8$^+$ en bazos y LNs deficientes en ICAP-1, reflejando dicha reducción una disminución de la población *naive* (CD62L^{high}CD44$^-$). Nuestros resultados con ratones quimeras sugieren que la disminución de células CD8$^+$ en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ es un defecto autónomo de los linfocitos, aunque no podemos descartar completamente una posible implicación del microambiente, ya que todavía no hemos realizado experimentos con quimeras en los que los ratones CD45.2/ICAP-1$^{-/-}$ sean irradiados y reconstituidos con células de la MO de ratones CD45.1.

Los linfocitos CD8$^+$ requieren la expresión de Runx3 para mantener su identidad en periferia (Woolf *et al.,* 2003; Sato *et al.*, 2005; Setoguchi *et al.*, 2008). De este modo, los ratones deficientes en Runx3 muestran una reducción de células CD8$^+$ que correlaciona con un aumento de la expresión de CD4 en dichas células, lo que se traduce en un aumento del ratio celular CD4$^+$:CD8$^+$ (Taniuchi *et al.,* 2002; Woolf *et al.,* 2003). La frecuencia reducida de células CD8$^+$ y el aumento moderado de la proporción de células CD4$^+$ en bazos deficientes en ICAP-1 estaría de acuerdo con estos datos. El análisis de la expresión de Runx3 en linfocitos T periféricos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ puede proporcionar una valiosa información para conocer con más detalle los mecanismos moleculares implicados en la disminución de células CD8$^+$ en estos ratones mutantes.

La reducción de células CD8$^+$ en bazos y LNs deficientes en ICAP-1 podría reflejar la disminución de la producción de timocitos SP CD8$^+$, aunque también podría relacionarse con una posible alteración de la proliferación de los linfocitos T en periferia. Utilizando el marcador Ki67 en experimentos de inmunofluorescencia, en la presente Tesis mostramos una menor proliferación *in situ* de células CD8$^+$, y en menor medida de células CD4$^+$, en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ en comparación con ratones control. La reducción de la proliferación de linfocitos CD8$^+$ de bazos deficientes en ICAP-1 fue asimismo observada en un contexto de estimulación *in vitro*, simulando la presentación antigénica con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Notablemente, los ratones deficientes en Runx3 muestran adicionalmente un defecto en la proliferación de los esplenocitos T CD8$^+$ en respuesta a anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Taniuchi *et al.,* 2002; Woolf *et al.,* 2003). Como se ha comentado más arriba, será interesante analizar la expresión de *Runx3* en linfocitos CD8$^+$ de bazos de ratones deficientes en ICAP-1 para determinar las relaciones funcionales entre ICAP-1, Runx3 y la proliferación de estos linfocitos. La reducción del número de linfocitos T positivos para Ki67 en bazos de

ratones deficientes en ICAP-1 sugiere un defecto en la progresión del ciclo celular, ya que Ki67 no se expresa en la fase G0 y alcanza su máxima expresión en la fase G2 (Sun & Kaufman, 2018). En concordancia con estos datos, las células $CD3^+$ de bazos ICAP-$1^{-/-}$ mostraron una reducción de la fase G2/M del ciclo celular tras estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, lo que indica que la falta de ICAP-1 altera el ciclo celular de los linfocitos T en bazo.

La disminución de la población de células $CD8^+$ en bazos deficientes en ICAP-1 no se tradujo en un incremento de su apoptosis, sino que observamos una reducción de la apoptosis de células $CD4^+$ y $CD8^+$ en los bazos de ratones ICAP-$1^{-/-}$ en comparación con la de los ratones control. Estos datos indican que el déficit de proliferación de los esplenocitos T en los ratones mutantes no está asociado con un aumento de la apoptosis celular. Los presentes resultados están en línea con datos anteriores que mostraron un marcaje reducido de Ki67 y un déficit de proliferación de osteoblastos y células osteoprogenitoras de ratones ICAP-$1^{-/-}$, lo cual correlacionaba con un menor porcentaje de células apoptóticas (Bouvard *et al.*, 2007). En consecuencia, nuestros datos indican que el defecto de proliferación podría contribuir a la reducción del número de esplenocitos T de bazos deficientes en ICAP-1. Asimismo, los resultados abren la posibilidad de que la disminución de proliferación y apoptosis pudiera ser una consecuencia general de la falta de ICAP-1 en distintos tipos celulares.

La reducción del número de células T periféricas en ratones que carecen de ICAP-1 podría relacionarse con un defecto de la señalización del TCR. En este trabajo hemos analizado si la ausencia de ICAP-1 causa alteraciones en eventos moleculares relacionados con la activación de linfocitos T a través del TCR. Tras estimulación del TCR se induce un epítopo de activación de la cadena $CD3\varepsilon$, el cual es reconocido por el anticuerpo APA1/1 (Risueño *et al*., 2005). Nuestros resultados mostraron una pequeña reducción del marcaje con este anticuerpo en linfocitos $CD3^+$ de bazos deficientes en ICAP-1 tras estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Asimismo, la estimulación del TCR activa las vías de las MAP quinasas y de PI3K/Akt (Brownlie & Zamoyska, 2013; Cantrell, 2015). Las células $CD3^+$ de bazos ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ mostraron niveles similares de fosforilación de ERK1/2 y Akt tras estimulación con anti-CD3/CD28. En conjunto, estos resultados indican que la ausencia de ICAP-1 en linfocitos T no afecta de manera remarcable a eventos moleculares tempranos durante la activación del TCR.

La estimulación de linfocitos T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 induce la expresión de CD69, un marcador de activación (Testi *et al*., 1994; Ziegler *et al.*, 1994; Cibrián & Sánchez-Madrid, 2017). Nuestros resultados revelaron que los linfocitos $CD8^+$ de bazos de ratones ICAP-$1^{-/-}$ muestran una mayor inducción de la expresión de CD69 que las células $CD8^+$ control tras estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Desconocemos si esta mayor inducción de CD69 tras estimulación se debe a un aumento de la transcripción o de la traducción, o a alteraciones en la vida media de CD69 en la membrana de las células $CD8^+$ deficientes en ICAP-1. Por tanto, analizaremos inicialmente la expresión de *Cd69* mediante RT-qPCR de células $CD8^+$ control y estimuladas. Las células $CD8^+$ de los bazos constituyen principalmente células memoria efectoras residentes, las cuales expresan altos niveles de CD69 (Sathaliyawala *et al.*, 2013), y debido a su interacción con S1PR1, favorece la localización de este tipo celular en diferentes tejidos (Skon *et al.*, 2013; Walsh *et al.*, 2019). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la mayor expresión de CD69 tras estimulación en células $CD8^+$ de ratones ICAP-$1^{-/-}$ podría asociarse con un aumento de células memoria residentes, ya que como hemos mencionado anteriormente, los ratones ICAP-$1^{-/-}$ presentan una reducción de la población $CD8^+$ *naive* pero no de las poblaciones $CD8^+$ memoria.

Por otro lado, también analizamos la expresión de CD5, un regulador negativo de la señalización del TCR, cuya expresión aumenta con la avidez del TCR por péptidos propios y ajenos, y actúa atenuando su señal y aumentando su umbral de activación. CD5 se expresa en células T periféricas para la tolerancia a antígenos propios, especialmente en células $CD4^+$

(Azzam *et al*., 1998; Tabbekh *et al*., 2013; Cho & Sprent, 2018; Voisinne *et al*., 2018), en las cuales una elevada expresión de CD5 se ha asociado a una conversión hacia células Treg (Henderson *et al*., 2015). Nuestros resultados mostraron un moderado aumento de expresión de CD5 en células $CD4^+$ y $CD8^+$ de bazos de ratones ICAP-$1^{-/-}$ relativo a las células control. Estos datos sugerirían que el aumento de expresión de CD5 en células que carecen de ICAP-1 podría atenuar la activación de estos linfocitos, lo cual correlacionaría con la reducción del marcaje con el anticuerpo APA1/1 en sus linfocitos $CD3^+$ tras estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Asimismo, se ha descrito que los linfocitos T maduros periféricos carentes de CD5 muestran un aumento de proliferación tras estimulación del TCR y una mayor producción de citoquinas (Voisinne *et al.*, 2018; Choi *et al.*, 2022). De este modo, CD5 regula negativamente la proliferación homeostática inducida por citoquinas en linfocitos T $CD8^+$ memoria, suprimiendo la activación de Akt y mTOR (Choi *et al.*, 2022). Además, se ha observado que la expresión de CD5 protege a los linfocitos T intratumorales de la muerte celular inducida por activación, evitando su sobreactivación y disminuyendo la expresión de Fas-L y la activación de caspasas (Tabbekh *et al*., 2013). En concordancia con estos datos, los linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ de ratones mutantes mostraron una reducción de la proliferación y de la apoptosis *in situ*, así como una menor proliferación *in vitro* en respuesta a anticuerpos frente a CD3 y CD28, lo que podría relacionarse con el aumento de los niveles de CD5.

La disminución de la población de células $CD8^+$ en los bazos deficientes en ICAP-1 podría basarse asimismo en anomalías en su migración y posicionamiento. Analizando la expresión de diferentes receptores de quimioquinas implicados en el tráfico de linfocitos T, observamos una reducción de la expresión de CXCR4 en linfocitos $CD4^+$ de bazo y LNs deficientes en ICAP-1, pero no en las células $CD8^+$. Estos resultados pudieran traducirse en alteraciones en la migración de las células $CD4^+$, ya que CXCR4 es un receptor de la quimioquina CXCL12 que contribuye a la migración de los linfocitos T *naive* y memoria a los OLS (Scimone *et al*., 2004; Griffith *et al*., 2014). Sin embargo, no hemos observado cambios significativos en el número de células $CD4^+$ de los OLS de ratones ICAP-$1^{-/-}$. Asimismo, no detectamos en estos ratones alteraciones reseñables en los niveles de los receptores CCR7, S1PR1 y CXCR5 en sus linfocitos T. Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron un incremento de la adhesión de linfocitos $CD3^+$ deficientes en ICAP-1 mediada por α4β1 (Sevilla-Movilla *et al*., 2022), indicando que ICAP-1 regula negativamente su adhesión mediada por esta integrina. Aunque estos datos podrían sugerir que hubiera una mayor retención de estas células en las zonas T del bazo, estos datos no concordarían con la reducción del número de células $CD8^+$ en los bazos deficientes en ICAP-1, ni tampoco con el hecho de que no detectemos un número superior de linfocitos $CD4^+$. Todos estos resultados sugieren que la disminución de la población de linfocitos $CD8^+$ no está basada en alteraciones en su tráfico y posicionamiento.

2.2. Distribución y proliferación de linfocitos B periféricos en ratones ICAP-$1^{-/-}$

Nuestros resultados sugieren que la falta de ICAP-1 no afecta a la población de células $B220^+CD93^+$ inmaduras que migran desde la MO al bazo, órgano donde completan su proceso de maduración formando las células transicionales T1 y T2. La población de células T2, que expresa altos niveles de CD21, es reconocida como la precursora de las células pre-MZB (Srivastava *et al.*, 2005). En este trabajo mostramos que, a excepción de las células pre-MZB, las poblaciones transicionales T1 y T2, y las poblaciones maduras MZB y FOB muestran cantidades totales reducidas en bazos de ratones ICAP-$1^{-/-}$, lo que refleja la disminución general del número de esplenocitos en bazos ICAP-$1^{-/-}$ (Sevilla-Movilla *et al*., 2022). Además, los bazos deficientes en ICAP-1 muestran una proporción reducida de células MZB que se asocia con un incremento de la frecuencia de células pre-MZB. Dado que el número de células pre-MZB no varía, estos datos sugieren que la reducción del número y frecuencia de células MZB de bazos deficientes en ICAP-1 se asocia con alteraciones en la transición desde el estadío pre-MZB hacia las células MZB. Los resultados de los experimentos con ratones

quimeras muestran que el defecto en la generación de las células MZB en ratones deficientes en ICAP-1 implica funciones autónomas de los linfocitos B.

Posibles causas de la reducción de células B en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ incluyen defectos intrínsecos de su proliferación, la ausencia o disminución de factores de crecimiento en el microambiente del bazo que fueran requeridos para la proliferación de estas células, una disminución de la proliferación o de la diferenciación de células precursoras, o un aumento de su apoptosis. La disminución general del número de células B en los bazos mutantes refleja probablemente una alteración de la proliferación celular. Basándonos en los resultados de inmunofluorescencia de secciones de bazos deficientes en ICAP-1, observamos una reducción del número de células CD19^{+} Ki67^{+} en comparación con los bazos control, lo que indica un déficit de la proliferación *in situ*. Adicionalmente, la menor intensidad de fluorescencia de Ki67 observada en linfocitos CD19^{+} deficientes en ICAP-1 *in situ*, correlaciona con la reducción de la fase G2/M del ciclo celular en estas células tras estimulación con anticuerpos anti-IgM junto con IL-4. El análisis de la proliferación de las células MZB por inmunofluorescencia podría presentar dificultades experimentales por su reducido número comparado con las células FOB, y podría complicar la distinción de ambas poblaciones celulares en base a la utilización de marcadores absolutamente específicos para estas poblaciones. Asimismo, el hecho de que las células MZB migran constantemente entre la MZ y el folículo (Cinamon *et al.*, 2008), añadiría dificultades para una cuantificación objetiva. Por ello, realizaremos futuros experimentos *in vivo* utilizando BrdU, seguido de la selección de las poblaciones de células FOB y MZB por citometría de flujo, para analizar con mayor precisión la proliferación de estos tipos celulares.

Nuestros ensayos *in vitro* también revelaron una reducción de la proliferación de células B deficientes en ICAP-1 en presencia de diferentes estímulos, tales como anticuerpos anti-IgM en presencia de IL-4. Dicha combinación afectó a la población de células FOB pero no a las células MZB, lo que podría reflejar el hecho de que la estimulación con anti-IgM en ausencia de coestimulación de CD40 induce la apoptosis de células MZB (Parry *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1996), por lo que éstas muestran bajos niveles de proliferación frente a estimulación del BCR en comparación con las células FOB (Oliver *et al.*, 1997). El análisis de la capacidad proliferativa en respuesta a la combinación anti-CD40/IL-4, una señal que induce la proliferación tanto de células FOB como de células MZB, o a LPS, el cual interacciona con TLR4 activando especialmente a las células MZB (Nomura *et al.*, 1995; Oliver *et al.*, 1997; Minguet *et al.*, 2008), reveló una disminución de la tasa proliferativa tanto de las células FOB como de las MZB carentes de ICAP-1 en comparación con las células control. Por lo tanto, la alteración de la proliferación de células B deficientes en ICAP-1 puede ser detectada *in situ* en el microambiente del bazo intacto, así como en células en suspensión en ausencia de adhesión. Estos datos de nuevo indican que la reducción de la proliferación de células B deficientes en ICAP-1 es autónoma de los linfocitos B, ya que puede ser detectada en ausencia de células estromales del bazo.

Análisis de la apoptosis *in situ* de células CD19^{+} de bazos ICAP-1$^{-/-}$ reveló un menor grado de muerte celular relativo a las células de ratones ICAP-1$^{+/+}$. La reducción de la proliferación y apoptosis de células B y T en bazos ICAP-1$^{-/-}$ corresponde a un fenotipo característico de células senescentes (Gorgulis *et al.*, 2019). En base a los resultados del incremento de la actividad SA-β-Gal y en la reducción de expresión de LaminB1, los resultados revelan una inducción de senescencia en bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$. Sin embargo, no observamos cambios de expresión de ICAP-1 en la base de datos de senescencia Tabula Muris Senis (Schaum *et al.*, 2020), lo que sugiere que la inducción de senescencia podría ser una consecuencia de la proliferación deficiente de los linfocitos en bazos que carecen de ICAP-1, lo que podría comprometer la inmunovigilancia implicada en la eliminación eficiente de las células senescentes (Wang & Nakanishi, 2024). Actualmente, estamos realizando experimentos de inmunofluorescencia de secciones de bazos ICAP-1$^{+/+}$ e ICAP-1$^{-/-}$ para identificar las poblaciones celulares que presentan senescencia. Para ello, estamos combinando la tinción de SA-β-Gal y de LaminB1 con los anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8,

para distinguir las poblaciones de linfocitos T, o anti-CD19 y anti-MOMA, para determinar la senescencia de las células B del folículo.

Debido a la disminución de la proliferación de las células $CD19^+$ deficientes en ICAP-1, cabe la posibilidad de que sus funciones se encuentren también alteradas. Las células MZB de bazo están continuamente expuestas a patógenos procedentes de la sangre, por lo que proporcionan respuestas T-independientes, así como una inmunovigilancia T-dependiente (Song & Cerny, 2003; Allman & Pillai, 2008; Cerutti *et al*., 2013). Los ratones ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ inmunizados con TNP-Ficoll, un hapteno conjugado con Ficoll que actúa como antígeno multivalente y que señaliza a través de BCR generando respuestas T-independientes de tipo 2 (Le Moal *et al.*, 1984; Cyster & Allen, 2019), generaron niveles similares de anticuerpos IgM e IgG. Estos resultados indican que, a pesar de la reducción de células MZB de bazos deficientes en ICAP-1, no existen alteraciones remarcables de las respuestas T-independientes. De modo similar, ratones deficientes en la enzima TAOK, que regula el procesamiento de Notch2, o en RBP-Jk muestran asimismo una reducción de células MZB pero sin alteraciones en las respuestas T-independientes de tipo 2 (Tanigaki *et al*., 2002; Hammad *et al.*, 2017). La ausencia de alteraciones en este tipo de respuestas podría ser debido a respuestas T-independientes generadas por células B-1, una población localizada en las cavidades peritoneales y pleurales (Martin *et al*., 2001; Allman & Pillai, 2008). Puesto que las células MZB desarrollan también respuestas T-dependientes (Song & Cerny, 2003; Allman & Pillai, 2008), sería interesante analizar próximamente este tipo de respuestas.

2.3. Las células B de ratones ICAP-$1^{-/-}$ muestran alteraciones en su activación y en la expresión de moléculas de señalización y de receptores linfocitarios

El desarrollo y proliferación de células B del bazo requiere la señalización del BCR (Torres *et al*., 1996; Pillai & Cariappa, 2009), cuya estimulación desencadena la expresión del marcador de activación CD69 (Testi *et al.*, 1994; Minguet *et al.,* 2008), y de la molécula coestimuladora CD86 (B7-2) (Boussiotis *et al.*, 1993; Lenschow *et al.*, 1994). La consecuencia más evidente de la falta de ICAP-1 fue un bloqueo en la inducción de CD86 tras estimulación con anti-IgM en las células MZB deficientes en ICAP-1. Asimismo, observamos una moderada reducción de CD86 en respuesta a estimulación con anti-CD40 o LPS. CD86 se une al receptor CD28 de las células T, siendo necesaria esta interacción para la generación de los GC y para el desarrollo de las respuestas T-dependientes (Freeman *et al.*, 1993; Borriello *et al*., 1997; Lane, 1997; Lund & Randall, 2010). Por tanto, la expresión reducida de CD86 en las células MZB ICAP-$1^{-/-}$ podría alterar la expansión de células $CD4^+$ tras su interacción con las células B. Dos moléculas de señalización implicadas en la inducción de CD86 son Blnk y Gpr174 (Hayashi *et al*., 2000; Wolf *et al*., 2022). Los resultados de RNAseq de células MZB revelaron que la expresión de *Blnk* y *Gpr174* estaba disminuida en células MZB deficientes en ICAP-1, lo que podría contribuir al bloqueo de la inducción de CD86 en estas células. La proteína Blnk forma parte de la cascada de señalización de BCR (Fu *et al.*, 1998; Dal Porto *et al.*, 2004). Los ratones deficientes en Blnk muestran una reducción de células B maduras periféricas, tienen defectos en la proliferación tras estimulación con anti-IgM, anti-CD40 o LPS *in vitro*, y una expresión reducida de CD86 (Hayashi *et al*., 2000; Xu *et al.,* 2000). Por otro lado, Gpr174 es un receptor de fosfatidilserinas que está acoplado a proteínas G heterotriméricas, y cuya ausencia se traduce en una reducción del compartimento de células MZB por un fallo en su proliferación (Wolf *et al*., 2022). Otra molécula implicada en la regulación de la expresión de CD86 en linfocitos B es CD40 (Azuma *et al.*, 1993), cuya expresión está reducida en las células MZB deficientes en ICAP-1, tanto a nivel de mRNA como proteína. En conjunto, nuestros resultados identifican a Blnk, Gpr174 y CD40 como moléculas diana de regulación por ICAP-1, cuyos niveles disminuidos en los ratones mutantes pudieran contribuir a la reducción de la inducción de la expresión de CD86 en las células MZB tras su estimulación.

La señalización del BCR induce asimismo la activación de la vía de PI3K/Akt y la vía

de las MAP quinasas (Kurosaki, 2002; Niiro & Clark, 2002; Oh-Hora *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2009; Rowland *et al.*, 2010; Werner *et al.*, 2010). Nuestros análisis revelaron que el grado de activación de estas vías era similar en células $CD19^{+}$ de bazos deficientes en ICAP-1 y células control, sugiriendo que la reducción de la proliferación de estas células en ratones ICAP-$1^{-/-}$ es independiente de la activación de la señalización de PI3K/Akt y de las MAP quinasas.

Los datos de secuenciación de células MZB de bazos ICAP-$1^{-/-}$ revelaron también una reducción de la expresión de genes implicados en la señalización del BCR, como *Syk*, *Lyn* o *Btk*. Los ratones deficientes en Syk muestran un acúmulo de células B inmaduras en bazo y números reducidos de células B maduras en la periferia (Turner *et al*., 1997). Asimismo, los ratones deficientes en Btk presentan un bloqueo de las células transicionales T2, con una reducción de células maduras en periferia, las cuales no proliferan adecuadamente en respuesta a anti-IgM o LPS (Khan *et al*., 1995; Nyhoff *et al*., 2018). Además, ratones transgénicos para *IgH* muestran alteraciones del BCR y una falta de *Btk,* que genera una reducción de la población MZB, las cuales pierden capacidad de supervivencia en respuesta a mitógenos (Martin & Kearney, 2000). Actualmente, estamos realizando experimentos de citometría de flujo para detectar posibles diferencias en la activación de Syk, Lyn y Btk en las células MZB de bazos ICAP-$1^{+/+}$ e ICAP-$1^{-/-}$ tras estimulación.

Las células MZB deficientes en ICAP-1 mostraron una fuerte disminución en la expresión de *Tnfrsf13c*, el cual codifica para BAFFR, un receptor de BAFF que controla la diferenciación de las células MZB (Sasaki *et al.*, 2004; Shulga-Morskaya *et al.*, 2004). Junto con BCR, BAFFR activa la vía canónica de NF-kB para el desarrollo de células MZB, aunque puede activar asimismo la vía no canónica para su maduración y supervivencia (Mackay & Schneider, 2009; Pillai & Cariappa, 2009; De Silva *et al.*, 2016). Así, los ratones deficientes en BAFFR o en BAFF muestran una reducción de las células transicionales y de las células maduras (Schiemann *et al*., 2001; Sasaki *et al*., 2004; Shulga-Morskaya *et al*., 2004). A pesar de la fuerte reducción de *Tnfrsf13c*, la expresión de BAFFR en membrana mostró tan sólo una pequeña disminución, tanto en las células MZB como en las células FOB deficientes en ICAP-1, sugiriendo que la alteración de la generación de células MZB en bazos ICAP-$1^{-/-}$ no implicaría una señalización deficiente de BAFFR. Las células MZB deficientes en ICAP-1 presentaron asimismo una ligera reducción de CD19 en sus membranas. La señalización de CD19 es inducida tras la activación del BCR, y es requerida para la generación de células MZB (Martin & Kearney, 2000; Hardy & Hayakawa, 2001), ya que los ratones deficientes en *Cd19* muestran una ausencia de células MZB en la periferia por una alteración de su mantenimiento y diferenciación (Martin & Kearney, 2000; You *et al*., 2009). Nuestros datos sugieren de nuevo que la reducción de la generación de células MZB en bazos deficientes en ICAP-1 no implicaría funciones alteradas de CD19.

2.4. La ausencia de ICAP-1 causa alteraciones en la expresión de moléculas reguladoras de la transcripción implicadas en el desarrollo de células MZB

Notch2 se requiere para la generación de células MZB (Saito *et al.*, 2003; Witt *et al.*, 2003). La expresión constitutiva del dominio intracelular de Notch2 (Notch2-ICD) en células transicionales estimula su diferenciación hacia células MZB (Hampel *et al.,* 2011), y la expresión de Notch2-ICD en células FOB *in vivo* produce su transdiferenciación a un fenotipo MZB y su localización en la MZ (Lechner *et al.*, 2021). Asimismo, la deleción condicional de RBP-Jk, la deleción de su ligando DLL-1 o de enzimas implicadas en su procesamiento como ADAM-10 o TAOK, causan una reducción de las células MZB (Tanigaki *et al.*, 2002; Hozumi *et al*., 2004; Gibb *et al*., 2010; Hammad *et al.*, 2017). Los datos de secuenciación de células MZB deficientes en ICAP-1 revelaron una reducción significativa de la expresión de *Notch2* en estas células, así como de sus dianas *Hes1, Dtx1* y *Myc*. *Hes1* y *Hes5* se expresan de manera elevada en células pre-MZB y MZB (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Shimizu *et al*., 2000; Saito *et al.,* 2003; Tan *et al.*, 2009), mientras que *Dtx1* se expresa únicamente en células MZB

(Ordentlich *et al*., 1998; Saito *et al*., 2003). Nuestros resultados correlacionan con otro estudio, donde el bloqueo de Notch2 con un anticuerpo *in vivo* causa una reducción del número de células MZB, una reducción de la expresión de *Dtx1* y *Hes1*, y una inactivación de *Myc* que afecta a la proliferación y la diferenciación de las células MZB a células plasmáticas (Gaudette *et al*., 2021). La reducción de la expresión de *Notch2* en células MZB se tradujo en una clara disminución de la expresión proteica de Notch2, y en una tendencia a su disminución en células pre-MZB. Datos previos muestran que la expresión adenoviral de ICAP-1 en células endoteliales induce la activación de Notch1 e incrementa la expresión de sus dianas y sus ligandos DLL-1 y DLL-4 (Brütsch *et al.*, 2010).

Aunque en bazos de ratones control y deficientes en ICAP-1 no detectamos expresión de Krit1 (Sevilla-Movilla *et al.*, 2022), una proteína también denominada CCM1 que interacciona y regula a ICAP-1 (Zawistowski *et al.*, 2002), se ha demostrado asimismo que CCM1 induce la activación de la vía DLL-4-Notch en el modelo de malformaciones cerebro-cavernosas (Wüstehube *et al*., 2010). Estos datos sugieren que Notch2 representa una diana regulada por ICAP-1, y que el déficit de señalización de Notch2 es uno de los mecanismos más probables responsables de la generación deficiente de células MZB en ratones ICAP-1$^{-/-}$. En futuros experimentos utilizando el método BioID, analizaremos el interactoma de ICAP-1 para identificar las dianas objeto de su regulación.

La expresión alterada de diversos factores de transcripción con importantes papeles en el mantenimiento o generación de células MZB como Klf2 o Zfp36l1 podría también contribuir a la reducción de células MZB en bazos deficientes en ICAP-1. La deleción de *Klf2* conduce a una acumulación de células MZB (Hart *et al.*, 2011; Winkelmann *et al.*, 2011), y sus niveles pueden ser controlados por Notch2 (Lechner *et al.*, 2021) y Zfp36l1, un factor de transcripción de unión a RNA implicado en el mantenimiento de la población de células MZB (Newman *et al.*, 2017). La expresión de Klf2 en células FOB correlaciona con una señalización fuerte desde el BCR, ya que células FOB deficientes en Klf2 muestran una proliferación deficiente y una supervivencia reducida tras estimulación del BCR (Hart *et al*., 2011). Asimismo, la expresión de Klf2 es apenas detectable en células MZB (Winkelmann *et al.,* 2011). Por ello, Klf2 contribuye al mantenimiento de la identidad de células FOB reprimiendo la expresión de genes de las células MZB, de manera que células FOB que carecen de Klf2 comienzan a expresar características propias de células MZB, mientras que la expresión de niveles elevados de Klf2 en células MZB conduce a un fenotipo de células FOB (Hoek *et al*., 2010; Hart *et al*., 2011; Winkelmann *et al.,* 2011). Asimismo, Klf2 se expresa elevadamente en células en reposo o anérgicas, ya que induce la quiescencia celular mediante la represión de *Myc* (Wittner & Schuh, 2023). Así, la falta de expresión de Klf2 en células MZB de linfomas humanos contribuye a un aumento de su proliferación (Clipson *et al.*, 2015; Wittner & Schuh, 2023). Por otro lado, Zfp36l1 incrementa la expresión de genes de identidad de células MZB, por lo que su déficit conduce a una reducción de células MZB. Asimismo, Zfp36l1 regula la expresión de Myc y ciclinas, regulando la quiescencia (Newman *et al*., 2017), y reprime la expresión de *S1pr1* y de las subunidades α4, β1 o β7 de las integrinas (Saveliev *et al.*, 2021). La disminución de la expresión de *Zfp36l1* en células MZB deficientes en ICAP-1 plantea la posibilidad de que el incremento de expresión de *Klf2* en estas células sea consecuencia de la reducción de expresión de *Notch2* y *Zfp36l1*, y todo ello contribuya a la reducción de la población de células MZB de bazos deficientes en ICAP-1.

Nuestros datos indican que las células MZB deficientes en ICAP-1 presentan una reducción de la expresión de *Ebf1*, *Pax5* y *Ets1*. Ebf1 y Pax5 forman un complejo que regula la expresión de genes específicos del linaje de células B (Nutt & Kee, 2007; György *et al*., 2012; Revilla-i-Domingo *et al*., 2012; Miyai *et al.*, 2018). Este complejo regula la expresión de Id2 y Aiolos, así como de CD19, CD79a (Igα) y CD79b (Igβ) del complejo BCR (Maier *et al*., 2003; Schebesta *et al*., 2007; György *et al*., 2012; Revilla-i-Domingo *et al*., 2012). Asimismo, Ebf1 regula la señalización del BCR, puesto que células B deficientes en Ebf1 muestran una reducida fosforilación de CD79a y CD19 tras estimulación con anti-IgM (György *et al*., 2012). El

déficit de Ebf1 se traduce en una pérdida de células MZB periféricas y en una reducción de las células FOB, debido a un defecto de su proliferación tras señalización del BCR (György *et al*., 2012; Vilagos *et al*., 2012). Adicionalmente, la deficiencia de Ebf1 en células maduras interfiere con la señalización de BAFFR y de BCR dependiente de Akt (György *et al*., 2012), mientras que la ausencia de Pax5 reduce la expresión de *Cd19, Cd21* y *Blnk* en linfocitos B periféricos (Horcher *et al*., 2001; Schebesta *et al*., 2007; Revilla-i-Domingo *et al*., 2012). Además, la deleción condicional de *Pax5* produce una desdiferenciación celular con una pérdida de células MZB maduras y una reducción de las células FOB, las cuales no proliferan adecuadamente tras la estimulación del BCR o del TLR4 (Calderón *et al.*, 2021). Por otra parte, el déficit de Ets1 genera una reducción de las células MZB y un incremento de los marcadores de activación en células FOB (Wang *et al.*, 2005; Nguyen *et al*., 2012). Todos estos datos abren la posibilidad de que la disminución de la expresión de *Pax5*, *Ebf1* y *Ets1* en células MZB de ratones ICAP-1$^{-/-}$ pudiera contribuir a la deficiente generación de estas células.

2.5. La falta de ICAP-1 causa una alteración de la expresión de moléculas de migración y posicionamiento de linfocitos B

Aunque nuestros resultados sugieren que la disminución de células MZB de bazos deficientes en ICAP-1 implica principalmente defectos en su proliferación y desarrollo, cabe asimismo la posibilidad de que existan alteraciones en su migración y posicionamiento que afecten a su distribución en la MZ. Sin embargo, no detectamos dicha población celular en sangre periférica y LNs, lo que indica que el déficit de células MZB de bazos de ratones ICAP-1$^{-/-}$ no se debe a una localización anómala de estas células en la periferia.

Las células MZB deficientes en ICAP-1 mostraron una disminución de la expresión en membrana de CXCR5 y de S1PR1. Estos receptores contribuyen al posicionamiento de las células MZB en la MZ y su migración a los folículos (Cerutti *et al.*, 2013; Cyster & Allen, 2019). El déficit de S1PR1 en células MZB reduce su retención en la MZ, translocándose al folículo en respuesta a CXCL13 (Cinamon *et al*., 2004; Cinamon *et al*., 2008; Cyster & Schwab, 2012), mientras que el déficit de S1PR1 en células FOB evita su salida hacia la MZ (Arnon *et al*., 2013). Asimismo, la reducción de S1PR1 en células MZB ICAP-1$^{-/-}$ podría asociarse a una disminución de los niveles de Notch2, ya que se ha demostrado que la expresión de Notch2-ICD incrementa los niveles de S1PR1 en estas células (Lechner *et al.*, 2021). CXCR5 contribuye a la localización de las células MZB y FOB en el interior de los folículos en respuesta a la quimioquina CXCL13 (Cinamon *et al*., 2008; Cyster & Schwab, 2012). La reducción de expresión de CXCR5 se asoció con una inhibición de la quimiotaxis hacia CXCL13 de las células FOB y MZB deficientes en ICAP-1. Esto podría causar una alteración de la migración de las células MZB desde la MZ a los folículos, lo que potencialmente incrementaría la retención de las células MZB en la MZ. Por tanto, parece improbable que un defecto en el tráfico de estas células genere una reducción de las mismas en bazos ICAP-1$^{-/-}$. Una posible consecuencia de la disminución de la migración dependiente de CXCR5 de células MZB podría ser una alteración de la presentación de antígenos en los folículos.

La localización y retención de las células MZB en la MZ también implica la actividad de las integrinas α4β1 y αLβ2 (Lu & Cyster, 2002; Cerutti *et al*., 2013), y recientemente se ha demostrado que las integrinas β1 regulan la diferenciación de células MZB (Andreani *et al*., 2023). Por el contrario, las células FOB no requieren de estas integrinas para su alojamiento en el folículo (Lu & Cyster, 2002; Srivastava *et al*., 2005). Nuestros resultados revelaron un pequeño incremento de la expresión de la subunidad β1 en la superficie de células MZB deficientes en ICAP-1, mientras que los niveles de las subunidades α4 y β2 fueron comparables con las células control. Estos resultados sugieren que el déficit de células MZB en ratones ICAP-1$^{-/-}$ sería independiente de α4β1 y αLβ2.

Las células MZB de bazos ICAP-1$^{-/-}$ muestran una expresión reducida de *Mzb1*, *Nedd9*

y *Swap70*. Mzb1 es una proteína de retículo endoplasmático que regula la activación de integrinas β1 (Flach *et al*., 2010). La ausencia de Mzb1 en células MZB causa una reducción de su proliferación y de su estimulación con LPS, así como una disminución en la activación de integrinas β1 y de la adhesión dependiente de α4β1 (Flach *et al*., 2010; Andreani *et al*., 2018). *Nedd9* codifica para Cas-L, una proteína que es fosforilada por tirosín quinasas tras adhesión de integrinas β1 o tras estimulación del BCR (Manié *et al*., 1997). Los ratones deficientes en Cas-L muestran una reducción de células MZB en los OLS, una reducción de la quimiotaxis hacia CXCL12 y CXCL13, y una reducción de la adhesión a VCAM-1 e ICAM-1 (Seo *et al*., 2005). SWAP-70 interacciona con GTPasas que regulan el citoesqueleto de actina, la migración y adhesión (Shinohara *et al*., 2002; Pearce *et al*., 2006), y su deficiencia se traduce en una reducción de la diferenciación hacia células MZB y un acúmulo de las células transicionales T1. Además, las células MZB *Swap70*$^{-/-}$ muestran una reducida migración en respuesta a S1P y un aumento de la adhesión dependiente de α4β1 y αLβ2 (Chopin *et al*., 2010). Estos resultados abren nuevas vías de investigación dirigidas hacia la posible implicación de moléculas que regulan la adhesión mediada por integrinas en la reducción de la generación de células MZB en bazos de ratones deficientes en ICAP-1.

Nuestros resultados, junto con estudios previos, muestran que ICAP-1 puede regular, como mínimo, dos tipos de respuestas dependiendo de su localización. Por un lado, la adhesión mediada por las integrinas β1 desde su localización citoplasmática (Chang *et al*., 1997; Zhang & Hemler, 1999; Chang *et al*., 2002), y por otro lado la regulación de la expresión génica en el núcleo (Fournier *et al*., 2005; Draheim *et al*., 2017; Su *et al*., 2020). Por el momento desconocemos si ambos tipos de respuestas son excluyentes mutuamente o si se encuentran interconectadas en un determinado tipo celular. Si ambos tipos de respuestas ocurrieran en un mismo tipo celular, se requerirían suficientes niveles de ICAP-1 unido a integrinas y localizado en el núcleo. Por ejemplo, nuestros resultados previos revelaron una acumulación de ICAP-1 tanto en el citoplasma como en el núcleo de linfocitos T y B, proporcionando un control de su adhesión mediada por α4β1, y potencialmente una regulación de la expresión génica (Sevilla-Movilla *et al*., 2022). Estos datos sugieren el modelo expuesto en la **Figura 102**, en el que ICAP-1 citosólico regularía la adhesión celular dependiente de α4β1 de linfocitos T y B, mientras que en el compartimento nuclear, podría regular la expresión de genes y controlar procesos tales como la proliferación y activación celular, y la migración de linfocitos B. Asimismo, ICAP-1 nuclear podría controlar la diferenciación de células MZB mediante la regulación de la expresión de *Notch2*. Por contra, los timocitos muestran una localización de ICAP-1 casi exclusiva en el núcleo, lo que podría influir en la regulación de la expresión del factor de transcripción Runx3 requerido para el desarrollo de los timocitos SP CD8^{+}, sin modular la adhesión celular dependiente de α4β1 (Sevilla-Movilla *et al*., 2022).

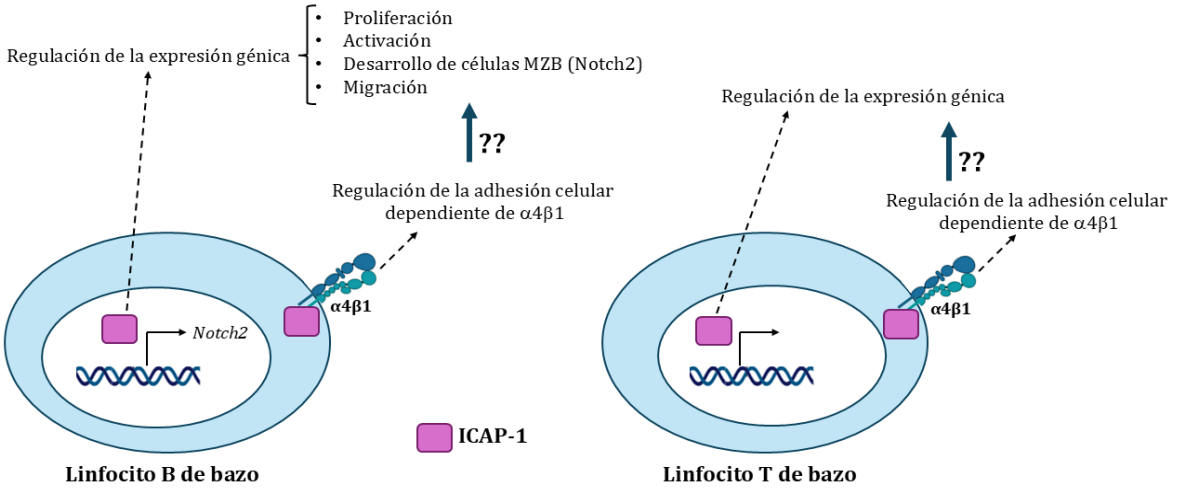


Figura 102. Modelo de la actividad de ICAP-1 en linfocitos de bazo. ICAP-1 puede localizarse en el citosol de linfocitos T y B de bazo, donde regularía negativamente la activación de la integrina α4β1.

ICAP-1 puede localizarse asimismo en el núcleo, donde podría potencialmente regular la expresión génica, controlando procesos como la activación, proliferación, diferenciación y migración celular. Una de sus dianas es *Notch2*, requerida para el desarrollo de células MZB.

Puesto que ICAP-1 regula un considerable número de genes, es posible que participe en la regulación de la expresión génica de manera indirecta, controlando genes que regulan a su vez la expresión de un gran número de genes *downstream*, o bien, actuar como proteína *scaffold* de complejos reguladores de transcripción. El próximo objetivo será dilucidar las proteínas que forman parte del interactoma de ICAP-1, y conectar dicho interactoma con las respuestas celulares observadas.

3. Regulación de la expresión de miRNAs en la adhesión dependiente de la integrina α4β1 en células de mieloma múltiple.

α4β1 es la principal integrina que media la adhesión de células de mieloma múltiple (MM) a sus ligandos VCAM-1 y fibronectina (FN) expresados en el microambiente de la MO (Sanz-Rodriguez *et al.,* 1999; Hideshima *et al*., 2007; Ghobrial, 2012), y dicha adhesión contribuye al progreso de la enfermedad (Mori *et al.,* 2004; Olson *et al*., 2005; Ghobrial, 2012; Martínez-Moreno *et al*., 2016). La inhibición de α4β1 o el bloqueo del receptor CXCR4, el cual promueve la activación de la integrina tras la interacción con CXCL12, interfiere en la adhesión de las células de MM al endotelio vascular de la MO (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2001; Alsayed *et al.*, 2007; Azab *et al*., 2009).

La unión de las integrinas a sus ligandos genera la señalización *outside-in*, la cual estimula la supervivencia y proliferación de células tumorales mediante la regulación de la expresión génica (Hynes, 2002; Cooper & Giancotti, 2019). Por ejemplo, la adhesión dependiente de integrinas β4 se traduce en una inhibición de la expresión de miR-29a en células de cáncer de mama, mientras que la adhesión mediada por integrinas β5 regula negativamente los niveles de miR-125b en células mesenquimales (Gerson *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012). A su vez, las integrinas pueden ser reguladas por algunos miRNAs, como ocurre con la expresión de miR-30 en células de cáncer de mama que reprime la expresión de integrinas β3 (Yu *et al*., 2010). Esto sugiere una posible conexión entre las integrinas y los miRNAs en el microambiente de la MO del mieloma múltiple (Kumar *et al*., 2017). Adicionalmente, la desregulación de los miRNAs incrementa a lo largo de los diferentes estadíos de la progresión del MM, y correlaciona con translocaciones cromosómicas que tienen lugar en las células plasmáticas malignas (Zhou *et al.,* 2010; Rossi *et al.,* 2015; Handa *et al.*, 2019).

En el presente trabajo mostramos que la adhesión de células de MM mediada por α4β1 se traduce en la regulación de la expresión de miRNAs. Los datos de RNAseq revelaron la expresión diferencial de 40 miRNAs entre células adheridas al fragmento CS-1 de la FN y células en suspensión. Entre los 40 miRNAs identificados en nuestro RNAseq se incluyen diversos miRNAs asociados a distintas etapas de progresión del MM, como miR-324-5p y miR-331-3p (Zhou *et al.,* 2010; Tang *et al*., 2018), miR-29b-3p (Amodio *et al*., 2016; Federico *et al.,* 2019), miR-30b,c-5p (Dimopoulos *et al.,* 2013; Zhao *et al*., 2014), miR-15b-5p, miR-191-3p (Dimopoulos *et al.,* 2013), miR-106b-5p (Corthals *et al.,* 2011; Federico *et al.,* 2019), miR-193b-3p (Unno *et al.*, 2009) y miR-424 (Corthals *et al.,* 2011). Nueve de estos miRNAs mostraron un incremento de expresión tras adhesión a FN-H89, incluyendo miR-324-5p y miR-331-3p. El aumento de expresión de estos miRNAs fue confirmado por RT-qPCR en células de MM adheridas a FN-H89, y dicho aumento fue inhibido en células silenciadas para la expresión de α4β1. Asimismo, mostramos que la estimulación de la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p tras la adhesión requiere la activación de las vías MAPK y PI3K/Akt, ambas dianas de la señalización *outside-in* mediada por integrinas (Hynes, 2002; Hideshima *et al*., 2007; Cooper & Giancotti, 2019).

Pacientes de MM a diagnóstico mostraron una expresión heterogénea de miR-324-5p

y miR-331-3p. La expresión de miR-324-5p se asocia con la deleción cromosómica 17p, y su expresión suele ser baja en células de MM, lo que sugiere una función de supresión tumoral (Handa *et al.*, 2019). Este miRNA inhibe la proliferación e induce la apoptosis de las células de MM, y reduce la viabilidad de estas células al aumentar su sensibilidad a inhibidores del proteasoma como el bortezomib (Tang *et al*., 2018). Sin embargo, miR-324-5p puede actuar asimismo como un oncomiR, reprimiendo la expresión de CUEDC2, una proteína supresora tumoral e inhibidora de la vía NF-kB, lo que se traduce en progresión tumoral, tanto en cáncer de colon como en cáncer de mama (Chen *et al*., 2014; Song *et al*., 2015). Por otro lado, la expresión de miR-331 correlaciona con una mejor supervivencia libre de progresión de enfermedad tras trasplante autólogo de células madre en MM, mientras que bajos niveles de miR-331 se asocian a una menor supervivencia y a una respuesta pobre a tratamientos del MM (Navarro *et al*., 2015). El microRNA miR-331-3p también muestra una expresión baja en tejidos tumorales de colon humano, donde actúa como supresor tumoral, ya que reprime la proliferación (Zhao *et al*., 2016). Asimismo, la sobreexpresión de miR-331-3p en líneas celulares humanas de cáncer colorrectal promueve la expresión de proteínas pro-apoptóticas e inhibe la fosforilación de Akt y ERK1/2 (Zhao *et al*., 2016). Por el contrario, su expresión en muestras de pacientes de cáncer de páncreas es elevada, ya que actúa como oncomiR (Chen *et al*., 2018).

Se ha descrito que miR-324-5p participa en la regulación de la vía *Hedgehog* (Hh) en células de meduloblastoma, mediante la represión de *SMO* (Ferretti *et al.,* 2008). La vía Hh participa en la organogénesis durante el desarrollo embrionario, en la homeostasis y en la reparación tisular en tejidos adultos. La activación de SMO induce la translocación al núcleo del factor de transcripción Glioma (Gli), el cual regula la expresión de c-Myc, Bcl-2 o de la ciclina D1, importantes en proliferación y supervivencia (Jing *et al.*, 2023). Sin embargo, la desregulación de la vía Hh contribuye a la tumorigénesis y la expansión de las células de MM (Peacock *et al*., 2007; Blotta *et al.,* 2012). Así, las células MGUS sobreexpresan *SMO*, *Ptch1* y *Gli,* contribuyendo al inicio y progreso de la enfermedad (Blotta *et al.,* 2012). Nuestros resultados mostraron que el aumento de expresión de miR-324-5p tras la adhesión mediada por α4β1 en células de MM se traduce en la inhibición de su diana *SMO*. En MM, miR-324-5p reprime la expresión de *SMO*, regulando negativamente la proliferación de las células de MM y la progresión de la enfermedad (Tang *et al*., 2018), sugiriendo que la contribución de α4β1 a la proliferación de células de MM sería independiente de su regulación negativa de *SMO*.

La vía de Hh se asocia a la resistencia de las células de MM a fármacos y a la reducción de la sensibilidad a tratamiento (Alonso *et al*., 2016; Tang *et al*., 2018). Asimismo, la adhesión mediada por integrinas α4 a la ECM protege a las células de MM de la muerte celular inducida por tratamiento (Damiano *et al.*, 1999; Noborio-Hatano *et al.,* 2009; Sevilla-Movilla *et al.*, 2020). Sin embargo, se ha descrito que miR-324-5p contribuye a la sensibilidad a fármacos en células de MM, inhibiendo a los transportadores de ATP MDR1 y MRP, encargados de la expulsión de fármacos y la resistencia a tratamiento (Tang *et al*., 2018; Handa *et al.*, 2019). Debido a la implicación de α4β1 en MM, nuestros resultados pueden conducir a la investigación de nuevos escenarios terapéuticos que impliquen las relaciones de esta integrina con los miRNAs y sus dianas objeto de regulación.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La ausencia de ICAP-1 altera la maduración de los timocitos SP $CD8^+$, lo que se traduce en una disminución de su frecuencia en el timo.
2. La disminución de timocitos SP $CD8^+$ correlaciona con una expresión reducida de *Runx3* en timos deficientes en ICAP-1.
3. La falta de ICAP-1 causa una inhibición de la proliferación de linfocitos T y B del bazo, así como una reducción de su apoptosis, lo que se asocia a la inducción de senescencia en bazos.
4. La reducción de la población de células MZB en bazos de ratones ICAP-$1^{-/-}$ está asociada a un aumento de la proporción de células pre-MZB, sugiriendo una alteración en la transición del estadío pre-MZB a MZB.
5. Las células MZB de ratones deficientes en ICAP-1 muestran una marcada reducción de la expresión de Notch2, una proteína requerida para el desarrollo de estas células, constituyendo un probable mecanismo responsable de la reducción de células MZB.
6. La ausencia de ICAP-1 causa una disminución de la expresión de S1PR1 y CXCR5 en células FOB y MZB, que se asocia con un defecto en la quimiotaxis hacia CXCL13.
7. La adhesión mediada por la integrina α4β1 de células de MM incrementa la expresión de miR-324-5p y miR-331-3p, un proceso que requiere la señalización dependiente de PI3K/Akt y ERK1/2. El incremento de expresión de miR-324-5p reprime la expresión de *SMO* de la vía *Hedgehog*.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abbas, K. A., Lichtman, A. H., Pillai, S. (2018). *Cellular and Molecular Immunology*. 9th Edition. Elsevier.

Abramson, J., Anderson, G. (2017). Thymic Epithelial Cells. *Annual review of immunology*, 35: 85–118. Doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052320.

Ahmad, N., Haider, S., Jagannathan, S., Anaissie, E., Driscoll, J. J. (2014). MicroRNA theragnostics for the clinical management of multiple myeloma. *Leukemia*, 28(4): 732–738. Doi: 10.1038/leu.2013.262.

Ahmed, R., Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5258): 54–60. Doi: 10.1126/science.272.5258.54.

Aiba, Y., Oh-Hora, M., Kiyonaka, S., Kimura, Y., Hijikata, A., Mori, Y., Kurosaki, T. (2004). Activation of RasGRP3 by phosphorylation of Thr-133 is required for B cell receptor-mediated Ras activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47): 16612–16617. Doi: 10.1073/pnas.0407468101.

Allegra, A., Ettari, R., Innao, V., Bitto, A. (2021). Potential Role of microRNAs in inducing Drug Resistance in Patients with Multiple Myeloma. *Cells*, 10(2): 448. Doi: 10.3390/cells10020448.

Allen, S. J., Crown, S. E., Handel, T. M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual review of immunology*, 25: 787–820. Doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090529.

Allman, D., Lindsley, R.C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S.A., Hardy, R.R. (2001). Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *Journal of immunology*, 167: 6834-6840.

Allman, D., Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Current Opinion in Immunology*, 20(2):149–157. Doi: 10.1016/j.coi.2008.03.014.

Alon, R., Ley, K. (2008). Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. Current Opinion in Cell Biology, 20(5): 525–532. Doi: 10.1016/j.ceb.2008.04.003.

Alonso, S., Hernandez, D., Chang, Y. T., Gocke, C. D., McCray, M., Varadhan, R., Matsui, W. H., Jones, R. J., Ghiaur, G. (2016). Hedgehog and retinoid signaling alters multiple myeloma microenvironment and generates bortezomib resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 126(12): 4460–4468. Doi: 10.1172/JCI88152.

Alsayed, Y., Ngo, H., Runnels, J., Leleu, X., Singha, U. K., Pitsillides, C. M., Spencer, J. A., Kimlinger, T., Ghobrial, J. M., Jia, X., Lu, G., Timm, M., Kumar, A., Côté, D., Veilleux, I., Hedin, K. E., Roodman, G. D., Witzig, T. E., Kung, A. L., Hideshima, T.,Ghobrial, I. M. (2007). Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood*, 109(7): 2708–2717. Doi: 10.1182/blood-2006-07-03585716.

Amodio, N., Stamato, M. A., Gullà, A. M., Morelli, E., Romeo, E., Raimondi, L., Pitari, M. R., Ferrandino, I., Misso, G., Caraglia, M., Perrotta, I., Neri, A., Fulciniti, M., Rolfo, C., Anderson, K. C., Munshi, N. C., Tagliaferri, P., Tassone, P. (2016). Therapeutic Targeting of miR-29b/HDAC4 Epigenetic Loop in Multiple Myeloma. *Molecular cancer therapeutics*, 15(6): 1364–1375. Doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0985.

Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self-shadow within the thymus by the aire protein. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5597): 1395–1401. Doi: 10.1126/science.1075958.

Andreani, V., Ramamoorthy, S., Pandey, A., Lupar, E., Nutt, S. L., Lämmermann, T., Grosschedl, R. (2018). Cochaperone Mzb1 is a key effector of Blimp1 in plasma cell differentiation and β1-integrin function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(41): E9630–E9639. Doi: 10.1073/pnas.1809739115.

Andreani, V., Ramamoorthy, S., Reinhard, F. (2023). Integrin β1 regulates marginal zone B cell differentiation and PI3K signaling. *Journal of Experimental Medicine,* 220(1): e20220342. Doi: 10.1084/jem.20220342.

Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Förster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L.,

Lipp, M., Cyster, J. G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*, 406(6793): 309–314. Doi: 10.1038/35018581.

Arnon, T. I., Horton, R. M., Grigorova, I. L., Cyster, J. G. (2013). Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature*, 493(7434): 684–688. Doi: 10.1038/nature11738.

Arroyo, A. G., Taverna, D., Whittaker, C. A., Strauch, U. G., Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D., Parker, C. M., Hynes, R. O. (2000). In vivo roles of integrins during leukocyte development and traffic: insights from the analysis of mice chimeric for alpha 5, alpha v, and alpha 4 integrins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(8): 4667–4675. Doi: 10.4049/jimmunol.165.8.4667.

Arroyo, A. G., Yang, J. T., Rayburn, H., Hynes, R. O. (1996). Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell*, 85(7): 997–1008. Doi: 10.1016/s0092-8674(00)81301-x.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5415): 770–776. Doi: 10.1126/science.284.5415.770.

Artyomov, M. N., Lis, M., Devadas, S., Davis, M. M., Chakraborty, A. K. (2010). CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39): 16916–16921. Doi: 10.1073/pnas.1010568107.

Ashby, K. M., Hogquist, K. A. (2023). A guide to thymic selection of T cells. *Nature Reviews Immunology*, 24: 103 –117. Doi: 10.1038/s41577-023-00911-8

Au-Yeung, B. B., Shah, N. H., Shen, L., Weiss, A. (2018). ZAP-70 in Signaling, Biology, and Disease. *Annual Review of Immunology*, 36: 127–156. Doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053335.

Azab, A. K., Runnels, J. M., Pitsillides, C., Moreau, A. S., Azab, F., Leleu, X., Jia, X., Wright, R., Ospina, B., Carlson, A. L., Alt, C., Burwick, N., Roccaro, A. M., Ngo, H. T., Farag, M., Melhem, M. R., Sacco, A., Munshi, N. C., Hideshima, T., Rollins, B. J., Ghobrial, I. M. (2009). CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. *Blood*, 113(18): 4341–4351. Doi: 10.1182/blood-2008-10-186668.

Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J. H., Lanier, L. L., Somoza, C. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature*, 366(6450): 76–79. Doi: 10.1038/366076a0.

Azzam, H. S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E. W., Love, P. E. (1998). CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *The Journal of experimental medicine*, *188*(12): 2301–2311. Doi: doi.org/10.1084/jem.188.12.2301.

B

Bai, A., Hu, H., Yeung, M., Chen, J. (2007). Kruppel-like factor 2 controls T cell trafficking by activating L-selectin (CD62L) and sphingosine-1-phosphate receptor 1 transcription. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(12): 7632–7639. Doi: 10.4049/jimmunol.178.12.7632.

Bain, G., Robanus Maandag, E. C., te Riele, H. P., Feeney, A. J., Sheehy, A., Schlissel, M., Shinton, S. A., Hardy, R. R., Murre, C. (1997). Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. *Immunity*, 6(2): 145–154. Doi: 10.1016/s1074-7613(00)80421-5.

Bangsow, C., Rubins, N., Glusman, G., Bernstein, Y., Negreanu, V., Goldenberg, D., Lotem, J., Ben-Asher, E., Lancet, D., Levanon, D., Groner, Y. (2001). The RUNX3 gene-sequence, structure and regulated expression. *Gene*, 279(2):221-232. Doi: 10.1016/s0378-1119(01)00760-0.

Bankovich, A. J., Shiow, L. R., Cyster, J. G. (2010). CD69 suppresses sphingosine 1-phosophate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *The Journal of biological chemistry*, 285(29): 22328–22337. Doi: 10.1074/jbc.M110.123299.

Bardi, G., Lipp, M., Baggiolini, M., Loetscher, P. (2001). The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC. *European journal of immunology*, 31(11): 3291–3297. Doi: 10.1002/1521-4141(200111)31:11<3291::aid-

immu3291>3.0.co;2-z.

Bartel D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1): 20–51. Doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006.

Batista, F. D., Arana, E., Barral, P., Carrasco, Y. R., Depoil, D., Eckl-Dorna, J., Fleire, S., Howe, K., Vehlow, A., Weber, M., Treanor, B. (2007). The role of integrins and coreceptors in refining thresholds for B-cell responses. *Immunological Reviews*, 218(1): 197–213. Doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00540.x.

Batista, F. D., Harwood, N. E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature Reviews Immunology*, 9(1): 15–27. Doi: 10.1038/nri2454.

Becker-Herman, S., Lantner, F., Shachar, I. (2002). Id2 negatively regulates B cell differentiation in the spleen. *Journal of immunology*, 168(11): 5507–5513. Doi: 10.4049/jimmunol.168.11.5507.

Belkina, A. C., Ciccolella, C. O., Anno, R., Halpert, R., Snyder-Cappione, J. E. (2019). Automated optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding improve visualization and analysis of large datasets. *Nature Communications*, 10(1): 1–12. Doi: 10.1038/s41467-019-13055-y.

Béraud-Dufour, S., Gautier, R., Albiges-Rizo, C., Chardin, P., Faurobert, E. (2007). Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. FEBS Journal, 274(21): 5518–5532. Doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06068.x.

Berkley, A. M., Hendricks, D. W., Simmons, K. B., Fink, P. J. (2013). Recent thymic emigrants and mature naive T cells exhibit differential DNA methylation at key cytokine loci. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(12): 6180–6186. Doi: 10.4049/jimmunol.1300181.

Beyers, A. D., Spruyt, L. L., Williams, A. F. (1992). Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7): 2945–2949. Doi: 10.1073/pnas.89.7.2945.

Blanco, R., Borroto, A., Schamel, W., Pereira, P., Alarcon, B. (2014). Conformational changes in the T cell receptor differentially determine T cell subset development in mice. *Science signaling*, 7(354): ra115. Doi: 10.1126/scisignal.2005650.

Blotta, S., Jakubikova, J., Calimeri, T., Roccaro, A. M., Amodio, N., Azab, A. K., Foresta, U., Mitsiades, C. S., Rossi, M., Todoerti, K., Molica, S., Morabito, F., Neri, A., Tagliaferri, P., Tassone, P., Anderson, K. C., Munshi, N. C. (2012). Canonical and noncanonical hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*, 120(25): 5002–5013. Doi: 10.1182/blood-2011-07-368142.

Boehm, T., Swann, J. B. (2014). Origin and evolution of adaptive immunity. *Annual review of animal biosciences*, 2: 259–283. Doi: 10.1146/annurev-animal-022513-114201.

Boothby, M. R., Hodges, E., Thomas, J. W. (2019). Molecular regulation of peripheral B cells and their progeny in immunity. *Genes & development*, 33(1-2): 26–48. Doi: 10.1101/gad.320192.118.

Borges Da Silva, H., Fonseca, R., Pereira, R. M., Cassado, A. A., Álvarez, J. M., D'Império Lima, M. R. (2015). Splenic macrophage subsets and their function during blood-borne infections. Frontiers in Immunology, 6: 480 . Doi: 10.3389/fimmu.2015.00480.

Borriello, F., Sethna, M. P., Boyd, S. D., Schweitzer, A. N., Tivol, E. A., Jacoby, D., Strom, T. B., Simpson, E. M., Freeman, G. J., Sharpe, A. H. (1997). B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, 6(3): 303–313. Doi: 10.1016/s1074-7613(00)80333-7.

Bouin, A. P., Kyumurkov, A., Régent-Kloeckner, M., Ribba, A. S., Faurobert, E., Fournier, H. N., Bourrin-Reynard, I., Manet-Dupé, S., Oddou, C., Balland, M., Planus, E., Albiges-Rizo, C. (2017). ICAP-1 monoubiquitylation coordinates matrix density and rigidity sensing for cell migration through ROCK2-MRCKα balance. *Journal of Cell Science*, 130(3): 626-636. Doi: 10.1242/jcs.202218.

Boursalian, T. E., Golob, J., Soper, D. M., Cooper, C. J., Fink, P. J. (2004). Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nature immunology*, 5(4): 418–425. Doi: 10.1038/ni1049.

Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Gribben, J. G., Daley, J., Gray, G., Nadler, L. M. (1993). Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that costimulate T-cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23): 11059–11063. Doi: 10.1073/pnas.90.23.11059.

Bouvard, D., Aszodi, A., Kostka, G., Block, M. R., Albigès-Rizo, C., Fässler, R. (2007). Defective osteoblastic function in ICAP-1-deficient mice. *Development*, 134(14): 2615–2625. Doi: 10.1242/dev.000877.

Bouvard, D., Millon-Fremillon, A., Dupe-Manet, S., Block, M. R., Albiges-Rizo, C. (2006). Unraveling ICAP-1 function: Toward a new direction?. *European Journal of Cell Biology*, 85(3–4): 275–282. Doi: 10.1016/j.ejcb.2005.10.005.

Bouvard, D., Vignoud, L., Dupé-Manet, S., Abed, N., Fournier, H. N., Vincent-Monegat, C., Francesco Retta, S., Fässler, R., Block, M. R. (2003). Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1α. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8): 6567–6574. Doi: 10.1074/jbc.M211258200.

Brakebusch, C., Fillatreau, S., Potocnik, A. J., Bungartz, G., Wilhelm, P., Svensson, M., Kearney, P., Körner, H., Gray, D., Fässler, R. (2002). Beta1 integrin is not essential for hematopoiesis but is necessary for the T cell-dependent IgM antibody response. *Immunity*, 16(3): 465–477. Doi: 10.1016/s1074-7613(02)00281-9.

Breed, E. R., Watanabe, M., Hogquist, K. A. (2019). Measuring Thymic Clonal Deletion at the Population Level. *The Journal of Immunology*, 202(11): 3226–3233. Doi: 10.4049/jimmunol.1900191.

Brownlie, R. J., Zamoyska, R. (2013). T cell receptor signalling networks: Branched, diversified and bounded. *Nature Reviews Immunology*, 13(4): 257–269. Doi: 10.1038/nri3403.

Brunner, M., Millon-Frémillon, A., Chevalier, G., Nakchbandi, I. A., Mosher, D., Block, M. R., Albigès-Rizo, C., Bouvard, D. (2011). Osteoblast mineralization requires β1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *Journal of Cell Biology*, 194(2), 307–322. Doi: 10.1083/jcb.201007108.

Brütsch, R., Liebler, S. S., Wüstehube, J., Bartol, A., Herberich, S. E., Adam, M. G., Telzerow, A., Augustin, H. G., Fischer, A. (2010). Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 attenuates sprouting angiogenesis. *Circulation Research*, 107(5): 592–601. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.217257.

Bubeck-Wardenburg, J., Fu, C., Jackman, J. K., Flotow, H., Wilkinson, S. E., Williams, D. H., Johnson, R., Kong, G., Chan, A. C., Findel, P. R. (1996). Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *Journal of Biological Chemistry*, 271(33): 19641–19644. Doi: 10.1074/jbc.271.33.19641.

Buckley, A. F., Kuo, C. T., Leiden, J. M. (2001). Transcription factor LKLF is sufficient to program T cell quiescence via a c-Myc-dependent pathway. *Nature immunology*, 2(8): 698–704. Doi: 10.1038/90633.

Bungartz, G., Stiller, S., Bauer, M., Müller, W., Schippers, A., Wagner, N., Fässler, R., Brakebusch, C. (2006). Adult murine hematopoiesis can proceed without β1 and β7 integrins. *Blood*, 108(6): 1857–1864. Doi: 10.1182/blood-2005-10-007658.

Burgess, K. E., Yamamoto, M., Prasad, K. V., Rudd, C. E. (1992). CD5 acts as a tyrosine kinase substrate within a receptor complex comprising T-cell receptor zeta chain/CD3 and protein-tyrosine kinases p56lck and p59fyn. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(19): 9311–9315. Doi: 10.1073/pnas.89.19.9311.

Butcher, E. C., Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. Science (New York, N.Y.), 272(5258): 60–66. Doi: 10.1126/science.272.5258.60.

Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L., Briskin, M. (1999). Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Advances in immunology*, 72: 209–253. Doi: 10.1016/s0065-2776(08)60022-x.

C

Cabezas-Wallscheid, N., Klimmeck, D., Hansson, J., Lipka, D. B., Reyes, A., Wang, Q., Weichenhan, D., Lier, A., Von Paleske, L., Renders, S., Wünsche, P., Zeisberger, P., Brocks,

D., Gu, L., Herrmann, C., Haas, S., Essers, M. A. G., Brors, B., Eils, R., Huber, W., Milsom, M. D., Plass, C., Krijgsveldm J., Trumpp, A. (2014). Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis. *Cell Stem Cell*, 15(4): 507–522. Doi: 10.1016/j.stem.2014.07.005.

Calderón, L., Schindler, K., Malin, S. G., Schebesta, A., Sun, Q., Schwickert, T., Alberti, C., Fischer, M., Jaritz, M., Tagoh, H., Ebert, A., Minnich, M., Liston, A., Cochella, L., Busslinger, M. (2021). Pax5 regulates B cell immunity by promoting PI3K signaling via PTEN down-regulation. *Science immunology*, 6(61): eabg5003. Doi:10.1126/sciimmunol.abg5003.

Calderwood, D. A. (2004). Integrin activation. *Journal of Cell Science*, 117(5): 657–666. Doi:10.1242/jcs.01014.

Cantrell D. (2015). Signaling in lymphocyte activation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(6): a018788. Doi: 10.1101/cshperspect.a018788.

Cariappa, A., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K., Pillai, S. (2001). The Follicular versus Marginal Zone B Lymphocyte Cell Fate Decision Is Regulated by Aiolos, Btk and CD21. *Immunity*, 14: 603–615. Doi: 10.1016/s1074-7613(01)00135-2.

Carlson, C. M., Endrizzi, B. T., Wu, J., Ding, X., Weinreich, M. A., Walsh, E. R., Wani, M. A., Lingrel, J. B., Hogquist, K. A., Jameson, S. C. (2006). Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature*, 442(7100): 299–302. Doi: 10.1038/nature0488218.

Carman, C. V., Springer, T. A. (2003). Integrin avidity regulation: Are changes in affinity and conformation underemphasized?. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(5): 547–556. Doi: 10.1016/j.ceb.2003.08.003.

Carpenter, A. C., Bosselut, R. (2010). Decision checkpoints in the thymus. *Nature Immunology*, 11(8): 666–673. Doi: 10.1038/ni.1887.

Ceredig, R., Rolink, T. (2002). A positive look at double-negative thymocytes. *Nature reviews. Immunology*, 2(11): 888–897. Doi: 10.1038/nri937.

Cerutti, A., Cols, M., Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*, 13(2): 118–132. Doi: 10.1038/nri3383

Chang, D. D., Hoang, B. Q., Liu, J., Springer, T. A. (2002). Molecular basis for interaction between Icap1α PTB domain and β1 integrin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10): 8140–8145. Doi: 10.1074/jbc.M109031200.

Chang, D. D., Wong, C., Smith, H., Liu, J. (1997). ICAP-1, a Novel 1 Integrin Cytoplasmic Domain-associated Protein, Binds to a Conserved and Functionally Important NPXY Sequence Motif of 1 Integrin. *The Journal of Cell Biology*, 138 (5): 1149–1157. Doi: 10.1083/jcb.138.5.1149.

Chauveau, A., Pirgova, G., Cheng, H. W., De Martin, A., Zhou, F. Y., Wideman, S., Rittscher, J., Ludewig, B., Arnon, T. I. (2020). Visualization of T Cell Migration in the Spleen Reveals a Network of Perivascular Pathways that Guide Entry into T Zones. *Immunity*, 52(5): 794-807.e7. Doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.010.

Chen, J. Y., Miyanishi, M., Wang, S. K., Yamazaki, S., Sinha, R., Kao, K. S., Seita, J., Sahoo, D., Nakauchi, H., Weissman, I. L. (2016). Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature*, 530(7589): 223–227. Doi: 10.1038/nature16943.

Chen, W. J., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *The Journal of biological chemistry*, 265(6): 3116–3123.

Chen, X., Luo, H., Li, X., Tian, X., Peng, B., Liu, S., Zhan, T., Wan, Y., Chen, W., Li, Y., Lu, Z., Huang, X. (2018). miR-331-3p functions as an oncogene by targeting ST7L in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, 39(8): 1006–1016. Doi: 10.1093/carcin/bgy074/5025654.

Chen, Y., Wang, S. X., Mu, R., Luo, X., Liu, Z. S., Liang, B., Zhuo, H. L., Hao, X. P., Wang, Q., Fang, D. F., Bai, Z. F., Wang, Q. Y., Wang, H. M., Jin, B. F., Gong, W. L., Zhou, T., Zhang, X. M., Xia, Q., Li, T. (2014). Dysregulation of the MiR-324-5p-CUEDC2 Axis Leads to Macrophage Dysfunction and Is Associated with Colon Cancer. *Cell Reports*, 7(6): 1982–1993. Doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.007.

Chiba, K., Matsuyuki, H., Maeda, Y., Sugahara, K. (2006). Role of Sphingosine 1-Phosphate Receptor Type 1 in Lymphocyte Egress from Secondary Lymphoid Tissues and Thymus.

Cellular & Molecular Immunology, 3(1): 11–9.
Cho, J., Sprent, J. (2018). TCR tuning of T cell subsets. *Immunological reviews*, 283(1): 129–137. Doi:10.1111/imr.12646.
Choi, Y. J., Lee, H., Kim, J. H., Kim, S. Y., Koh, J. Y., Sa, M., Park, S. H., Shin, E. C. (2022). CD5 Suppresses IL-15-Induced Proliferation of Human Memory CD8+ T Cells by Inhibiting mTOR Pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 209(6): 1108–1117. Doi: 10.4049/jimmunol.2100854.
Chopin, M., Quemeneur, L., Ripich, T., Jessberger, R. (2010). SWAP-70 controls formation of the splenic marginal zone through regulating T1B-cell differentiation. *European journal of immunology*, 40(12): 3544–3556. Doi: 10.1002/eji.201040556.
Chu, V. T., Berek, C., Batista, F. (2012). The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunological Reviews*, 251(1):177-88. Doi: 10.1111/imr.12011.
Chung, D. D., Honda, K., Cafuir, L., McDuffie, M., Wotton, D. (2007). The Runx3 distal transcript encodes an additional transcriptional activation domain. *FEBS Journal*, 274(13): 3429–3439. Doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05875.x.
Cibrián, D., Sánchez-Madrid, F. (2017). CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *European Journal of Immunology*, 47(6): 946–953. Doi: 10.1002/eji.201646837.
Cinamon, G., Matloubian, M., Lesneski, M. J., Xu, Y., Low, C., Lu, T., Proia, R. L., Cyster, J. G. (2004). Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nature Immunology*, 5(7): 713–720. Doi: 10.1038/ni1083.
Cinamon, G., Zachariah, M. A., Lam, O. M., Foss, F. W., Cyster, J. G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nature Immunology*, 9(1): 54–62. Doi:10.1038/ni1542.
Ciofani, M., Zúñiga-Pflücker, J. C. (2005). Notch promotes survival of pre – T cells at the b - selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nature Immunology*. 6(9): 881–888. Doi: 10.1038/ni1234.
Clipson, A., Wang, M., de Leval, L., Ashton-Key, M., Wotherspoon, A., Vassiliou, G., Bolli, N., Grove, C., Moody, S., Escudero-Ibarz, L., Gundem, G., Brugger, K., Xue, X., Mi, E., Bench, A., Scott, M., Liu, H., Follows, G., Robles, E. F., Martinez-Climent, J. A., Du, M. Q. (2015). KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype. *Leukemia*, 29(5): 1177–1185. Doi: 10.1038/leu.2014.330.
Conrad, D. H., Ford, J. W., Sturgill, J. L., Gibb, D. R. (2007). CD23: an overlooked regulator of allergic disease. *Current allergy and asthma reports*, 7(5): 331–337. Doi: 10.1007/s11882-007-0050-y.
Cooper, J., Giancotti, F. G. (2019). Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer cell*, 35(3): 347–367. Doi: 10.1016/j.ccell.2019.01.007.
Corthals, S. L., Sun, S. M., Kuiper, R., de Knegt, Y., Broyl, A., van der Holt, B., Beverloo, H. B., Peeters, J. K., el Jarari, L., Lokhorst, H. M., Zweegman, S., Jongen-Lavrencic, M., Sonneveld, P. (2011). MicroRNA signatures characterize multiple myeloma patients. *Leukemia*, 25(11): 1784–1789. Doi: 10.1038/leu.2011.147.
Crotty S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*, 41(4): 529–542. Doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.004.
Crump, M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Baggiolini, M., Sykes, B. D., Clark-Lewis, I. (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The EMBO journal*, 16(23): 6996–7007. Doi: 10.1093/emboj/16.23.6996.
Cyster, J. G., Allen, C. D. C. (2019). B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell*, 177(3): 524–540. Doi: 10.1016/j.cell.2019.03.016.
Cyster, J. G., Schwab, S. R. (2012). Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annual Review of Immunology*, 30: 69–94. Doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075011.

D

Dal Porto, J. M., Gauld, S. B., Merrell, K. T., Mills, D., Pugh-Bernard, A. E., Cambier, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Molecular immunology*, 41(6-7): 599–613. Doi: 10.1016/j.molimm.2004.04.008.

Dalton, C. J., Lemmon, C. A. (2021). Fibronectin: Molecular structure, fibrillar structure and mechanochemical signaling. *Cells*, 10(9): 2443. Doi: 10.3390/cells10092443.

Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., Dalton, W. S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*, 93(5): 1658–1667.

Davis, D. M. (2009). Mechanisms and functions for the duration of intercellular contacts made by lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 9(8): 543–555. Doi: 10.1038/nri2602.

Davis, M. D., Kehrl, J. H. (2009). The influence of sphingosine-1-phosphate receptor signaling on lymphocyte trafficking: How a bioactive lipid mediator grew up from an 'immature' vascular maturation factor to a 'mature' mediator of lymphocyte behavior and function. *Immunologic Research*, 43(1–3): 187–197. Doi: 10.1007/s12026-008-8066-5.

De Bruijn, M. F. T. R., Speck, N. A. (2004). Core-binding factors in hematopoiesis and immune function. *Oncogene*, 23(24): 4238–4248. Doi: 10.1038/sj.onc.1207763.

Degani, S., Balzac, F., Brancaccio, M., Guazzone, S., Retta, S. F., Silengo, L., Eva, A., Tarone, G. (2002). The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *Journal of Cell Biology*, 156(2): 377–387. Doi: 10.1083/jcb.200108030.

Desantis, V., Savino, F. D., Scaringella, A., Potenza, M. A., Nacci, C., Frassanito, M. A., Vacca, A., Montagnani, M. (2022). The Leading Role of the Immune Microenvironment in Multiple Myeloma: A New Target with a Great Prognostic and Clinical Value. *Journal of clinical medicine*, 11(9): 2513. Doi: 10.3390/jcm11092513.

De Silva, N. S., Silva, K., Anderson, M. M., Bhagat, G., Klein, U. (2016). Impairment of Mature B Cell Maintenance upon Combined Deletion of the Alternative NF-κB Transcription Factors RELB and NF-κB2 in B Cells. *Journal of immunology*, 196(6): 2591–2601. Doi: 10.4049/jimmunol.1501120.

De Weers, M., Verschuren, M. C., Kraakman, M. E., Mensink, R. G., Schuurman, R. K., van Dongen, J. J., Hendriks, R. W. (1993). The Bruton's tyrosine kinase gene is expressed throughout B cell differentiation, from early precursor B cell stages preceding immunoglobulin gene rearrangement up to mature B cell stages. *European journal of immunology*, 23(12): 3109–3114. Doi: 10.1002/eji.1830231210.

Dimopoulos, K., Gimsing, P., Grønbæk, K. (2013). Aberrant microRNA expression in multiple myeloma. *European Journal of Haematology*, 91(2): 95–105. Doi: 10.1111/ejh.12124.

Draheim, K. M., Huet-Calderwood, C., Simon, B., Calderwood, X. D. A. (2017). Nuclear localization of integrin cytoplasmic domain associated protein-1 (ICAP1) influences β1 integrin activation and recruits Krev/interaction trapped-1 (KRIT1) to the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 292(5): 1884–1898. Doi: 10.1074/jbc.M116.762393.

Dutta, A., Zhao, B., Love, P. E. (2021). New insights into TCR β-selection. *Trends in immunology*, 42(8): 735–750. Doi: 10.1016/j.it.2021.06.005.

E

Ebisuno, Y., Tanaka, T., Kanemitsu, N., Kanda, H., Yamaguchi, K., Kaisho, T., Akira, S., Miyasaka, M. (2003). Cutting edge: the B cell chemokine CXC chemokine ligand 13/B lymphocyte chemoattractant is expressed in the high endothelial venules of lymph nodes and Peyer's patches and affects B cell trafficking across high endothelial venules. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(4): 1642–1646. Doi: 10.4049/jimmunol.171.4.1642.

Egawa, T., Tillman, R. E., Naoe, Y., Taniuchi, I., Littman, D. R. (2007). The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 204(8): 1945–1957. Doi: 10.1084/jem.20070133.

Ehlers, M., Laule-Kilian, K., Petter, M., Aldrian, C. J., Grueter, B., Würch, A., Yoshida, N., Watanabe, T., Satake, M., Steimle, V. (2003). Morpholino Antisense Oligonucleotide-Mediated Gene Knockdown During Thymocyte Development Reveals Role for Runx3

Transcription Factor in CD4 Silencing During Development of CD4−/CD8+ Thymocytes. *The Journal of Immunology*, 171(7): 3594–3604. Doi: 10.4049/jimmunol.171.7.3594.

Ellmeier, W., Sawada, S., Littman, D. R. (1999). The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annual review of immunology*, 17: 523–554. Doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.523.

Evans, R., Patzak, I., Svensson, L., De Filippo, K., Jones, K., McDowall, A., Hogg, N. (2009). Integrins in immunity. *Journal of Cell Science*, 122 (2): 215–225. Doi:10.1242/jcs.019117.

F

Faurobert, E., Rome, C., Lisowska, J., Manet-Dupé, S., Boulday, G., Malbouyres, M., Balland, M., Bouin, A. P., Kéramidas, M., Bouvard, D., Coll, J. L., Ruggiero, F., Tournier-Lasserve, E., Albiges-Rizo, C. (2013). CCM1-ICAP-1 complex controls β1 integrin-dependent endothelial contractility and fibronectin remodeling. *Journal of Cell Biology*, 202(3): 545–561. Doi: 10.1083/jcb.201303044.

Fearon, D. T., Carter, R. H. (1995). The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annual review of immunology*, 13: 127–149. Doi: 10.1146/annurev.iy.13.040195.001015.

Federico, C., Sacco, A., Belotti, A., Ribolla, R., Cancelli, V., Giacomini, A., Ronca, R., Chiarini, M., Imberti, L., Marini, M., Rossi, G., Presta, M., Paiva, B., Roccaro, A. M. (2019). Circulating microRNAs and their role in multiple myeloma. *Non-coding RNA*, 5(2): 37. Doi: 10.3390/NCRNA5020037.

Ferretti, E., De Smaele, E., Miele, E., Laneve, P., Po, A., Pelloni, M., Paganelli, A., Di Marcotullio, L., Caffarelli, E., Screpanti, I., Bozzoni, I., Gulino, A. (2008). Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *The EMBO journal*, 27(19): 2616–2627. Doi: 10.1038/emboj.2008.172.

Fiorini, E., Merck, E., Wilson, A., Ferrero, I., Jiang, W., Koch, U., Auderset, F., Laurenti, E., Tacchini-Cottier, F., Pierres, M., Radtke, F., Luther, S. A., Macdonald, H. R. (2009). Dynamic regulation of notch 1 and notch 2 surface expression during T cell development and activation revealed by novel monoclonal antibodies. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(11): 7212–7222. Doi: 10.4049/jimmunol.0902432.

Flach, H., Rosenbaum, M., Duchniewicz, M., Kim, S., Zhang, S. L., Cahalan, M. D., Mittler, G., Grosschedl, R. (2010). Mzb1 protein regulates calcium homeostasis, antibody secretion, and integrin activation in innate-like B cells. *Immunity*, 33(5): 723–735. Doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.013.

Flaswinkel, H., Reth, M. (1994). Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *The EMBO journal*, 13(1): 83–89. Doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06237.x.

Fontela, M. G., Notario, L., Alari-Pahissa, E., Lorente, E., Lauzurica, P. (2019). The conserved non-coding sequence 2 (CNS2) enhances CD69 transcription through cooperation between the transcription factors oct1 and RUNX1. *Genes*, 10(9). Doi: 10.3390/genes10090651.

Förster, R., Davalos-Misslitz, A. C., Rot, A. (2008). CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature reviews. Immunology*, 8(5): 362–371. Doi: 10.1038/nri2297.

Förster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., Lipp, M. (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell*, 87(6): 1037–1047. Doi: 10.1016/s0092-8674(00)81798-5.

Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99(1): 23–33. Doi: 10.1016/s0092-8674(00)80059-8.

Fournier, H. N., Dupé-Manet, S., Bouvard, D., Lacombe, M. L., Marie, C., Block, M. R., Albiges-Rizo, C. (2002). Integrin cytoplasmic domain-associated protein 1α (ICAP-1α) interacts directly with the metastasis suppressor nm23-H2, and both proteins are targeted to newly formed cell adhesion sites upon integrin engagement. *Journal of Biological*

Chemistry, 277(23): 20895–20902. Doi: 10.1074/jbc.M200200200.

Fournier, H.-N., Dupé-Manet, S., Bouvard, D., Luton, F., Degani, S., Block, M. R., Retta, S. F., Albiges-Rizo, C. (2005). Nuclear Translocation of Integrin Cytoplasmic Domain-associated Protein 1 Stimulates Cellular Proliferation. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4): 1859–1871. Doi: 10.1091/mbc.E04.

Freeman, G. J., Gribben, J. G., Boussiotis, V. A., Ng, J. W., Restivo, V. A., Jr, Lombard, L. A., Gray, G. S., Nadler, L. M. (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5135): 909–911. Doi: 10.1126/science.7694363.

Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M., Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular Biology of the Cell*, 23(11): 2066–2075. Doi: 10.1091/mbc.E11-10-0884.

Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T., Chan, A. C. (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity*, 9(1): 93–103. Doi: 10.1016/s1074-7613(00)80591-9.

Fuxa, M., Busslinger, M. (2007). Reporter gene insertions reveal a strictly B lymphoid-specific expression pattern of Pax5 in support of its B cell identity function. *Journal of immunology,* 178(5): 3031–3037. Doi: 10.4049/jimmunol.178.5.3031.

G

García-Bernal, D., Wright, N., Sotillo-Mallo, E., Nombela-Arrieta, C., Stein, J. V, Bustelo, X. R., Teixidó, J. (2005). Vav1 and Rac Control Chemokine-promoted T Lymphocyte Adhesion Mediated by the Integrin α4β1. *Molecular Biology of the Cell*, 16: 3223–3235. Doi: 10.1091/mbc.E04.

García-Ortiz, A., Rodríguez-García, Y., Encinas, J., Maroto-Martín, E., Castellano, E., Teixidó, J., Martínez-López, J. (2021). The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. *Cancers*, 13(2): 217. Doi: 10.3390/cancers.

Gaudette, B. T., Roman, C. J., Ochoa, T. A., Atria, D. G., Jones, D. D., Siebel, C. W., Maillard, I., Allman, D. (2021). Resting innate-like B cells leverage sustained Notch2/ mTORC1 signaling to achieve rapid and mitosis independent plasma cell differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, 131(20): e151975. Doi: 10.1172/JCI151975.

Gerson, K. D., Shearstone, J. R., Maddula, V. S. R. K., Seligmann, B. E., Mercurio, A. M. (2012). Integrin β4 regulates SPARC protein to promote invasion. *The Journal of biological chemistry,* 287(13): 9835–9844. Doi: 10.1074/jbc.M111.317727.

Ghobrial I. M. (2012). Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood*, 120(1): 20–30. Doi: 10.1182/blood-2012-01-379024.

Gibb, D. R., El Shikh, M., Kang, D. J., Rowe, W. J., El Sayed, R., Cichy, J., Yagita, H., Tew, J. G., Dempsey, P. J., Crawford, H. C., Conrad, D. H. (2010). ADAM10 is essential for Notch2-dependent marginal zone B cell development and CD23 cleavage in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 207(3): 623–635. Doi: 10.1084/jem.20091990.

Gil, D., Schamel, W. W., Montoya, M., Sánchez-Madrid, F., Alarcón, B. (2002). Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell*, 109(7): 901–912. Doi: 10.1016/s0092-8674(02)00799-7.

Giuliani, N., Rizzoli, V., Roodman, G. D. (2006). Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood*, 108(13): 3992–3996. Doi: 10.1182/blood-2006-05-026112.

Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 150(10): 4244–4252.

Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4): 813–827. Doi: 10.1016/j.cell.2019.10.005.

Graham, G. J., Handel, T. M., Proudfoot, A. E. I. (2019). Leukocyte Adhesion: Reconceptualizing

Chemokine Presentation by Glycosaminoglycans. *Trends in Immunology*, 40(6): 472–481. Doi: 10.1016/j.it.2019.03.009.

Green, D. R., Droin, N., Pinkoski, M. (2003). Activation-induced cell death in T cells. *Immunological Reviews*, 193: 70–81. Doi: 10.1034/j.1600-065X.2003.00051.x.

Grewal, I. S., Flavell, R. A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annual review of immunology*, 16: 111–135. Doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.111.

Gribi, R., Hook, L., Ure, J., Medvinsky, A. (2006). The differentiation program of embryonic definitive hematopoietic stem cells is largely α4 integrin independent. *Blood*, 108(2): 501–509. Doi: 10.1182/blood-2005-10-4209.

Griffith, J. W., Sokol, C. L., Luster, A. D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*, 32: 659–702. Doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120145.

Guan, J. L., Hynes, R. O. (1990). Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell*, 60(1): 53–61. Doi: 10.1016/0092-8674(90)90715-q.

Gururajan, M., Simmons, A., Dasu, T., Spear, B. T., Calulot, C., Robertson, D. A., Wiest, D. L., Monroe, J. G., Bondada, S. (2008). Early growth response genes regulate B cell development, proliferation and immune response. *Journal of Immunology*, 181(7): 4590–602. Doi: 10.4049/jimmunol.181.7.4590.

György, I., Boller, S., Nechanitzky, R., Mandel, E., Pott, S., Liu, E., Grosschedl, R. (2012). Transcription factor Ebf1 regulates differentiation stage-specific signaling, proliferation, and survival of B cells. *Genes & development*, 26(7): 668–682. Doi: 10.1101/gad.187328.112.

H

Hammad, H., Vanderkerken, M., Pouliot, P., Deswarte, K., Toussaint, W., Vergote, K., Vandersarren, L., Janssens, S., Ramou, I., Savvides, S. N., Haigh, J. J., Hendriks, R., Kopf, M., Craessaerts, K., De Strooper, B., Kearney, J. F., Conrad, D. H., Lambrecht, B. N. (2017). Transitional B cells commit to marginal zone B cell fate by Taok3-mediated surface expression of ADAM10. *Nature Immunology*, 18(3): 313–320. Doi: 10.1038/ni.3657.s

Hampel, F., Ehrenberg, S., Hojer, C., Draeseke, A., Marschall-Schröter, G., Kühn, R., Mack, B., Gires, O., Vahl, C. J., Schmidt-Supprian, M., Strobl, L. J., Zimber-Strobl, U. (2011). CD19-independent instruction of murine marginal zone B-cell development by constitutive Notch2 signaling. *Blood*, 118(24): 6321–6331. Doi: 10.1182/blood-2010-12-325944.

Handa, H., Murakami, Y., Ishihara, R., Kimura-Masuda, K., Masuda, Y. (2019). The role and function of microRNA in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cancers*, 11(11): 1738. Doi: 10.3390/cancers11111738.

Hardy, R. R., Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annual Review of Immunology*, 19: 595–621. Doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.595.

Hart, G. T., Hogquist, K. A., Jameson, S. C. (2012). Krüppel-like Factors in Lymphocyte Biology. *The Journal of Immunology*, 188(2): 521–526. Doi: 10.4049/jimmunol.1101530.

Hart, G. T., Wang, X., Hogquist, K. A., Jameson, S. C. (2011). Krüppel-like factor 2 (KLF2) regulates B-cell reactivity, subset differentiation, and trafficking molecule expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2): 716–721. Doi: 10.1073/pnas.1013168108.

Hashimoto, S., Iwamatsu, A., Ishiai, M., Okawa, K., Yamadori, T., Matsushita, M., Baba, Y., Kishimoto, T., Kurosaki, T., Tsukada, S. (1999). Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK-functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *Blood*, 94(7): 2357–2364.

Hathcock, K. S., Hodes, R. J. (1996). Role of the CD28-B7 costimulatory pathways in T cell-dependent B cell responses. *Advances in immunology*, 62: 131–166. Doi: 10.1016/s0065-2776(08)60429-0.

Hayashi, K., Nittono, R., Okamoto, N., Tsuji, S., Hara, Y., Goitsuka, R., Kitamura, D. (2000). The B cell-restricted adaptor BASH is required for normal development and antigen receptor-mediated activation of B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 97(6): 2755–2760. Doi: 10.1073/pnas.040575697.

He, X., He, X., Dave, V. P., Zhang, Y., Hua, X., Nicolas, E., Xu, W., Roe, B. A., Kappes, D. J. (2005). The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature*, 433(7028): 826–833. Doi: 10.1038/nature03338.

Henderson, J. G., Opejin, A., Jones, A., Gross, C., Hawiger, D. (2015). CD5 instructs extrathymic regulatory T cell development in response to self and tolerizing antigens. *Immunity*, 42(3): 471–483. Doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.010.

Herzog, S., Reth, M., Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*, 9(3): 195–205. Doi: 10.1038/nri2491.

Hideshima, T., Mitsiades, C., Tonon, G., Richardson, P. G., Anderson, K. C. (2007). Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 7(8):585–598. Doi: 10.1038/nrc2189.

Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J. M., Takayanagi, H., Yokota, Y., Yamada, H., Yoshikai, Y., Inoue, J., Akiyama, T., Takahama, Y. (2008). The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator. *Immunity*, 29(3): 438–450. Doi: 10.1016/j.immuni.2008.06.018.

Hodgkin, P. D., Ning, F. G., Cupp, J. E., Howard, M. (1991). Interleukin-4 Enhances Anti-IgM Stimulation of B Cells by Improving Cell Viability and by Increasing the Sensitivity of B Cells to the Anti-IgM Signal. *Cellular Immunology*, 134(1): 14–30. Doi: 10.1016/0008-8749(91)90327-8.

Hoek, K. L., Gordy, L. E., Collins, P. L., Parekh, V. V., Aune, T. M., Joyce, S., Thomas, J. W., Van Kaer, L., Sebzda, E. (2010). Follicular B Cell Trafficking within the Spleen Actively Restricts Humoral Immune Responses. *Immunity*, 33(2): 254–265. Doi: 10.1016/j.immuni.2010.07.016.

Hogquist, K. A., Baldwin, T. A., Jameson, S. C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature reviews. Immunology*, 5(10): 772–782. Doi: 10.1038/nri1707.s

Hogquist, K. A., Xing, Y., Hsu, F. C., Shapiro, V. S. (2015). T Cell Adolescence: Maturation Events Beyond Positive Selection. *The Journal of Immunology*, 195(4): 1351–1357. Doi: 10.4049/jimmunol.1501050.

Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H., Reth, M. (1990). Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature*, 343(6260): 760–762. Doi: 10.1038/343760a0.

Horcher, M., Souabni, A., Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP Maintains the Identity of B Cells in Late B Lymphopoiesis. *Immunity*, 14(6): 779-90. Doi:10.1016/s1074-7613(01)00153-4.

Hozumi, K., Negishi, N., Suzuki, D., Abe, N., Sotomaru, Y., Tamaoki, N., Mailhos, C., Ish-Horowicz, D., Habu, S., Owen, M. J. (2004). Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nature immunology*, 5(6), 638–644. Doi: 10.1038/ni1075.

Huang, H. J., Jones, N. H., Strominger, J. L., Herzenberg, L. A. (1987). Molecular cloning of Ly-1, a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and a subset of B cells: molecular homology to its human counterpart Leu-1/T1 (CD5). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(1): 204–208. Doi: 10.1073/pnas.84.1.204.

Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6): 673–687. Doi: 10.1016/S0092-8674(02)00971-6.

I

Itkin, T., Gur-Cohen, S., Spencer, J. A., Schajnovitz, A., Ramasamy, S. K., Kusumbe, A. P., Ledergor, G., Jung, Y., Milo, I., Poulos, M. G., Kalinkovich, A., Ludin, A., Kollet, O., Shakhar, G., Butler, J. M., Rafii, S., Adams, R. H., Scadden, D. T., Lin, C. P., Lapidot, T. (2016). Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature*, 532(7599): 323–328. Doi: 10.1038/nature17624.

Ito, Y., Bae, S. C., Chuang, L. S. H. (2015). The RUNX family: Developmental regulators in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(2): 81–95. Doi: 10.1038/nrc3877.

Ivaska, J., Heino, J. (2011). Cooperation between integrins and growth factor receptors in signaling and endocytosis. *Annual review of cell and developmental biology*, 27: 291–320. Doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154017.

J

Jagannathan-Bogdan, M., Zon, L. I. (2013). Hematopoiesis. *Development (Cambridge, England)*, 140(12): 2463–2467. Doi: 10.1242/dev.083147.

Jameson, S. C., Masopust, D. (2018). Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity*, 48(2): 214–226. Doi: 10.1016/j.immuni.2018.02.010.

Janas, M. L., Varano, G., Gudmundsson, K., Noda, M., Nagasawa, T., Turner, M. (2010). Thymic development beyond β-selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4. *Journal of Experimental Medicine*, 207(1): 247–261. Doi: 10.1084/jem.20091430.

Jeannin, P., Delneste, Y., Lecoanet-Henchoz, S., Gauchat, J. F., Ellis, J., Bonnefoy, J. Y. (1997). CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(25): 15613–15619. Doi: 10.1074/jbc.272.25.15613.

Jing, J., Wu, Z., Wang, J., Luo, G., Lin, H., Fan, Y., Zhou, C. (2023). Hedgehog signaling in tissue homeostasis, cancers, and targeted therapies. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1): 315. Doi: 10.1038/s41392-023-01559-5.

K

Kaech, S. M., Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 12(11):749–761. Doi: 10.1038/nri3307.

Kearney, J. F., Lawton, A. R. (1975). B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 115(3): 671–676.

Khan, W. N., Alt, F. W., Gerstein, R. M., Malynn, B. A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Müller, S., Kantor, A. B., Herzenberg, L. A. (1995). Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity*, 3(3): 283–299. Doi: 10.1016/1074-7613(95)90114-0.

Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Yilmaz, O. H., Terhorst, C., Morrison, S. J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, *121*(7): 1109–1121. Doi: 10.1016/j.cell.2005.05.026.

Kim, M., Carman, C. V., Springer, T. A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5640): 1720–1725. Doi: 10.1126/science.1084174.

Kim, V. N., Han, J., Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(2): 126–139. Doi: 10.1038/nrm2632.

Kimura, M. Y., Thomas, J., Tai, X., Guinter, T. I., Shinzawa, M., Etzensperger, R., Li, Z., Love, P., Nakayama, T., Singer, A. (2016). Timing and duration of MHC I positive selection signals are adjusted in the thymus to prevent lineage errors. *Nature Immunology*, 17(12): 1415–1423. Doi: 10.1038/ni.3560.

Kin, N. W., Sanders, V. M. (2006). CD86 Stimulation on a B Cell Activates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Phospholipase Cγ2/Protein Kinase Cαβ Signaling Pathways. *The Journal of Immunology*, 176(11): 6727–6735. Doi: 10.4049/jimmunol.176.11.6727.

Kishimoto, H., Sprent, J. (1997). Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *The Journal of experimental medicine*, 185(2): 263–271. Doi: 10.1084/jem.185.2.263.

Kishimoto, H., Surh, C. D., Sprent, J. (1995). Upregulation of surface markers on dying thymocytes. *The Journal of experimental medicine*, 181(2): 649–655. Doi: 10.1084/jem.181.2.649.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature reviews. Immunology*, 14(6): 377–391. Doi: 10.1038/nri3667.

Klein, U., Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: Role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology* , 8(1): 22–33. Doi: 10.1038/nri2217.

Kohm, A. P., Mozaffarian, A., Sanders, V. M. (2002). B Cell Receptor- and β2-Adrenergic Receptor-Induced Regulation of B7-2 (CD86) Expression in B Cells. *The Journal of Immunology*, 168(12): 6314–6322. Doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6314.

Kohu, K., Sato, T., Ohno, S., Hayashi, K., Uchino, R., Abe, N., Nakazato, M., Yoshida, N., Kikuchi, T., Iwakura, Y., Inoue, Y., Watanabe, T., Habu, S., Satake, M. (2005). Overexpression of the Runx3 Transcription Factor Increases the Proportion of Mature Thymocytes of the CD8 Single-Positive Lineage. *The Journal of Immunology*, 174(5): 2627–2636. Doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2627.

Kondo, M., Wagers, A. J., Manz, M. G., Prohaska, S. S., Scherer, D. C., Beilhack, G. F., Shizuru, J. A., Weissman, I. L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annual review of immunology*, 21: 759–806. Doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141007.

Kondo, M., Weissman, I. L., Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91(5): 661–672. Doi: 10.1016/s0092-8674(00)80453-5.

Krangel M. S. (2009). Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Current opinion in immunology*, 21(2): 133–139. Doi: 10.1016/j.coi.2009.03.009.

Kreslavsky, T., Gleimer, M., Garbe, A. I., von Boehmer, H. (2010). αβ versus γδ fate choice: counting the T-cell lineages at the branch point. *Immunological reviews,* 238(1): 169–181. Doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00947.x.

Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews. Genetics*, 11(9): 597–610. Doi: 10.1038/nrg2843.

Kuehl, W. M., Bergsagel, P. L. (2012). Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *Journal of Clinical Investigation*, 122(10): 3456–3463. Doi: 10.1172/JCI61188.

Kumar, B. V., Connors, T. J., Farber, D. L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 48(2): 202–213. Cell Press. Doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.007.

Kumar, S. K., Anderson, K. C. (2016). Immune Therapies in Multiple Myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(22): 5453–5460. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0868.

Kumar, S. K., Rajkumar, V., Kyle, R. A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M. V., Gay, F., Anderson, K. C. (2017). Multiple myeloma. *Nature reviews. Disease primers*, 3: 17046. Doi: 10.1038/nrdp.2017.46.

Kumari, R., Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. Doi: 10.3389/fcell.2021.645593.

Kuo, C. T., Veselits, M. L., Leiden, J. M. (1997). LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5334): 1986–1990. Doi: 10.1126/science.277.5334.1986.

Kurosaki T. (1997). Molecular mechanisms in B cell antigen receptor signaling. *Current opinion in immunology*, 9(3): 309–318. Doi: 10.1016/s0952-7915(97)80075-1.

Kurosaki, T. (2002). Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nature Reviews Immunology*, 2(5): 354–363. Doi: 10.1038/nri801.

Kwon, K., Hutter, C., Sun, Q., Bilic, I., Cobaleda, C., Malin, S., Busslinger, M. (2008). Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. *Immunity*, 28(6): 751–762. Doi: 10.1016/j.immuni.2008.04.014.

Kwon, M., Kim, C. G., Lee, H., Cho, H., Kim, Y., Lee, E. C., Choi, S. J., Park, J., Seo, I. H., Bogen, B., Song, I. C., Jo, D. Y., Kim, J. S., Park, S. H., Choi, I., Choi, Y. S., Shin, E. C. (2020). PD-1 Blockade Reinvigorates Bone Marrow $CD8^+$ T Cells from Patients with Multiple Myeloma in the Presence of TGFβ Inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 26(7): 1644–1655. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0267.

Kyumurkov, A., Bouin, A. P., Boissan, M., Manet, S., Baschieri, F., Proponnet-Guerault, M.,

Balland, M., Destaing, O., Régent-Kloeckner, M., Calmel, C., Nicolas, A., Waharte, F., Chavrier, P., Montagnac, G., Planus, E., Albiges-Rizo, C. (2023). Force tuning through regulation of clathrin-dependent integrin endocytosis. *Journal of Cell Biology*, 222(1). Doi: 10.1083/jcb.202004025.

L

Landry, D. B., Engel, J. D., Sen, R. (1993). Functional GATA-3 binding sites within murine CD8 alpha upstream regulatory sequences. *The Journal of experimental medicine*, 178(3): 941–949. Doi: 10.1084/jem.178.3.941.

Lane, P. (1997). Regulation of T and B cell responses by modulating interactions between CD28/CTLA4 and their ligands, CD80 and CD86. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 815: 392–400. Doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb52090.x.

Laurenti, E., Göttgens, B. (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*, 553(7689): 418–426. Doi: 10.1038/nature25022.

Lauzurica, P., Sancho, D., Torres, M., Albella, B., Marazuela, M., Merino, T., Bueren, J. A., Martínez-A, C., Sánchez-Madrid, F. (2000). Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. *Blood*, 95(7): 2312–2320. Doi: 10.1182/blood.v95.7.2312.

Law, D. A., Chan, V. W., Datta, S. K., DeFranco, A. L. (1993). B-cell antigen receptor motifs have redundant signalling capabilities and bind the tyrosine kinases PTK72, Lyn and Fyn. *Current biology : CB*, 3(10): 645–657. Doi: 10.1016/0960-9822(93)90062-s.

Lechner, M., Engleitner, T., Babushku, T., Schmidt-Supprian, M., Rad, R., Strobl, L. J., Zimber-Strobl, U. (2021). Notch2-mediated plasticity between marginal zone and follicular B cells. *Nature Communications*, 12(1): 1–13. Doi: 10.1038/s41467-021-21359-1.

Lee, J. Y., Skon, C. N., Lee, Y. J., Oh, S., Taylor, J. J., Malhotra, D., Jenkins, M. K., Rosenfeld, M. G., Hogquist, K. A., Jameson, S. C. (2015). The Transcription Factor KLF2 Restrains CD4+ T Follicular Helper Cell Differentiation. *Immunity*, 42(2): 252–264. Doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.013.

Le Moal, M. A., Colle, J. H., Truffa-Bachi, P. (1984). Study on B-memory generation by Tnp-Ficoll: induction but not expression is observed among various inbred mouse strains. *Cellular immunology*, 87(1): 110–117. Doi: 10.1016/0008-8749(84)90135-7.

Lenschow, D. J., Sperling, A. I., Cooke, M. P., Freeman, G., Rhee, L., Decker, D. C., Gray, G., Nadler, L. M., Goodnow, C. C., Bluestone, J. A. (1994). Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(5): 1990–1997.

Lenschow, D. J., Su, G. H., Zuckerman, L. A., Nabavi, N., Jellis, C. L., Gray, G. S., Miller, J., Bluestone, J. A. (1993). Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23): 11054–11058. Doi: 10.1073/pnas.90.23.11054.

Levanon, D., Groner, Y. (2004). Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene*, 23(24): 4211–4219. Doi: 10.1038/sj.onc.1207670.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology*, 7(9): 678–689. Doi: 10.1038/nri2156.

Li, J., Liu, Z., Jiang, S., Cortesini, R., Lederman, S., Suciu-Foca, N. (1999). T suppressor lymphocytes inhibit NF-kappa B-mediated transcription of CD86 gene in APC. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(12): 6386–6392.

Li, Y. S., Wasserman, R., Hayakawa, K., Hardy, R. R. (1996a). Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity*, 5(6): 527–535. Doi: 10.1016/s1074-7613(00)80268-x.

Li, Y. Y., Baccam, M., Waters, S. B., Pessin, J. E., Bishop, G. A., Koretzky, G. A. (1996b). CD40 ligation results in protein kinase C-independent activation of ERK and JNK in resting murine splenic B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(4): 1440–1447.

Lin, H., Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription

factor EBF. *Nature*, 376(6537): 263–267. Doi: 10.1038/376263a0.

Lin, S., Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 15(6): 321–333. https://doi.org/10.1038/nrc3932.

Liu, W., Draheim, K. M., Zhang, R., Calderwood, D. A., Boggon, T. J. (2013). Mechanism for KRIT1 Release of ICAP1-Mediated Suppression of Integrin Activation. *Molecular Cell*, 49(4), 719–729. Doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.005.

Lobb, R. R., Hemler, M. E. (1994). Perspectives The Pathophysiologic Role of a4 Integrins In Vivo. *The American Society for Clinical Investigation*, 94(23): 1722–1728. Doi: 10.1172/JCI117519.

Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C., Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *The Journal of experimental medicine*, 190(1): 75–89. Doi: 10.1084/jem.190.1.75.

Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., Moser, B. (1994). Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *The Journal of biological chemistry*, 269(1): 232–237.

Lokhorst, H. M., Lamme, T., de Smet, M., Klein, S., de Weger, R. A., van Oers, R., Bloem, A. C. (1994). Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood*, 84(7): 2269–2277.

Lu, E., Cyster, J. G. (2019). G-protein coupled receptors and ligands that organize humoral immune responses. *Immunological reviews*, 289(1): 158–172. Doi: 10.1111/imr.12743.

Lu, T. T., Cyster, J. G. (2002). Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science*, 297: 409–412. Doi: 10.1126/science.1071632.

Luckey, M. A., Kimura, M. Y., Waickman, A. T., Feigenbaum, L., Singer, A., Park, J. H. (2014). The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4+ lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling. *Nature Immunology*, 15(7): 638–645. Doi: 10.1038/ni.2917.

Lujambio, A., Lowe, S. W. (2012). The microcosmos of cancer. *Nature*, 482(7385): 347–355. Doi: 10.1038/nature10888.

Lund, F. E., Randall, T. D. (2010). Effector and regulatory B cells: Modulators of CD4+ T cell immunity. *Nature Reviews Immunology*, 10(4): 236–247. Doi: 10.1038/nri2729.

Luther, S. A., Tang, H. L., Hyman, P. L., Farr, A. G., Cyster, J. G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23): 12694–12699. Doi: 10.1073/pnas.97.23.12694.

M

Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R. T., Springer, T. A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16): 9448–9453. Doi: 10.1073/pnas.95.16.9448.

Ma, S., Pathak, S., Mandal, M., Trinh, L., Clark, M. R., Lu, R. (2010). Ikaros and Aiolos Inhibit Pre-B-Cell Proliferation by Directly Suppressing c-Myc Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 30(17): 4149–4158. Doi: 10.1128/mcb.00224-10.

Mackay, F., Schneider, P. (2009). Cracking the BAFF code. *Nature reviews. Immunology*, 9(7): 491–502. Doi: 10.1038/nri2572.

Maier, H., Colbert, J., Fitzsimmons, D., Clark, D. R., Hagman, J. (2003). Activation of the Early B-Cell-Specific mb-1 (Ig-α) Gene by Pax-5 Is Dependent on an Unmethylated Ets Binding Site. *Molecular and Cellular Biology*, 23(6): 1946–1960. Doi: 10.1128/mcb.23.6.1946-1960.2003.

Mallis, R. J., Bai, K., Arthanari, H., Hussey, R. E., Handley, M., Li, Z., Chingozha, L., Duke-Cohan, J. S., Lu, H., Wang, J. H., Zhu, C., Wagner, G., Reinherz, E. L. (2015). Pre-TCR ligand binding impacts thymocyte development before αβTCR expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(27): 8373–8378. Doi: 10.1073/pnas.1504971112.

Manié, S. N., Beck, A. R., Astier, A., Law, S. F., Canty, T., Hirai, H., Druker, B. J., Avraham, H., Haghayeghi, N., Sattler, M., Salgia, R., Griffin, J. D., Golemis, E. A., Freedman, A. S. (1997). Involvement of p130(Cas) and p105(HEF1), a novel Cas-like docking protein, in a cytoskeleton-dependent signaling pathway initiated by ligation of integrin or antigen receptor on human B cells. *The Journal of biological chemistry*, 272(7): 4230–4236. Doi: 10.1074/jbc.272.7.4230.

Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11(8): 519–531. Doi: 10.1038/nri3024.

Martin, F., Kearney, J. F. (2000). Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity*, 12(1): 39–49. Doi: 10.1016/s1074-7613(00)80157-0.

Martin, F., Kearney, J. F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nature reviews. Immunology*, 2(5): 323–335. Doi: 10.1038/nri799.

Martin, F., Oliver, A. M., Kearney, J. F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*, 14(5): 617–629. Doi: 10.1016/s1074-7613(01)00129-7.

Martínez-Moreno, M., Leiva, M., Aguilera-Montilla, N., Sevilla-Movilla, S., Isern de Val, S., Arellano-Sánchez, N., Gutiérrez, N. C., Maldonado, R., Martínez-López, J., Buo, I., García-Marco, J. A., Sánchez-Mateos, P., Hidalgo, A., García-Pardo, A., Teixidó, J. (2016). In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by α4β1 cytoplasmic-binding proteins. *Leukemia*, 30(4): 861–872. Doi: 10.1038/leu.2015.332

Masopust, D., Schenkel, J. M. (2013). The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature Reviews Immunology*, 13(5): 309–320. Doi: 10.1038/nri3442.

Mathis, D., Benoist, C. (2009). Aire. *Annual review of immunology*, 27: 287–312. Doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141532.

Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L., Cyster, J. G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, 427(6972): 355–360. Doi: 10.1038/nature02284.

McCaughtry, T. M., Etzensperger, R., Alag, A., Tai, X., Kurtulus, S., Park, J. H., Grinberg, A., Love, P., Feigenbaum, L., Erman, B., Singer, A. (2012). Conditional deletion of cytokine receptor chains reveals that IL-7 and IL-15 specify CD8 cytotoxic lineage fate in the thymus. *Journal of Experimental Medicine*, 209(12): 2263–2276. Doi: 10.1084/jem.20121505.

Mebius, R. E., Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature reviews. Immunology*, 5(8): 606–616. Doi: 10.1038/nri1669.

Mevel, R., Draper, J. E., Lie-A-Ling, M., Kouskoff, V., Lacaud, G. (2019). RUNX transcription factors: Orchestrators of development. *Development*, 146(17): dev148296. Doi: 10.1242/dev.148296.

Michie, A. M., Zúñiga-Pflücker, J. C. (2002). Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Seminars in immunology*, 14(5): 311–323. Doi: 10.1016/s1044-5323(02)00064-7.

Millon-Frémillon, A., Bouvard, D., Grichine, A., Manet-Dupé, S., Block, M. R., Albiges-Rizo, C. (2008). Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by ICAP-1-dependent β1-integrin affinity. *Journal of Cell Biology*, 180(2): 427–441. Doi: 10.1083/jcb.200707142.

Millon-Frémillon, A., Brunner, M., Abed, N., Collomb, E., Ribba, A. S., Block, M. R., Albigeѐ-Rizo, C., Bouvard, D. (2013). Calcium and calmodulin-dependent serine/threonine protein kinase type II (CaMKII)-mediated intramolecular opening of integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (ICAP-1α) negatively regulates β1 integrins. *Journal of Biological Chemistry*, 288(28): 20248–20260. Doi: 10.1074/jbc.M113.455956.

Minguet, S., Dopfer, E. P., Pollmer, C., Freudenberg, M. A., Galanos, C., Reth, M., Huber, M., Schamel, W. W. (2008). Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. *European journal of immunology*, 38(9): 2475–2487. Doi: 10.1002/eji.200738094.

Miyai, T., Takano, J., Endo, T. A., Kawakami, E., Agata, Y., Motomura, Y., Kubo, M., Kashima, Y., Suzuki, Y., Kawamoto, H., Ikawa, T. (2018). Three-step transcriptional priming that drives the commitment of multipotent progenitors toward B cells. *Genes and Development*, 32(2): 112–126. Doi: 10.1101/gad.309575.117.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell,* 68(5): 869–877. Doi: 10.1016/0092-8674(92)90030-g.

Moran, A. E., Hogquist, K. A. (2012). T-cell receptor affinity in thymic development. *Immunology*, 135: 261–267. Doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03547.x.

Moreno-Layseca, P., Icha, J., Hamidi, H., Ivaska, J. (2019). Integrin trafficking in cells and tissues. *Nature Cell Biology*, 21(2): 122–132. Doi:10.1038/s41556-018-0223-z.

Morgan, G. J., Walker, B. A., Davies, F. E. (2012). The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature reviews. Cancer*, 12(5): 335–348. Doi: 10.1038/nrc3257.

Mori, Y., Shimizu, N., Dallas, M., Niewolna, M., Story, B., Williams, P. J., Mundy, G. R., Yoneda, T. (2004). Anti-alpha4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood*, 104(7): 2149–2154. Doi: 10.1182/blood-2004-01-0236.

Mould, A. P., Askari, J. A., Craig, S. E., Garratt, A. N., Clements, J., Humphries, M. J. (1994). Integrin alpha 4 beta 1-mediated melanoma cell adhesion and migration on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the alternatively spliced IIICS region of fibronectin. *The Journal of biological chemistry*, 269(44): 27224–27230.

Mueller, S. N., Germain, R. N. (2009). Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 9(9): 618–629. Doi: 10.1038/nri2588.

Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., Tanaka, K. (2007). Regulation of $CD8^+$ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5829): 1349–1353. Doi: 10.1126/science.1141915.

Muri, J., Thut, H., Bornkamm, G. W., Kopf, M. (2019). B1 and Marginal Zone B Cells but Not Follicular B2 Cells Require Gpx4 to Prevent Lipid Peroxidation and Ferroptosis. *Cell reports*, 29(9): 2731–2744.e4. Doi: 10.1016/j.celrep.2019.10.070.

Murphy, K., Weaver, C. (2017). Janeway's Immunobiology. 9th edition. Garland Sciences.

N

Na, S. Y., Patra, A., Scheuring, Y., Marx, A., Tolaini, M., Kioussis, D., Hemmings, B. A., Hünig, T., Bommhardt, U. (2003). Constitutively active protein kinase B enhances Lck and Erk activities and influences thymocyte selection and activation. *Journal of immunology*, 171(3): 1285–1296. Doi: 10.4049/jimmunol.171.3.1285.

Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature Reviews Immunology*, 6(2):107–116. Doi: 10.1038/nri1780.

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382(6592): 635–638. Doi: 10.1038/382635a0.

Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J.A., Ploegh, H., Peters, C., Rudensky, A. Y. (1998). Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5362): 450–453. Doi: 10.1126/science.280.5362.450.

Nakayama, T., Kasprowicz, D. J., Yamashita, M., Schubert, L. A., Gillard, G., Kimura, M., Didierlaurent, A., Koseki, H., Ziegler, S. F. (2002). The generation of mature, single-positive thymocytes in vivo is dysregulated by CD69 blockade or overexpression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(1): 87–94. Doi: 10.4049/jimmunol.168.1.87.

Navarro, A., Díaz, T., Tovar, N., Pedrosa, F., Tejero, R., Cibeira, M. T., Magnano, L., Rosiñol, L., Monzó, M., Bladé, J., Fernández de Larrea, C. (2015). A serum microRNA signature associated with complete remission and progression after autologous stem-cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Oncotarget*, 6(3): 1874–1883. Doi: 10.18632/oncotarget.2761.

Neish, A. S., Williams, A. J., Palmer, H. J., Whitley, M. Z., Collins, T. (1992). Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *The Journal of experimental medicine*, 176(6): 1583–1593. Doi: 10.1084/jem.176.6.1583.

Newman, R., Ahlfors, H., Saveliev, A., Galloway, A., Hodson, D. J., Williams, R., Besra, G. S., Cook, C. N., Cunningham, A. F., Bell, S. E., Turner, M. (2017). Maintenance of the marginal-zone B cell compartment specifically requires the RNA-binding protein ZFP36L1. *Nature Immunology*, 18(6): 683–693. Doi: 10.1038/ni.3724.

Nguyen, H. V., Mouly, E., Chemin, K., Luinaud, R., Despres, R., Fermand, J.-P., Arnulf, B., Bories, J.-C. (2012). The Ets-1 transcription factor is required for Stat1-mediated T-bet expression and IgG2a class switching in mouse B cells. *Blood*, 119(18): 4174–4181. Doi: 10.1182/blood-2011.

Nie, Y., Waite, J., Brewer, F., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Zou, Y. R. (2004). The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *The Journal of experimental medicine*, 200(9): 1145–1156. Doi: 10.1084/jem.20041185.

Niiro, H., Clark, E. A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nature reviews. Immunology*, 2(12): 945–956. Doi: 10.1038/nri955.

Noborio-Hatano, K., Kikuchi, J., Takatoku, M., Shimizu, R., Wada, T., Ueda, M., Nobuyoshi, M., Oh, I., Sato, K., Suzuki, T., Ozaki, K., Mori, M., Nagai, T., Muroi, K., Kano, Y., Furukawa, Y., Ozawa, K. (2009). Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene*, 28(2): 231–242. Doi: 10.1038/onc.2008.385.

Nolte, M. A., Margadant, C. (2020). Activation and suppression of hematopoietic integrins in hemostasis and immunity. *Blood*, 135(1): 7–16. Doi: 10.1182/blood.2019003336.

Nomura, J., Inui, S., Yamasaki, T., Kataoka, S., Maeda ', K., Nakanishi, K., Sakaguchi, N. (1995). Anti-CD40 monoclonal antibody induces the proliferation of murine B cells as a B-cell mitogen through a distinct pathway from receptors for antigens or lipopolysaccharide. *Immunology Letters*, 45(3):195-203. Doi: 10.1016/0165-2478(95)00006-q.

Nordenfelt, P., Elliott, H. L., Springer, T. A. (2016). Coordinated integrin activation by actin-dependent force during T-cell migration. *Nature communications*, 7: 13119. Doi: 10.1038/ncomms13119.

Nossal G. J. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell*, 76(2): 229–239. Doi: 10.1016/0092-8674(94)90331-x.

Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*, 401(6753): 556–562. Doi: 10.1038/44076.

Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., Corcoran, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3): 160–171. Doi: 10.1038/nri3795.

Nutt, S. L., Kee, B. L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity*, 26(6): 715–725. Doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.010.

Nutt, S. L., Urbánek, P., Rolink, A., Busslinger, M. (1997). Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes & development*, 11(4): 476–491. Doi: 10.1101/gad.11.4.476.

Nyhoff, L. E., Clark, E. S., Barron, B. L., Bonami, R. H., Khan, W. N., Kendall, P. L. (2018). Bruton's Tyrosine Kinase Is Not Essential for B Cell Survival beyond Early Developmental Stages. *Journal of immunology,* 200(7): 2352–2361. Doi: 10.4049/jimmunol.1701489.

O

Oberlin, E., Amara, A., Bachelerie, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J. M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F., Loetscher, M., Baggiolini, M., Moser, B. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 382(6594): 833–835. Doi: 10.1038/382833a0.

Oh-Hora, M., Johmura, S., Hashimoto, A., Hikida, M., Kurosaki, T. (2003). Requirement for Ras Guanine Nucleotide Releasing Protein 3 in Coupling Phospholipase C-γ2 to Ras in B Cell Receptor Signaling. *Journal of Experimental Medicine*, 198(12): 1841–1851. Doi: 10.1084/jem.20031547.

Okada, T., Cyster, J. G. (2007). CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(5): 2973–2978. Doi: 10.4049/jimmunol.178.5.2973.

Okada, T., Miller, M. J., Parker, I., Krummel, M. F., Neighbors, M., Hartley, S. B., O'Garra, A., Cahalan, M. D., Cyster, J. G. (2005). Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS biology*, 3(6): e150. Doi: 10.1371/journal.pbio.003015.

Okada, T., Ngo, V. N., Ekland, E. H., Förster, R., Lipp, M., Littman, D. R., Cyster, J. G. (2002). Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *The Journal of experimental medicine*, 196(1): 65–75. Doi: 10.1084/jem.20020201.

Oliver, A. M., Martin, F., Gartland, G. L., Carte, R. H., Kearney, J. E. (1997). Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *European Journal Immunology*, 27: 2366–2374. Doi: 10.1002/eji.1830270935.

Olson, D. L., Burkly, L. C., Leone, D. R., Dolinski, B. M., Lobb, R. R. (2005). Anti-alpha4 integrin monoclonal antibody inhibits multiple myeloma growth in a murine model. *Molecular cancer therapeutics*, 4(1): 91–99.

Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C. P., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., Kadesch, T. (1998). Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Molecular and cellular biology*, 18(4): 2230–2239. Doi: 10.1128/MCB.18.4.2230.

Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., Lobb, R. (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, 59(6): 1203–1211. Doi: 10.1016/0092-8674(89)90775-7.

Osborn, L., Vassallo, C., Benjamin, C. D. (1992). Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *The Journal of experimental medicine*, 176(1): 99–107. Doi: 10.1084/jem.176.1.99.

P

Pai, S. Y., Truitt, M. L., Ting, C. N., Leiden, J. M., Glimcher, L. H., Ho, I. C. (2003). Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development. *Immunity*, 19(6): 863–875. Doi: 10.1016/s1074-7613(03)00328-5.

Palacios, E. H., Weiss, A. (2007). Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development. *The Journal of experimental medicine*, 204(7): 1703–1715. Doi: 10.1084/jem.20070405.

Papayannopoulou, T., Nakamoto, B. (1993). Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(20): 9374–9378. Doi: 10.1073/pnas.90.20.9374.

Park, J. H., Adoro, S., Lucas, P. J., Sarafova, S. D., Alag, A. S., Doan, L. L., Erman, B., Liu, X., Ellmeier, W., Bosselut, R., Feigenbaum, L., Singer, A. (2007). 'Coreceptor tuning': cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR. *Nature immunology*, 8(10): 1049–1059. Doi: 10.1038/ni1512.

Parry, S. L., Hasbold, J., Holman, M., Klaus, G. G. (1994). Hypercross-linking surface IgM or IgD receptors on mature B cells induces apoptosis that is reversed by costimulation with IL-4 and anti-CD40. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(6): 2821–2829.

Pasquinelli A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature reviews. Genetics*, 13(4): 271–282. Doi: 10.1038/nrg3162.

Peacock, C. D., Wang, Q., Gesell, G. S., Corcoran-Schwartz, I. M., Jones, E., Kim, J., Devereux, W. L., Rhodes, J. T., Huff, C. A., Beachy, P. A., Watkins, D. N., Matsui, W. (2007). Hedgehog

signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(10): 4048–4053. Doi: 10.1073/pnas.0611682104.

Pearce, G., Angeli, V., Randolph, G. J., Junt, T., von Andrian, U., Schnittler, H. J., Jessberger, R. (2006). Signaling protein SWAP-70 is required for efficient B cell homing to lymphoid organs. *Nature immunology*, 7(8): 827–834. Doi: 10.1038/ni1365.

Pencheva, N., Tavazoie, S. F. (2013). Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. *Nature cell biology*, 15(6): 546–554. Doi: 10.1038/ncb2769.

Pepper, M., Jenkins, M. K. (2011). Origins of CD4+ effector and central memory t cells. *Nature Immunology*, 12(6): 467–471. Doi: 10.1038/ni.2038.

Pérez-Villar, J. J., Whitney, G. S., Bowen, M. A., Hewgill, D. H., Aruffo, A. A., Kanner, S. B. (1999). CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Molecular and cellular biology*, 19(4): 2903–2912. Doi: 10.1128/MCB.19.4.2903.

Petrie, H. T., Hugo, P., Scollay, R., Shortman, K. (1990). Lineage relationships and developmental kinetics of immature thymocytes: CD3, CD4, and CD8 acquisition in vivo and in vitro. *The Journal of experimental medicine*, 172(6): 1583–1588. Doi: 10.1084/jem.172.6.1583.

Pillai, S., Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature Reviews Immunology*, 9(11): 767–777. Doi: 10.1038/nri2656.

Pillai, S., Cariappa, A., Moran, S.T. (2005). Marginal zone B cells. *Annual review of immunology* 23: 161-196. Doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115728.

Pinho, S., Frenette, P. S. (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(5): 303–320. Doi: 10.1038/s41580-019-0103-9.

Plotkin, J., Prockop, S. E., Lepique, A., Petrie, H. T. (2003). Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *Journal of immunology*, 171(9): 4521–4527. Doi: 10.4049/jimmunol.171.9.4521.

Postel, E. H., Berberich, S. J., Flint, S. J., Ferrone, C. A. (1993). Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5120): 478–480. Doi: 10.1126/science.8392752.

Postel, E. H., Weiss, V. H., Beneken, J., Kirtane, A. (1996). Mutational analysis of NM23-H2/NDP kinase identifies the structural domains critical to recognition of a c-myc regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(14): 6892–6897. Doi: 10.1073/pnas.93.14.6892.

Pourhanifeh, M. H., Mahjoubin-Tehran, M., Shafiee, A., Hajighadimi, S., Moradizarmehri, S., Mirzaei, H., Asemi, Z. (2020). MicroRNAs and exosomes: Small molecules with big actions in multiple myeloma pathogenesis. *IUBMB Life*, 72(3): 314–333. Doi: 10.1002/iub.2211.

Q

Quong, M. W., Martensson, A., Langerak, A. W., Rivera, R. R., Nemazee, D., Murre, C. (2004). Receptor editing and marginal zone B cell development are regulated by the helix-loop-helix protein, E2A. *The Journal of experimental medicine*, 199(8): 1101–1112. Doi: 10.1084/jem.20031180.

R

Radtke, F., Fasnacht, N., MacDonald, H. R. (2010). Notch Signaling in the Immune System. *Immunity*, 32(1): 14–27. Doi: 10.1016/j.immuni.2010.01.004.

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*, 10(5): 547–558. Doi: 10.1016/s1074-7613(00)80054-0.

Rajkumar S. V. (2022). Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American journal of hematology*, 97(8): 1086–1107. Doi: 10.1002/ajh.26590.

Ramos-Pérez, W. D., Fang, V., Escalante-Alcalde, D., Cammer, M., Schwab, S. R. (2015). A map

of the distribution of sphingosine 1-phosphate in the spleen. *Nature immunology*, 16(12): 1245–1252. Doi: 10.1038/ni.3296.

Ramsdell, F., Jenkins, M., Dinh, Q., Fowlkes, B. J. (1991). The majority of CD4+8- thymocytes are functionally immature. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 147(6): 1779–1785.

Reif, K., Ekland, E. H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Förster, R., Cyster, J. G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature*, 416(6876): 94–99. Doi: 10.1038/416094a.

Reszka, A. A., Hayashi, Y., Horwitz, A. F. (1992). Identification of amino acid sequences in the integrin beta 1 cytoplasmic domain implicated in cytoskeletal association. *The Journal of cell biology, 117*(6): 1321–1330. Doi: 10.1083/jcb.117.6.1321.

Revilla-I-Domingo, R., Bilic, I., Vilagos, B., Tagoh, H., Ebert, A., Tamir, I. M., Smeenk, L., Trupke, J., Sommer, A., Jaritz, M., Busslinger, M. (2012). The B-cell identity factor Pax5 regulates distinct transcriptional programmes in early and late B lymphopoiesis. *The EMBO journal*, 31(14): 3130–3146. Doi: 10.1038/emboj.2012.155.

Richardson P. G. (2004). A review of the proteasome inhibitor bortezomib in multiple myeloma. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 5(6): 1321–1331. Doi: 10.1517/14656566.5.6.1321.

Risueño, R. M., Gil, D., Fernández, E., Sánchez-Madrid, F., Alarcón, B. (2005). Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses. *Immunobiology*, 106(2): 601–608. Doi: 10.1182/blood.

Roark, J. H., Park, S. H., Jayawardena, J., Kavita, U., Shannon, M., Bendelac, A. (1998). CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(7): 3121–3127.

Roccaro, A. M., Sacco, A., Thompson, B., Leleu, X., Azab, A. K., Azab, F., Runnels, J., Jia, X., Ngo, H. T., Melhem, M. R., Lin, C. P., Ribatti, D., Rollins, B. J., Witzig, T. E., Anderson, K. C., Ghobrial, I. M. (2009). MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood*, 113(26): 6669–6680. Doi: 10.1182/blood-2009-01-198408.

Rodríguez-García, Y., Martínez-Moreno, M., Alonso, L., Sánchez-Vencells, A., Arranz, A., Dagà-Millán, R., Sevilla-Movilla, S., Valeri, A., Martínez-López, J., Teixidó, J. (2023). Regulation of miRNA expression by α4β1 integrin-dependent multiple myeloma cell adhesion. *EJHaem*, 4(3): 631–638. Doi: 10.1002/jha2.756.

Rognoni, E., Ruppert, R., Fässler, R. (2016). The kindlin family: Functions, signaling properties and implications for human disease. *Journal of Cell Science*, 129(1): 17–27. Doi: 10.1242/jcs.161190.

Rolink, A. G., Melchers, F. (2002). BAFF led B cells survive and thrive: roles of BAFF in B-cell development. *Current opinion in immunology*, 14(2): 266–275. Doi: 10.1016/s0952-7915(02)00332-1.

Rose, D. M., Alon, R., Ginsberg, M. H. (2007). Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunological Reviews*, 218: 126–134. Doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00536.x.

Rose, D. M., Han, J., Ginsberg, M. H. (2002). a4 integrins and the immune response. *Immunological Reviews*, 186: 118–124. Doi: 10.1034/j.1600-065x.2002.18611.x.

Rosen S. D. (2004). Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annual review of immunology*, 22: 129–156. Doi: 10.1146/annurev.immunol.21.090501.080131.

Rossi, M., Tagliaferri, P., Tassone, P. (2015). MicroRNAs in multiple myeloma and related bone disease. *Annals of Translational Medicine*, 3(21): 334. Doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.12.13.

Rowland, S. L., DePersis, C. L., Torres, R. M., Pelanda, R. (2010). Ras activation of Erk restores impaired tonic BCR signaling and rescues immature B cell differentiation. *The Journal of experimental medicine*, 207(3): 607–621. Doi: 10.1084/jem.20091673.

Ryan, R. J. H., Petrovic, J., Rausch, D. M., Zhou, Y., Lareau, C. A., Kluk, M. J., Christie, A. L., Lee, W. Y., Tarjan, D. R., Guo, B., Donohue, L. K. H., Gillespie, S. M., Nardi, V., Hochberg, E. P., Blacklow, S. C., Weinstock, D. M., Faryabi, R. B., Bernstein, B. E., Aster, J. C., Pear, W. S. (2017). A B Cell Regulome Links Notch to Downstream Oncogenic Pathways in Small B Cell Lymphomas. *Cell reports*, 21(3): 784–797. Doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.066.

S

Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Hamada, Y., Aizawa, S., Hirai, H. (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity*, 18(5): 675–685. Doi: 10.1016/s1074-7613(03)00111-0.

Sallusto, F. (2016). Heterogeneity of Human CD4+ T Cells Against Microbes. *Annual Review of Immunology*, 34: 317–334. Doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112056.

Sallusto, F., Kremmer, E., Palermo, B., Hoy, A., Ponath, P., Qin, S., Förster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. (1999). Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *European journal of immunology*, 29(6): 2037–2045. Doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199906)29:06<2037::AID-IMMU2037>3.0.CO;2-V.

Salomon, D. R., Crisa, L., Mojcik, C. F., Ishii, J. K., Klier, G., Shevach, E. M. (1997). Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Is Expressed by Cortical Thymic Epithelial Cells and Mediates Thymocyte Adhesion. Implications for the Function of a4b1 (VLA4) Integrin in T-Cell Development. *Blood*, 89(7):2461–2471.

Santos, M. A., Sarmento, L. M., Rebelo, M., Doce, A. A., Maillard, I., Dumortier, A., Neves, H., Radtke, F., Pear, W. S., Parreira, L., Demengeot, J. (2007). Notch1 engagement by Delta-like-1 promotes differentiation of B lymphocytes to antibody-secreting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39): 15454–15459. Doi: 10.1073/pnas.0702891104.

Sanz-Rodríguez, F., Hidalgo, A., Teixidó, J. (2001). Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood*, 97(2): 346–351. Doi: 10.1182/blood.v97.2.346.

Sanz-Rodríguez, F., Ruiz-Velasco, N., Pascual-Salcedo, D., Teixidó, J. (1999). Characterization of VLA-4-dependent myeloma cell adhesion to fibronectin and VCAM-1. *British journal of haematology*, 107(4): 825–834. Doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01762.x.

Sasaki, Y., Casola, S., Kutok, J. L., Rajewsky, K., Schmidt-Supprian, M. (2004). TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and -independent roles for BAFF in B cell physiology. *Journal of immunology*, 173(4): 2245–2252. Doi: 10.4049/jimmunol.173.4.2245.

Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J. J., Bickham, K. L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., Kato, T., Farber, D. L. (2013). Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*, 38(1): 187–197. Doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.020.

Sato, T., Ohno, S. I., Hayashi, T., Sato, C., Kohu, K., Satake, M., Habu, S. (2005). Dual functions of runx proteins for reactivating CD8 and silencing CD4 at the commitment process into CD8 thymocytes. *Immunity*, 22(3): 317–328. Doi: 10.1016/j.immuni.2005.01.012.

Saveliev, A., Bell, S. E., Turner, M. (2021). Efficient homing of antibody-secreting cells to the bone marrow requires RNA-binding protein ZFP36L1. *Journal of Experimental Medicine*, 218(3): e20200504. Doi: 10.1084/JEM.20200504.

Schaum, N., Lehallier, B., Hahn, O., Pálovics, R., Hosseinzadeh, S., Lee, S. E., Sit, R., Lee, D. P., Losada, P. M., Zardeneta, M. E., Fehlmann, T., Webber, J. T., McGeever, A., Calcuttawala, K., Zhang, H., Berdnik, D., Mathur, V., Tan, W., Zee, A., Tan, M., Wyss-Coray, T. (2020). Ageing hallmarks exhibit organ-specific temporal signatures. *Nature*, 583(7817): 596–602. Doi: 10.1038/s41586-020-2499-y.

Schebesta, A., McManus, S., Salvagiotto, G., Delogu, A., Busslinger, G. A., Busslinger, M. (2007). Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity*, 27(1): 49–63. Doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.019.

Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., Scott, M. L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science*, 293(5537): 2111–2114. Doi:

10.1126/science.1061964.

Schwartz, M. A., Ginsberg, M. H. (2002). Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nature cell biology*, 4(4): E65–E68. Doi: 10.1038/ncb0402-e65.

Scimone, M. L., Aifantis, I., Apostolou, I., von Boehmer, H., von Andrian, U. H. (2006). A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18): 7006–7011. Doi: 10.1073/pnas.0602024103.

Scimone, M. L., Felbinger, T. W., Mazo, I. B., Stein, J. V., Von Andrian, U. H., Weninger, W. (2004). CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *The Journal of experimental medicine*, 199(8): 1113–1120. Doi: 10.1084/jem.20031645.

Scott, D. W., Lamers, M., Kohler, G., Sidman, C. L., Maddox, B., Carsetti, R. (1996). Role of c-myc and CD45 in spontaneous and anti-receptor-induced apoptosis in adult murine B cells. *International Immunology*, 8(9): 1375–1385. Doi:10.1093/intimm/8.9.1375.

Seddon, B., Zamoyska, R. (2002). TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells. *Journal of immunology,* 169(6): 2997–3005. Doi: 10.4049/jimmunol.169.6.2997.

Seder, R. A., Ahmed, R. (2003). Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature immunology*, 4(9): 835–842. Doi: 10.1038/ni969.

Seo, S., Asai, T., Saito, T., Suzuki, T., Morishita, Y., Nakamoto, T., Ichikawa, M., Yamamoto, G., Kawazu, M., Yamagata, T., Sakai, R., Mitani, K., Ogawa, S., Kurokawa, M., Chiba, S., Hirai, H. (2005). Crk-Associated Substrate Lymphocyte Type Is Required for Lymphocyte Trafficking and Marginal Zone B Cell Maintenance. *The Journal of Immunology*, 175(6): 3492–3501. Doi: 10.4049/jimmunol.175.6.3492.

Setoguchi, R., Tachibana, M., Naoe, Y., Muroi, S., Akiyama, K., Tezuka, C., Okuda, T., Taniuchi, I. (2008). Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5864): 822–825. Doi: 10.1126/science.1151844.

Sevilla-Movilla, S. (2019). ICAP-1 regula la adhesión celular mediada por VLA-4 y el desarrollo del sistema inmunitario. Caracterización de relaciones entre VLA-4 y resistencia a bortezomib en mieloma múltiple (Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid).

Sevilla-Movilla, S., Arellano-Sánchez, N., Martínez-Moreno, M., Gajate, C., Sánchez-Vencells, A., Valcárcel, L. V., Agirre, X., Valeri, A., Martínez-López, J., Prósper, F., Mollinedo, F., Teixidó, J. (2020). Upregulated expression and function of the α4β1 integrin in multiple myeloma cells resistant to bortezomib. *The Journal of pathology*, 252(1): 29–40. Doi: 10.1002/path.5480.

Sevilla-Movilla, S., Fuentes, P., Rodríguez-García, Y., Arellano-Sánchez, N., Krenn, P. W., de Val, S. I., Montero-Herradón, S., García-Ceca, J., Burdiel-Herencia, V., Gardeta, S. R., Aguilera-Montilla, N., Barrio-Alonso, C., Crainiciuc, G., Bouvard, D., García-Pardo, A., Zapata, A. G., Hidalgo, A., Fässler, R., Carrasco, Y. R., Toribio, M.L., Teixidó, J. (2022). ICAP-1 loss impairs CD8+ thymocyte development and leads to reduced marginal zone B cells in mice. *European Journal of Immunology*, 52(8): 1228–1242. Doi: 10.1002/eji.202149560.

Shi, G.-X., Harrison, K., Wilson, G. L., Moratz, C., Kehrl, J. H. (2002). RGS13 Regulates Germinal Center B Lymphocytes Responsiveness to CXC Chemokine Ligand (CXCL)12 and CXCL13. *The Journal of Immunology*, 169(5): 2507–2515. Doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2507.

Shimizu, K., Chiba, S., Hosoya, N., Kumano, K., Saito, T., Kurokawa, M., Kanda, Y., Hamada, Y., Hirai, H. (2000). Binding of Delta1, Jagged1, and Jagged2 to Notch2 rapidly induces cleavage, nuclear translocation, and hyperphosphorylation of Notch2. *Molecular and cellular biology*, 20(18): 6913–6922. Doi: 10.1128/MCB.20.18.6913-6922.2000.

Shimizu, Y., Rose, D. M., Ginsberg, M. H. (1999). Integrins in the immune system. *Advances in immunology*, 72: 325–380. Doi: 10.1016/s0065-2776(08)60024-3.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 68(5): 855–867. Doi: 10.1016/0092-8674(92)90029-c.

Shinohara, M., Terada, Y., Iwamatsu, A., Shinohara, A., Mochizuki, N., Higuchi, M., Gotoh, Y., Ihara, S., Nagata, S., Itoh, H., Fukui, Y., Jessberger, R. (2002). SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. *Nature*, 416(6882): 759–763. Doi: 10.1038/416759a.

Shiow, L. R., Rosen, D. B., Brdicková, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L. L., Cyster, J. G., Matloubian, M. (2006). CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*, 440(7083): 540–544. Doi: 10.1038/nature04606.

Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Walsh, M. E., Ng, L. G., MacKay, F., Rao, S. P., Kalled, S. L., Scott, M. L. (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *Journal of immunology*, 173(4): 2331–2341. Doi: 10.4049/jimmunol.173.4.2331.

Sigvardsson, M., Clark, D. R., Fitzsimmons, D., Doyle, M., Akerblad, P., Breslin, T., Bilke, S., Li, R., Yeamans, C., Zhang, G., Hagman, J. (2002). Early B-cell factor, E2A, and Pax-5 cooperate to activate the early B cell-specific mb-1 promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 22(24): 8539–8551. Doi: 10.1128/MCB.22.24.8539-8551.2002

Singer, A., Adoro, S., Park, J. H. (2008). Lineage fate and intense debate: Myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nature Reviews Immunology*, 8(10): 788–801. Doi: 10.1038/nri2416.

Skon, C. N., Lee, J. Y., Anderson, K. G., Masopust, D., Hogquist, K. A., Jameson, S. C. (2013). Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nature Immunology*, 14(12): 1285–1293. Doi: 10.1038/ni.2745.

Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., Jordan, M. S. (2009). T cell activation. Annual Review of Immunology, 27: 591–619. Doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706.

Song, H., Cerny, J. (2003). Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *The Journal of experimental medicine*, 198(12): 1923–1935. Doi: 10.1084/jem.20031498.

Song, L., Liu, D., Zhao, Y., He, J., Kang, H., Dai, Z., Wang, X., Zhang, S., Zan, Y. (2015). Sinomenine inhibits breast cancer cell invasion and migration by suppressing NF-κB activation mediated by IL-4/miR-324-5p/CUEDC2 axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(3): 705–710. Doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.004.

Sosa-Costa, A., De Val, S. I., Sevilla-Movilla, S., Borgman, K. J. E., Manzo, C., Teixidó, J., Garcia-Parajo, M. F. (2016). Lateral mobility and nanoscale spatial arrangement of chemokine-activated α4β1 integrins on T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 291(40): 21053–21062. Doi: 10.1074/jbc.M116.733709.

Sprent, J., Surh, C. D. (2011). Normal T cell homeostasis: the conversion of näive cells into memory-phenotype cells. *Nature Immunology*, 12(6): 478–484. Doi: 10.1038/ni.2018.

Springer T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76(2): 301–314. Doi: 10.1016/0092-8674(94)90337-9.

Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D. P., Zhang, B., Paik, J. H., DePinho, R. A., Kutok, J. L., Kearney, J. F., Otipoby, K. L., Rajewsky, K. (2009). PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell*, 139(3): 573–586. Doi: 10.1016/j.cell.2009.08.041.

Srivastava, B., Quinn, W. J., Hazard, K., Erikson, J., Allman, D. (2005). Characterization of marginal zone B cell precursors. *Journal of Experimental Medicine*, 202(9): 1225–1234. Doi: 10.1084/jem.20051038.

Stamou, P., de Jersey, J., Carmignac, D., Mamalaki, C., Kioussis, D., Stockinger, B. (2003). Chronic exposure to low levels of antigen in the periphery causes reversible functional impairment correlating with changes in CD5 levels in monoclonal CD8 T cells. *Journal of immunology*, 171(3): 1278–1284. Doi: 10.4049/jimmunol.171.3.1278.

Steier, Z., Kim, E. J. Y., Aylard, D. A., Robey, E. A. (2024). The CD4 Versus CD8 T Cell Fate Decision: A Multiomics-Informed Perspective. *Annual review of immunology*, 42(1): 235–258. Doi: 10.1146/annurev-immunol-083122-040929.

Su, T. T., Rawlings, D. J. (2002). Transitional B Lymphocyte Subsets Operate as Distinct Checkpoints in Murine Splenic B Cell Development. *The Journal of Immunology*, 168(5): 2101–2110. Doi: 10.4049/jimmunol.168.5.2101.

Su, V. L., Simon, B., Draheim, K. M., Calderwood, D. A. (2020). Serine phosphorylation of the small phosphoprotein ICAP1 inhibits its nuclear accumulation. *Journal of Biological Chemistry,* 295(10): 3269–3284. Doi: 10.1074/jbc.RA119.009794.

Sun, C. Y., She, X. M., Qin, Y., Chu, Z. B., Chen, L., Ai, L. S., Zhang, L., Hu, Y. (2013). miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis*, 34(2): 426–435. Doi: 10.1093/carcin/bgs333.

Sun, X., Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2): 175–186. Doi: 10.1007/s00412-018-0659-8.

Sun, Z., Costell, M., Fässler, R. (2019). Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nature Cell Biology*, 21(1): 25–31. Doi: 10.1038/s41556-018-0234-9.

Surh, C. D., Ernst, B., Sprent, J. (1992). Growth of epithelial cells in the thymic medulla is under the control of mature T cells. *The Journal of experimental medicine*, *176*(2): 611–616. Doi: 10.1084/jem.176.2.611.

Suvas, S., Singh, V., Sahdev, S., Vohra, H., Agrewala, J. N. (2002). Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10): 7766–7775. Doi: 10.1074/jbc.M105902200.

Svoronos, A. A., Engelman, D. M., Slack, F. J. (2016). OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer research*, 76(13): 3666–3670. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0359.

T

Tabbekh, M., Mokrani-Hammani, M., Bismuth, G., Mami-Chouaib, F. (2013). T-cell modulatory properties of CD5 and its role in antitumor immune responses. *Oncoimmunology*, *2*(1): e22841. Doi: doi.org/10.4161/onci.22841.

Takada, K., Jameson, S. C. (2009). Naive T cell homeostasis: From awareness of space to a sense of place. *Nature Reviews Immunology*, 9(12): 823–832. Doi: 10.1038/nri2657.

Takada, K., Wang, X., Hart, G. T., Odumade, O. A., Weinreich, M. A., Hogquist, K. A., Jameson, S. C. (2011). Kruppel-like factor 2 is required for trafficking but not quiescence in postactivated T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(2): 775–783. Doi: 10.4049/jimmunol.1000094.

Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T., Springer, T. A. (2002). Global conformational earrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 110(5): 599–611. Doi: 10.1016/S0092-8674(02)00935-2.

Takahama Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature reviews. Immunology*, 6(2): 127–135. Doi: 10.1038/nri1781.

Takizawa, H., Boettcher, S., Manz, M. G. (2012). Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. *Blood*, 119(13): 2991–3002. Doi: 10.1182/blood-2011-12-380113.

Tamura, H., Ishibashi, M., Sunakawa-Kii, M., Inokuchi, K. (2020). PD-L1-PD-1 Pathway in the Pathophysiology of Multiple Myeloma. *Cancers*, 12(4): 924. Doi: 10.3390/cancers12040924.

Tan, J. B., Xu, K., Cretegny, K., Visan, I., Yuan, J. S., Egan, S. E., Guidos, C. J. (2009). Lunatic and Manic Fringe Cooperatively Enhance Marginal Zone B Cell Precursor Competition for Delta-like 1 in Splenic Endothelial Niches. *Immunity*, 30(2): 254–263. Doi: 10.1016/j.immuni.2008.12.016.

Tang, B., Xu, A., Xu, J., Huang, H., Chen, L., Su, Y., Zhang, L., Li, J., Fan, F., Deng, J., Tang, L., Sun, C., Hu, Y. (2018). MicroRNA-324-5p regulates stemness, pathogenesis and sensitivity to bortezomib in multiple myeloma cells by targeting hedgehog signaling. *International Journal of Cancer*, 142(1): 109–120. Doi: 10.1002/ijc.31041.

Tanigaki, K., Han, H., Yamamoto, N., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kuroda, K., Suzuki, A., Nakano, T., Honjo, T. (2002). Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nature immunology*, 3(5): 443–450. Doi: 10.1038/ni793.

Tani-ichi, S., Shimba, A., Wagatsuma, K., Miyachi, H., Kitano, S., Imai, K., Hara, T., Ikuta, K. (2013). Interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations. Proc*eedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2): 612–617. Doi: 10.1073/pnas.1219242110.

Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M. J., Bae, S.-C., Komori, T., Ito, Y., Littman, D. R. (2002). Differential Requirements for Runx Proteins in CD4 Repression and Epigenetic Silencing during T Lymphocyte Development. *Cell*, 111(5): 621-33. Doi:10.1016/s0092-8674(02)01111-x.

Tedford, K., Steiner, M., Koshutin, S., Richter, K., Tech, L., Eggers, Y., Jansing, I., Schilling, K., Hauser, A. E., Korthals, M., Fischer, K. D. (2017). The opposing forces of shear flow and sphingosine-1-phosphate control marginal zone B cell shuttling. *Nature Communications*, 8(1): 2261. Doi: 10.1038/s41467-017-02482-4.

Teixidó, J., Martínez-Moreno, M., Díaz-Martínez, M., Sevilla-Movilla, S. (2018). The good and bad faces of the CXCR4 chemokine receptor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 95: 121–131. Doi: 10.1016/j.biocel.2017.12.018.

Testi, R., Ambrosio, D. D. ', De Maria, R., Santoni, A. (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunology*, 15(10): 479–483. Doi:10.1016/0167-5699(94)90193-7.

Thompson, J. S., Bixler, S. A., Qian, F., Vora, K., Scott, M. L., Cachero, T. G., Hession, C., Schneider, P., Sizing, I. D., Mullen, C., Strauch, K., Zafari, M., Benjamin, C. D., Tschopp, J., Browning, J. L., Ambrose, C. (2001). BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science*, 293(5537): 2108–2111. Doi: 10.1126/science.1061965.

Torres, R. M., Flaswinkel, H., Reth, M., Rajewsky, K. (1996). Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5269): 1804–1808. Doi: 10.1126/science.272.5269.1804.

Trampont, P. C., Tosello-Trampont, A. C., Shen, Y., Duley, A. K., Sutherland, A. E., Bender, T. P., Littman, D. R., Ravichandran, K. S. (2010). CXCR4 acts as a costimulator during thymic β-selection. *Nature Immunology*, 11(2): 162–170. Doi: 10.1038/ni.1830.

Treiber, T., Treiber, N., Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(1): 5–20. Doi: 10.1038/s41580-018-0059-1.

Turner, M., Gulbranson-Judge, A., Quinn, M. E., Walters, A. E., MacLennan, I. C., Tybulewicz, V. L. (1997). Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool. *The Journal of experimental medicine*, 186(12): 2013–2021. Doi: 10.1084/jem.186.12.2013.

U

Ueno, T., Saito, F., Gray, D. H., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R. L., Takahama, Y. (2004). CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *The Journal of experimental medicine*, 200(4): 493–505. Doi: 10.1084/jem.20040643.

Unno, K., Zhou, Y., Zimmerman, T., Platanias, L. C., Wickrema, A. (2009). Identification of a novel microRNA cluster miR-193b-365 in multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*, 50(11): 1865–1871. Doi: 10.3109/10428190903221010.

V

van Kooten, C., Banchereau, J. (1997). Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Current opinion in immunology*, 9(3): 330–337. Doi: 10.1016/s0952-7915(97)80078-7.

Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., Bolen, J. B. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell*, 55(2): 301–308. Doi: 10.1016/0092-8674(88)90053-0.

Vilagos, B., Hoffmann, M., Souabni, A., Sun, Q., Werner, B., Medvedovic, J., Bilic, I., Minnich, M., Axelsson, E., Jaritz, M., Busslinger, M. (2012). Essential role of EBF1 in the generation and function of distinct mature B cell types. The Journal of experimental medicine, 209(4): 775–792. Doi: 10.1084/jem.20112422.

Voisinne, G., Gonzalez de Peredo, A., Roncagalli, R. (2018). CD5, an Undercover Regulator of TCR Signaling. *Frontiers in immunology*, 9: 2900. Doi: 10.3389/fimmu.2018.02900.

von Boehmer, H. (2005). Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a

surrogate. *Nature reviews. Immunology*, 5(7): 571–577. Doi: 10.1038/nri1636.

W

Walsh, D. A., Borges da Silva, H., Beura, L. K., Peng, C., Hamilton, S. E., Masopust, D., Jameson, S. C. (2019). The Functional Requirement for CD69 in Establishment of Resident Memory $CD8^+$ T Cells Varies with Tissue Location. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 203(4): 946–955. Doi: 10.4049/jimmunol.1900052.

Wang, D., John, S. A., Clements, J. L., Percy, D. H., Barton, K. P., Garrett-Sinha, L. A. (2005). Ets-1 deficiency leads to altered B cell differentiation, hyperresponsiveness to TLR9 and autoimmune disease. *International immunology*, 17(9): 1179–1191. Doi: 10.1093/intimm/dxh295.

Wang, H., Kadlecek, T. A., Au-Yeung, B. B., Goodfellow, H. E. S., Hsu, L. Y., Freedman, T. S., Weiss, A. (2010). ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5). Doi: 10.1101/cshperspect.a002279.

Wang, H., Morse, H. C., Bolland, S. (2020). Transcriptional Control of Mature B Cell Fates. *Trends in Immunology* , 41(7): 601–613. Doi: 10.1016/j.it.2020.04.011.

Wang, J. H., Avitahl, N., Cariappa, A., Friedrich, C., Ikeda, T., Renold, A., Andrikopoulos, K., Liang, L., Pillai, S., Morgan, B. A., Georgopoulos, K. (1998). Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity*, 9(4): 543–553. Doi: 10.1016/s1074-7613(00)80637-8.

Wang, L., Wildt, K. F., Castro, E., Xiong, Y., Feigenbaum, L., Tessarollo, L., Bosselut, R. (2008). The zinc finger transcription factor Zbtb7b represses CD8-lineage gene expression in peripheral CD4+ T cells. *Immunity*, 29(6): 876–887. Doi: 10.1016/j.immuni.2008.09.019.

Wang, T. W., Nakanishi, M. (2024). Immune surveillance of senescence: potential application to age-related diseases. *Trends in cell biology*, S0962-8924(24): 00121-1. Doi: 10.1016/j.tcb.2024.06.007.

Wang, Y., Brooks, S. R., Li, X., Anzelon, A. N., Rickert, R. C., Carter, R. H. (2002). The physiologic role of CD19 cytoplasmic tyrosines. *Immunity*, 17(4): 501–514. Doi: 10.1016/s1074-7613(02)00426-0.

Wayner, E. A., Garcia-Pardo, A., Humphries, M. J., McDonald, J. A., Carter, W. G. (1989). Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *The Journal of cell biology*, 109(3): 1321–1330. Doi: 10.1083/jcb.109.3.1321.

Weber, J. P., Fuhrmann, F., Feist, R. K., Lahmann, A., Al Baz, M. S., Gentz, L. J., Vu Van, D., Mages, H. W., Haftmann, C., Riedel, R., Grün, J. R., Schuh, W., Kroczek, R. A., Radbruch, A., Mashreghi, M. F., Hutloff, A. (2015). ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *The Journal of experimental medicine*, 212(2): 217–233. Doi: 10.1084/jem.20141432.

Weber, M., Treanor, B., Depoil, D., Shinohara, H., Harwood, N. E., Hikida, M., Kurosaki, T., Batista, F. D. (2008). Phospholipase C-gamma2 and Vav cooperate within signaling microclusters to propagate B cell spreading in response to membrane-bound antigen. *The Journal of experimental medicine*, 205(4): 853–868. Doi: 10.1084/jem.20072619.

Wei, C., Chen, Y., Xu, L., Yu, B., Lu, D., Yu, Y., Lei, Z., Tang, R., Zhou, S., Zhu, J., Chen, X., Su, C. (2020). CD40 Signaling Promotes CXCR5 Expression in B Cells via Noncanonical NF-κB Pathway Activation. *Journal of Immunology Research*. Doi: 10.1155/2020/1859260.

Wen, L., Brill-Dashoff, J., Shinton, S. A., Asano, M., Hardy, R. R., Hayakawa, K. (2005). Evidence of marginal-zone B cell-positive selection in spleen. *Immunity*, 23(3): 297–308. Doi: 10.1016/j.immuni.2005.08.007.

Werner, M., Hobeika, E., Jumaa, H. (2010). Role of PI3K in the generation and survival of B cells. *Immunological reviews*, 237(1): 55–71. Doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00934.x.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R. C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C. F., Eshkind, L., Bockamp, E., Lió, P., Macdonald, H. R., Trumpp, A. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*, 135(6): 1118–1129. Doi: 10.1016/j.cell.2008.10.048.

Winkelmann, R., Sandrock, L., Porstner, M., Roth, E., Mathews, M., Hobeika, E., Reth, M., Kahn,

M. L., Schuh, W., Jäck, H. M. (2011). B cell homeostasis and plasma cell homing controlled by Krüppel-like factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2): 710–715. Doi: 10.1073/pnas.1012858108.

Witt, C. M., Won, W. J., Hurez, V., Klug, C. A. (2003). Notch2 haploinsufficiency results in diminished B1 B cells and a severe reduction in marginal zone B cells. *Journal of immunology*, 171(6): 2783–2788. Doi: 10.4049/jimmunol.171.6.2783.

Wittner, J., Schuh, W. (2023). Krüppel-like factor 2: a central regulator of B cell differentiation and plasma cell homing. *Frontiers in Immunology*, 14. Doi: 10.3389/fimmu.2023.1172641.

Wolf, E. W., Howard, Z. P., Duan, L., Tam, H., Xu, Y., Cyster, J. G. (2022). GPR174 signals via Gαs to control a CD86-containing gene expression program in B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(23):e2201794119. Doi: 10.1073/pnas.2201794119.

Woo, M., Hakem, R., Furlonger, C., Hakem, A., Duncan, G. S., Sasaki, T., Bouchard, D., Lu, L., Wu, G. E., Paige, C. J., Mak, T. W. (2003). Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nature immunology*, 4(10): 1016–1022. Doi: 10.1038/ni976.

Woodland, D. L., Kohlmeier, J. E. (2009). Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology*, 9(3): 153–161. Doi: 10.1038/nri2496.

Woolf, E., Xiao, C., Fainaru, O., Lotem, J., Rosen, D., Negreanu, V., Bernstein, Y., Goldenberg, D., Brenner, O., Berke, G., Levanon, D., Groner, Y. (2003). Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13): 7731-7736. Doi:10.1073/pnas.1232420100.

Worbs, T., Mempel, T. R., Bölter, J., von Andrian, U. H., Förster, R. (2007). CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 204(3): 489–495. Doi: 10.1084/jem.20061706.

Wu, J., Lingrel, J. B. (2004). KLF2 inhibits Jurkat T leukemia cell growth via upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1. *Oncogene*, 23(49): 8088–8096. Doi: 10.1038/sj.onc.1207996.

Wüstehube, J., Bartol, A., Liebler, S. S., Brütsch, R., Zhu, Y., Felbor, U., Sure, U., Augustin, H. G., Fischer, A. (2010). Cerebral cavernous malformation protein CCM1 inhibits sprouting angiogenesis by activating DELTA-NOTCH signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(28): 12640–12645. Doi: 10.1073/pnas.1000132107.

X

Xing, Y., Wang, X., Jameson, S. C., Hogquist, K. A. (2016). Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF-κB and tonic type i interferon signaling. *Nature Immunology*, 17(5): 565–573. Doi: 10.1038/ni.3419.

Xiong, J., Armato, M. A., Yankee, T. M. (2011). Immature single-positive CD8+ thymocytes represent the transition from Notch-dependent to Notch independent T-cell development. *International Immunology*, 23(1): 55–64. Doi: 10.1093/intimm/dxq457.

Xiong, Y., Castro, E., Yagi, R., Zhu, J., Lesourne, R., Love, P. E., Feigenbaum, L., Bosselut, R. (2013). Thpok-independent repression of Runx3 by Gata3 during CD4+ T-cell differentiation in the thymus. *European Journal of Immunology*, 43(4): 918–928. Doi: 10.1002/eji.201242944.

Xu, S., Tan, J. E., Wong, E. P., Manickam, A., Ponniah, S., Lam, K. P. (2000). B cell development and activation defects resulting in xid-like immunodeficiency in BLNK/SLP-65-deficient mice. *International Immunology*, 12(3): 397–404. Doi: 10.1093/intimm/12.3.397.

Y

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, 17(24): 3011–3016. Doi: 10.1101/gad.1158803.

Yin, X., Ladi, E., Chan, S. W., Li, O., Killeen, N., Kappes, D. J., Robey, E. A. (2007). CCR7

Expression in Developing Thymocytes Is Linked to the CD4 versus CD8 Lineage Decision. *The Journal of Immunology*, 179(11): 7358–7364. Doi: 10.4049/jimmunol.179.11.7358.

You, Y., Zhao, H., Wang, Y., Carter, R. H. (2009). Cutting edge: Primary and secondary effects of CD19 deficiency on cells of the marginal zone. *Journal of immunology*, 182(12): 7343–7347. Doi: 10.4049/jimmunol.0804295.

Yu, F., Deng, H., Yao, H., Liu, Q., Su, F., Song, E. (2010). Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene*, 29(29): 4194–4204. Doi: 10.1038/onc.2010.167.

Yu, X., Cohen, D. M., Chen, C. S. (2012). miR-125b Is an adhesion-regulated microRNA that protects mesenchymal stem cells from anoikis. *Stem cells*, 30(5): 956–964. Doi: 10.1002/stem.1064.

Z

Zachariah, M. A., Cyster, J. G. (2010). Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science (New York, N.Y.),* 328(5982): 1129–1135. Doi: 10.1126/science.1188222.

Zamisch, M., Tian, L., Grenningloh, R., Xiong, Y., Wildt, K. F., Ehlers, M., Ho, I. C., Bosselut, R. (2009). The transcription factor Ets1 is important for CD4 repression and Runx3 up-regulation during CD8 T cell differentiation in the thymus. *Journal of Experimental Medicine*, 206(12): 2685–2699. Doi: 10.1084/jem.20092024.

Zarnegar, B., He, J. Q., Oganesyan, G., Hoffmann, A., Baltimore, D., Cheng, G. (2004). Unique CD40-mediated biological program in B cell activation requires both type 1 and type 2 NF-kappaB activation pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21): 8108–8113. Doi: 10.1073/pnas.0402629101.

Zawistowski, J. S., Serebriiskii, I. G., Lee, M. F., Golemis, E. A., Marchuk, D. A. (2002). KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis. *Human Molecular Genetics*, 11(4): 389–396. Doi: 10.1093/hmg/11.4.389.

Zhang, J., Clatterbuck, R. E., Rigamonti, D., Chang, D. D., Dietz, H. C. (2001). Interaction between krit1 and icap1α infers perturbation of integrin β1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Human Molecular Genetics*, 10(25): 2953–2960. Doi: 10.1093/hmg/10.25.2953.

Zhang, N., Bevan, M. J. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity*, 35(2): 161–168. Doi: 10.1016/j.immuni.2011.07.010.

Zhang, S. L., Bhandoola, A. (2014). Trafficking to the thymus. *Current topics in microbiology and immunology*, 373: 87–111. Doi: 10.1007/82_2013_324.

Zhang, X. A., Hemler, M. E. (1999). Interaction of the integrin β1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(1): 11–19. Doi: 10.1074/jbc.274.1.11.

Zhao, D., Sui, Y., Zheng, X. (2016). MIR-331-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting HER2 through the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways in colorectal cancer. *Oncology Reports*, 35(2): 1075–1082. Doi: 10.3892/or.2015.4450.

Zhao, J. J., Lin, J., Zhu, D., Wang, X., Brooks, D., Chen, M., Chu, Z. B., Takada, K., Ciccarelli, B., Admin, S., Tao, J., Tai, Y. T., Treon, S., Pinkus, G., Kuo, W. P., Hideshima, T., Bouxsein, M., Munshi, N., Anderson, K., Carrasco, R. (2014). miR-30-5p functions as a tumor suppressor and novel therapeutic tool by targeting the oncogenic Wnt/β-catenin/BCL9 pathway. *Cancer Research*, 74(6): 1801–1813. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3311-T.

Zhou, Y., Chen, L., Barlogie, B., Stephens, O., Wu, X., Williams, D. R., Cartron, M. A., van Rhee, F., Nair, B., Waheed, S., Pineda-Roman, M., Alsayed, Y., Anaissie, E., Shaughnessy, J. D., Jr (2010). High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(17): 7904–7909. Doi: 10.1073/pnas.0908441107.

Zhu, L., Plow, E. F., Qin, J. (2020). Initiation of focal adhesion assembly by talin and kindlin: A dynamic view. *Protein Science*, 30(3): 531–542.Doi: 10.1002/pro.4014.

Zhu, Y., Yao, S., Chen, L. (2011). Cell Surface Signaling Molecules in the Control of Immune Responses: A Tide Model. *Immunity*, 34(4): 466–478. Doi:

10.1016/j.immuni.2011.04.008.
Ziegler, S. F., Levin, S. D., Johnson, L., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Baker, E., Sutherland, G. R., Feldhaus, A. L., Ramsdell, F. (1994). The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(3): 1228–1236.

ANEXOS

Publicaciones de la autora relacionadas con el trabajo de la Tesis Doctoral:

- **ANEXO I:**
  Rodríguez-García, Y., De Jesús Santos, A. P., Guerrero Moreno, M., Menéndez-García, M., García de Lacoba, M., Hurtado-Borrás, M., Aragón-Sanz, I., O'Loghlen, A., Teixidó, J. (2024). Lack of ICAP-1 causes defective proliferation and maturation of mouse spleen B cells. *European Journal of Immunology* (En revisión).

- **ANEXO II:**
  Rodríguez-García, Y., Martínez-Moreno, M., Alonso, L., Sánchez-Vencells, A., Arranz, A., Dagà-Millán, R., Sevilla-Movilla, S., Valeri, A., Martínez-López, J., Teixidó, J. (2023). Regulation of miRNA expression by α4β1 integrin-dependent multiple myeloma cell adhesion. *EJHaem*, 4(3): 631–638. Doi: 10.1002/jha2.756.

- **ANEXO III:**
  Sevilla-Movilla, S.*, Fuentes, P.*, Rodríguez-García, Y.*, Arellano-Sánchez, N., Krenn, P. W., de Val, S. I., Montero-Herradón, S., García-Ceca, J., Burdiel-Herencia, V., Gardeta, S. R., Aguilera-Montilla, N., Barrio-Alonso, C., Crainiciuc, G., Bouvard, D., García-Pardo, A., Zapata, A. G., Hidalgo, A., Fässler, R., Carrasco, Y. R., Toribio, M. L., Teixidó, J. (2022). ICAP-1 loss impairs CD8+ thymocyte development and leads to reduced marginal zone B cells in mice. *European Journal of Immunology*, 52(8): 1228–1242. Doi: 10.1002/eji.202149560. (* Coautoras).

Publicaciones en las que ha colaborado la autora:

- **ANEXO IV:**
  García-Ortiz, A.*, Rodríguez-García, Y.*, Encinas, J., Maroto-Martín, E., Castellano, E., Teixidó, J., Martínez-López, J. (2021). The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. *Cancers*, 13(2): 217. Doi: 10.3390/cancers13020217. (* Coautoras).

ANEXO I

Lack of ICAP-1 causes defective proliferation and maturation of mouse spleen B cells

Yaiza Rodríguez-García[1,*], Ana P. De Jesús Santos[1,*], Miguel Guerrero Moreno[1], Marta Menéndez-García[1], Mario García de Lacoba[1], Marta Hurtado-Borrás[1], Ingrid Aragón-Sanz[1], Ana O'Loghlen[1] and Joaquin Teixidó[1]

[1]Department of Biomedicine, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC), Madrid, Spain

[*]These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Joaquin Teixidó. Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Department of Biomedicine. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Phone 34-91-8373112; Fax 34-91-5360432; e-mail: joaquint@cib.csic.es

Keywords: B cells, Cell differentiation, Cell trafficking, Notch2, Cellular proliferation, Spleen

Abbreviations: **FACS**: Flow cytometry. **BM**: Bone marrow. **MZ**: Marginal zone. **FO**: Follicular. **LN**: Lymph node.

ABSTRACT

ICAP-1 bears a nuclear localization signal that facilitates its shuttling to the nucleus and an integrin-binding domain that allows regulation of cell adhesion. Mice lacking ICAP-1 display a marked reduction in MZ B cells, a spleen cell population providing rapid immunosurveillance to blood-borne pathogens. We found that the reduced MZ B cell compartment in ICAP-1$^{-/-}$ spleens involves an impaired transition from the pre-MZ to the MZ B cell stage. ICAP-1 was preferentially localized in the nucleus of CD19^{+} spleen B cells, and RNAseq, qPCR and flow cytometry analysis revealed that MZ B cells from ICAP-1-null spleens display a marked decrease in expression of Notch2 and its downstream targets, a critical pathway regulating the MZ B cell development. The data indicate that Notch2 represents a target for regulation by ICAP-1, and suggest that the defective Notch2 pathway leads to the deficient generation of MZ B cells in ICAP-1$^{-/-}$ mice. We also found that spleen B and T cells lacking ICAP-1 have defective proliferation as well as reduced apoptosis, which was associated with induction of senescence in ICAP-1-null spleens. These data unveils an ICAP-1 involvement in regulation of gene expression controlling lymphocyte growth and development.

INTRODUCTION

After initial differentiation in the bone marrow (BM), immature B cells home to the spleen, where they finally mature through several transitional (T) phases [1-4]. Transitional T1 cells undergo B cell receptor (BCR)-mediated strong negative selection and apoptosis to avoid self-reactivity. Surviving cells develop into the transitional 2 (T2) subset, which also requires signals from the BCR, as well as from BAFFR to survive and develop into either pre-marginal zone (MZ) B cells which subsequently mature to MZ B cells ($IgM^{hi}IgD^{low}CD21^{hi}CD23^{-}CD1d^{hi}$), or into follicular (FO) ($IgM^{low}IgD^{hi}CD21^{med}CD23^{+}CD1d^{low}$) B cells [2, 5-9]. It is believed that the strength of signaling through the BCR during the T1 and T2 stages determines whether cells will become MZ or FO B cells [2, 5, 10].

FO B cells represent the vast majority of the mature B cells. They migrate into the follicles of the spleen and lymph nodes, and through collaboration with $CD4^+$ T cells, give rise to germinal center B cells that experience class switching and somatic hypermutation to produce high-affinity antibodies and memory B cells [2, 11]. The MZ B cells represent between 5-10% of mature B cells in the spleen, they are mostly sessile limiting its localization to the marginal sinus of spleen, although they can also shuttle between the MZ and the follicles [2, 5]. MZ B cells provide rapid immunosurveillance during T cell-independent recognition of blood-borne pathogens, and are also involved in FO B cell-mediated, T cell-dependent immune responses [5]. Upon interaction with pathogens, MZ B cells express low-affinity IgM antibodies, and subsequently differentiate into plasma cells. The Notch2 signaling is critical for the development of MZ B cells [12, 13]. Notch2 is highly expressed on pre-MZ and MZ B cells [12], whereas its ligand Dll-1 is displayed by spleen endothelial cells, and their independent deficiency leads to loss of MZ B cells [14].

ICAP-1 (also called ITGB1BP1) is an ubiquitously expressed protein which regulates the activity of β1 integrins and controls cell adhesion upon interaction with a cytoplasmic integrin β1 subunit motif [15-20]. ICAP-1 can also interact with KRIT1 (also known as CCM1), a protein containing three NPX(Y/F) motifs of which the first mediates interaction with ICAP-1 [21, 22] ICAP-1 bears an N-terminal nuclear localization signal (NLS) that enables its nuclear translocation [23, 24]. A motif susceptible of Ser and Thr phosphorylation located downstream of the NLS signal has the potential to regulate the ICAP-1 cellular distribution [25]. ICAP-1-null mice display reduced osteoblast proliferation and osteoblastic function [18], as well as alterations in the development of the vascular system [19]. We recently showed that ICAP-$1^{-/-}$ mice display a remarkable reduction in the population of spleen MZ B cells, as well as decreased *in vitro* $CD19^+$ spleen B cell proliferation [26]. Furthermore, we found that ICAP-1 is involved in $CD8^+$ single-positive (SP) thymocyte development, and unveiled a direct correlation between the lack of ICAP-1 and reduced levels in SP $CD8^+$ thymocytes of Runx3, a transcription factor required for $CD8^+$ thymocyte generation [26].

Different altered responses might account for the reduced MZ B cell population in ICAP-1-null mice, including deficient maturation from precursors, diminished cell proliferation, increased apoptosis, or impaired MZ B cell trafficking. In the present work

we have characterized the altered molecular events behind the reduction of spleen MZ B cells in ICAP-1-deficient mice.

RESULTS

Transitional and mature spleen B cells in ICAP-1-null mice. We analyzed by flow cytometry (FACS) the distribution of spleen B cell subsets in mice lacking ICAP-1, following the gating strategy shown on Supporting information Fig. S1. The T1 transitional stage was defined as $IgM^{hi}IgD^{-}CD21/35^{-}CD23^{-}CD1d^{-/low}$; the T2 stage as $IgM^{hi}IgD^{low}CD21/35^{-}CD23^{+}CD1d^{-/low}$; the pre-marginal zone (MZ) subset as $IgM^{hi}IgD^{hi}CD21/35^{hi}$ $CD23^{+}CD1d^{hi}$; the follicular (FO) as $CD21/35^{int}CD23^{+}$ and the MZ as $CD21/35^{hi}CD23^{-}$ cells. As we previously reported [26], the MZ B cell proportions were decreased in ICAP-$1^{-/-}$ spleens relative to control counterparts, and we are now showing that this reduction correlates with a significant increase in the frequency of its precursor pre-MZ B cell subset (Fig. 1A). No marked differences in the proportions of the T1, T2 and FO cell subsets between ICAP-$1^{+/+}$ and ICAP-$1^{-/-}$ spleens were found. The T1, T2, FO and MZ cell numbers were markedly reduced in ICAP-1-deficient mice, whereas numbers of pre-MZ B cells were similar to control spleens (Fig. 1B, C). As we found that the total number of immature $B220^{+}IgM^{+}IgD^{-}$ BM cells were not altered in ICAP-1-null mice (Fig. 1D), the data suggest that reduced cell amounts of spleen transitional states reflect post-BM events. These results show that the transition from the spleen pre-MZ to the MZ B cell stage is altered under ICAP-1 loss.

Experiments with single BM chimeric mice revealed a significant reduction in the frequency of spleen MZ B cells in lethally irradiated $CD45.1^{+}$ mice transplanted with BM from $CD45.2^{+}$ ICAP-1-null animals, as compared to the irradiated mice reconstituted with BM from $CD45.2^{+}$ ICAP-$1^{+/+}$ animals (Fig. 1E). Instead, the proportion of FO cells in mice reconstituted with mutant BM remained comparable with the controls. Therefore, the deficient generation of MZ B cells in ICAP-$1^{-/-}$ spleen involves B cell-autonomous functions, although we cannot exclude the contribution of spleen non-hematopoietic cellular components.

B cell proliferation and apoptosis, and induction of senescence in spleen from ICAP-$1^{-/-}$ mice. Based on the reduced amounts of most B cell subsets in ICAP-1-null spleens, we tested whether proliferation might be affected in these mutant cells. To visualize the extent of *in situ* spleen $CD19^{+}$ B cell proliferation, we performed immunofluorescence on frozen tissue sections from control and ICAP-$1^{-/-}$ spleens using the Ki67 proliferation marker, which stains cells in the G2/M phase of the cell cycle. Data revealed a significantly lower Ki67-labeled ICAP-1-deficient $CD19^{+}$ cells than on control counterparts (Fig. 2A). TUNEL assays to detect cell apoptotsis showed that the reduced ICAP-1-null cell proliferation was not associated with increased cell death. Rather, we detected diminished $CD19^{+}$ cell apoptosis levels in ICAP-$1^{-/-}$ spleens (Fig. 2B). Interestingly, reduced proliferation and apoptosis of $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ T cells was also detected in spleen tissue sections from ICAP-1-null mice (Supporting information Fig. S2A, B). These data led us to explore the possibility of induction of cellular senescence in ICAP-$1^{-/-}$ spleens, as senescence is a cellular phenotype characterized by cell cycle arrest and resistance to apoptosis [27]. We stained spleen frozen tissues to evaluate the activity of senescence-associated beta galactosidase (SA-β-Gal), a widely used biomarker of senescence. Of note, we found an increase in SA-β-Gal activity in the spleen of ICAP-1-deficient mice in comparison with wild type animals (Fig. 2C). Next, we performed

immunofluorescence staining of LaminB1, another biomarker of senescence, and could observe a significant decrease in its expression in ICAP-1$^{-/-}$ samples (Fig. 2D). To further confirm the activation of cellular senescence, we determined the co-expression levels of LaminB1 in SA-β-Gal positive and negative areas in ICAP-1-null spleens. We observed that the frequency of LaminB1 staining is decreased in areas positive for SA-β-Gal in comparison with areas negative for this marker (Fig. 2E), together unveiling that cellular senescence is induced in the spleens of ICAP-1$^{-/-}$ mice.

As lack of ICAP-1 results in impaired B cell proliferation, we *in vitro* investigated the response of spleen ICAP-1-null FO and MZ B cells to different proliferative stimuli. We previously showed that the total CD19^{+} B cell population from ICAP-1$^{-/-}$ spleens proliferate markedly less in response to BCR cross-linking with anti-IgM antibodies combined with IL-4 than control cells [26]. Cell cycle analyses with anti-IgM/IL-4-exposed CD19^{+} cells revealed a significant reduction in the G2/M phase linked to a larger proportion of the G1 phase in ICAP-1$^{-/-}$ cells compared to control counterparts (Fig. 3A). Using CellTrace Violet (CTV)-labelled cells to assess cell proliferation by FACS, we found that ICAP-1$^{+/+}$ FO B cells exhibited higher proliferative responses to anti-IgM/IL-4 than ICAP-1-null counterparts (Fig. 3B; Supporting information Fig. S3A), whereas MZ B cells from both control and ICAP-1$^{-/-}$ mice showed similarly weak proliferation (Fig. 3B). Wild type FO and MZ spleen B cells exposed to anti-CD40/IL-4, a condition mimicking help by T cells, or to the bacterial lipopolysacharide (LPS), which activates TLR4, proliferated to a higher extent than ICAP-1-deficient cells (Fig. 3C; Supporting information Fig. S3B).

B cell activation in ICAP-1-null spleens. Activation of the Erk1/2 MAP kinase and the PI3K-Akt pathways represent early activation events in response to BCR engagement, and is associated with stimulation of cell proliferation and survival. Following exposure to anti-IgM antibodies, immunoblot analyses revealed upregulation of pErk1/2 and pAkt levels at all times tested in purified spleen CD19^{+} control and mutant B cells relative to untreated ones (Supporting information Fig. S4A). We did detect that while ICAP-1$^{+/+}$ cells displayed a consistent peak of enhanced pErk1/2 after 1 min of stimulation, this peak was absent in ICAP-1-null cells, and instead the extent of their pErk1/2 upregulation was similar across the kinetics.

Upregulation of CD69, an activation marker, and CD86, a costimulatory molecule, represent early responses following B cell engagement with BCR, CD40 or TLR4 ligands [28-30]. Extent of CD69 upregulation to anti-IgM was similar between control and ICAP-1$^{-/-}$ FO and MZ B cells (Fig. 3D). While anti-IgM-triggered induction of CD86 expression was comparable between ICAP-1-deficient and wild type FO B cells, the ICAP-1$^{-/-}$ MZ B cells displayed a blockade of enhanced CD86 levels (Fig. 3D). CD69 and CD86 upregulation in response to anti-CD40 antibodies or to LPS was similar between wild type and ICAP-1-null FO B cells (Supporting information Fig. S4B-D). The expression of these two markers was slightly reduced in stimulated ICAP-1$^{-/-}$ MZ B cells compared to control littermates (Supporting information Fig. S4B-D).

Transcriptomic analysis of control and ICAP-1$^{-/-}$ MZ B cells. ICAP-1 contains a NLS motif facilitating its shuttling to the nucleus [23, 24]. Cell fractionation and immunoblotting revealed high ICAP-1 levels in the nuclear fraction of purified spleen

$CD19^+$ B cells, besides its distribution in the cytoplasmic fraction (Fig. 4A). Based on previous studies, the nuclear 21 kD form likely represents the non-phosphorylated ICAP-1, whereas the cytoplasmic 23-24 kD species should correspond to the phosphorylated form, a modification preventing its nuclear localization [25]. This finding raised the possibility that nuclear ICAP-1 might regulate gene expression. Given that generation of the MZ B cell subset is especially affected in ICAP-1-null spleens (Fig. 1A, B), we performed RNAseq analysis of FACS-sorted MZ B cells from ICAP-$1^{+/+}$ and ICAP-$1^{-/-}$ mice (Supporting information Fig. S5), with the goal of identifying differentially-expressed genes. Volcano plots displayed a higher number of upregulated than downregulated genes in ICAP-1-null cells relative to control counterparts (Fig. 4B). Gene set enrichment analysis showed an increase in genes linked to regulation of immune cell activation, immune response, cell adhesion and migration, and intracellular signalling, amongst other, in ICAP-$1^{-/-}$ MZ B cells (Fig. 4C).

Defective Notch2-dependent pathway in ICAP-1-null MZ B cells. A key pathway required for the development of MZ B cells is the Notch2-regulated signalling [12]. Following Notch2 cleavage, its intracellular domain shuttles to the nucleus, where it regulates gene expression upon forming a transcriptional activator complex with RBPJ [31, 32]. Of note, expression of *Notch2* and its transcription factor targets *Hes1* and *Myc* were downregulated in ICAP-1-deficient MZ B cells (Fig. 4D), and qPCR results confirmed their decreased levels (Fig. 4E). Moreover, we also found diminished expression in mutant MZ B cells of *Dtx1*, another main Notch2 target. *Notch2* expression was moderately reduced in ICAP-$1^{-/-}$ FO B cells, whereas *Hes1*, *Myc* and *Dtx1* levels remained unaltered (Fig. 4E). FACS analyses showed that decreased *Notch2* correlated with reduced Notch2 protein expression in ICAP-$1^{-/-}$ MZ B but not in FO B cells (Fig. 4F). Moreover, ICAP-1-deficient pre-MZ B cells displayed a tendency for diminished Notch2 expression (Fig. 4F, right). No remarkable alterations in Notch2 levels were detected in the T1 and T2 subsets from ICAP-$1^{-/-}$ spleens.

Transgenic expression of a constitutively active intracellular form of Notch2 (Notch2IC) [33] leads to increased *Hes1* and *Hes5* expression linked to downregulation of Krüppel-like factor 2 (*Klf2*) [34], a transcription factor whose deletion leads to expansion of MZ B cells [35, 36]. We found that the decreased *Notch2* expression correlated with enhanced *Klf2* levels in ICAP-1-null MZ B cells, without significantly affecting its expression in FO B cells (Fig. 4D, G). In addition, RNAseq and qPCR data revealed that, compared with control MZ B cells, ICAP-1-deficient cells express lower amounts of *Zfp36l1* (Fig. 4D, G), a RNA-binding protein that also limits the expression of *Klf2* [37], whereas *Zfp36l1* levels in FO B cells were comparable. Together, these data unveil a direct correlation between an impaired Notch2-dependent pathway in ICAP-$1^{-/-}$ mice and the deficient development of MZ B cells.

Immune receptors and signalling molecules in ICAP-$1^{-/-}$ MZ B cells. Development of MZ B cells also strongly depends on signaling triggered by BAFF upon binding to its receptor BAFFR [7, 8]. Sequencing and qPCR data from ICAP-$1^{-/-}$ MZ B cells revealed a decreased expression of *Tnfrsf13c*, the gene coding for BAFFR (Fig. 5A, B). However, FACS analysis showed only a small decrease in BAFFR levels on the membrane of ICAP-1-null MZ, as well as on FO B cells (Fig. 5C).

Further examination of transcriptomic differences between control and ICAP-1$^{-/-}$ MZ B cells revealed reduced levels of kinases and adaptor proteins involved in BCR signaling, such as *Btk*, *Syk* and *Blnk* [38-42] (Fig. 5D). In addition, we found decreased expression of the G-protein coupled receptor *Gpr174*, whose absence leads to reduced MZ B cell numbers [43]. PCR analysis confirmed that levels of *Blnk* and *Gpr174*, two important mediators of BCR-dependent induction of CD86 expression [42, 43], diminished in the MZ mutant B cells (Fig. 5E). Interestingly, their decreased expression coincides with the impairment of BCR-triggered induction of CD86 expression in these ICAP-1-null cells (see Fig. 3D).

Trafficking and positioning molecules in ICAP-1-null MZ B cells. The reduced MZ B cell compartment in ICAP-1$^{-/-}$ spleens could be contributed by an anomalous cell localization. FACS analyses revealed no presence of CD19^{+} cells with the MZ B cell phenotype in lymph nodes (LNs) (Supporting information Fig. S6A), or in peripheral blood (not shown) of ICAP-1-null mice. Trafficking and positioning of MZ B cells involves the CXCR5 and S1PR1 receptors, and the α4β1 and LFA-1 integrins [5, 44]. Transcriptomic data revealed lower *CXCR5* and *S1PR1* expression in ICAP-1$^{-/-}$ MZ B cells than in control cells (Fig. 5F). Moreover, we found reduced levels of CXCR5 and S1PR1 on the membrane of MZ, as well as on FO B cells (Fig. 5G). Instead, CXCR5 and S1PR1 expression was comparable on LN B cells from control and ICAP-1-deficient mice (Supporting information Fig. S6B). Examination of the chemotactic capacity of ICAP-1$^{-/-}$ spleen CD19^{+} B cells to CXCL13, the ligand for CXCR5, revealed an impairment in migration of the FO, and to a lesser extent of the MZ B cell subsets, relative to wild type cells (Fig. 5H).

Sequencing data showed higher *Itgb1* and *Itgb2* levels in ICAP-1-null MZ B cells than control ones (Fig. 5F). A modest increase in β1 (CD29) levels was detected on MZ but not on FO B cells from ICAP-1$^{-/-}$ mice relative to control counterparts (Supporting information Fig. S6C), whereas α4 (CD49d) and β2 (CD18) expression was similar in both animal groups (Supporting information Fig. S6D, E).

DISCUSSION

Spleen marginal zone B cells are continuously exposed to blood-borne pathogens, providing rapid T cell-independent as well as T cell-dependent immunosurveillance. The MZ B cell subset arises from a multistep transitional process requiring signals from the BCR and BAFFR, and from the Notch2 pathway [2, 5]. The stage T2 cells expressing high CD21 levels are recognized as precursors for MZ B cells (pre-MZ) [9]. We previously showed a marked reduction in the mature MZ B cell compartment in mice lacking ICAP-1 [26]. Possible causes for the cell reduction include intrinsic proliferation defects, absence or decrease of critical growth stimuli in the spleen microenvironment, decreased proliferation or differentiation of immediate early precursors, and increased apoptosis. In the present work we show that, with the exception of pre-MZ B cells, the spleen transitional T1 and T2 B cell stages, and mature MZ and FO B cells all display reduced numbers in ICAP-1$^{-/-}$ mice, reflecting the overall decrease in splenocyte cell numbers in these mutant mice [26]. Yet, cell proportions were only reduced in the MZ B cell subset linked to increased pre-MZ B cell frequencies. Results from experiments with BM chimeric mice revealed that defective generation of MZ B cells in mice lacking ICAP-1 primarily involves B cell-autonomous functions. As numbers of pre-MZ cells do not diminish, results suggest that the reduced MZ B cell numbers and frequencies in ICAP-1-null mice involve a defective transition from the pre-MZ to the MZ B cell stage.

The observed overall decrease in spleen B cell numbers in ICAP-1$^{-/-}$ mice likely reflects an impairment in cell proliferation, based on immunofluorescence data from spleen tissues, which showed a remarkable reduction of ICAP-1-null Ki67^{+}CD19^{+} B lymphocytes relative to wild type spleens. These results are in line with previous observations of defective proliferation of osteoprogenitor cells in ICAP-1-deficient mice [18]. In addition, our *in vitro* assays revealed a decrease in proliferation of ICAP-1-deficient FO and MZ B cells to three different B-cell specific stimuli. Therefore, impaired ICAP-1$^{-/-}$ B cell proliferation can be detected *in situ* with an intact spleen microenvironment, as well as *in vitro* with cells in suspension, the later presumably in the absence of B lymphocyte adhesion. These data suggest again that weakened proliferation of ICAP-1$^{-/-}$ B cells is B cell-autonomous, as it can be detected in the absence of spleen stromal cells.

Reduced B cell as well as T cell proliferation in ICAP-1$^{-/-}$ spleens correlated with decreased apoptosis, a hallmark of senescence [27]. We found induction of senescence in ICAP-1-null spleens, based on the increase of SA-β-Gal activity and reduced LaminB1 expression. Interestingly, we did not observe changes in ICAP-1 expression levels in the Tabula muris senis dataset [45]. Therefore, it is tempting to propose that induction of senescence might be a consequence of the defective immune cell proliferation in ICAP-1-null spleens, which might compromise immunosurveillance and could prevent the successful elimination of emerging senescent cells [46].

As Notch2 is required for development of MZ B cells [12, 13], we interrogated the sequencing data for expression of *Notch2* in ICAP-1$^{-/-}$ MZ B cells. The RNAseq and subsequent qPCR results provided evidence that the Notch2 pathway was altered in the mutant cells, as *Notch2* and its downstream targets *Hes1, Dtx1* and *Myc* were

downregulated. Moreover, we found that Notch2 protein levels were decreased on ICAP-$1^{-/-}$ MZ as well as on pre-MZ B cells. Together, the data indicate that Notch2 represents a target for regulation by ICAP-1, and suggest that the defective Notch2 pathway leads to the deficient generation of MZ B cells in ICAP-1-null mice. Of note, previous data showed that adenovirally-promoted ICAP-1 expression in endothelial cells led to Notch1 activation and increased expression of Notch1 downstream targets [47], further pointing to the Notch pathway as being regulated by ICAP-1.

The altered expression of several transcription factors with known roles in the generation and/or maintenance of MZ B cells, including *Klf2* and *Zfp36l1*, could also contribute to the reduced amounts of this B cell subset in ICAP-$1^{-/-}$ mice. Deletion of *Klf2* leads to accumulation of MZ B cells [35, 36], and its levels can be controlled by *Notch2* [34] and by *Zfp36l1*, a transcription factor involved in maintenance of the MZ B cell pool [37]. The downregulation of *Zfp36l1* in ICAP-1-null MZ B cells raises the possibility that the increased *Klf2* levels in these mutant cells might be a consequence of the reduced *Notch2* as well as *Zfp36l1* expression, and overall could add to the decreased MZ B cells in ICAP-$1^{-/-}$ mice.

Development of spleen B cells also critically depends on signalling from the BCR [2, 10, 48, 49]. The strongest consequence of the lack of ICAP-1 was that upregulation of the expression of the CD86 activation marker following BCR cross-linking was drastically reduced in ICAP-$1^{-/-}$ MZ B cells. Two signalling molecules involved in BCR-mediated induction of CD86 are Blnk and Gpr174 [42, 43], whose mRNAs were decreased in ICAP-1-deficient MZ B cells, thus potentially contributing to the blockade of CD86 induction. As CD86 is a key co-stimulatory molecule for T cells [50-52], a possible consequence for the impaired CD86 upregulation following BCR cross-linking would be a defective $CD4^+$ T cell expansion following B cell-T cell interaction. The development of MZ B cells is also controlled by BAFFR [7, 8, 39]. The expression of BAFFR on MZ B cell membranes was only slightly reduced, suggesting that impaired generation of MZ B cells in ICAP-$1^{-/-}$ mice is mostly independent of BAFFR.

The decrease in the MZ B cell compartment in ICAP-1-null spleens could also involve their anomalous trafficking and positioning. ICAP-$1^{-/-}$ MZ B cells displayed a decrease in cell membrane expression of CXCR5 and S1PR1, and a reduced *in vitro* chemotaxis to CXCL13. This could lead to their impaired shuttling from the MZ to the follicles, potentially leading to increased MZ B cell retention in the MZ, and therefore, it seems unlikely that a defective trafficking of these cells could account for their reduction in ICAP-$1^{-/-}$ spleens. A possible consequence of decreased CXCR5-dependent migration of MZ B cells would be an impaired antigen presentation by these cells in the follicles.

Together with earlier studies [15-17, 22-26], the present data indicate that depending on its localization, ICAP-1 can regulate at least two responses: cell adhesion mediated by β1 integrins and gene expression. It is not known at present if these responses are functionally interconnected or independent. If both occur at a given cell type, it might require sufficient levels of ICAP-1 bound to integrins and ICAP-1 distributed to the nucleus. For instance, our present and previous results [26] reveal an accumulation of ICAP-1 in the cytoplasm and nucleus of T and B splenocytes, providing control of α4β1-mediated cell adhesion and regulation of gene expression. Instead, thymocytes display a

strong ICAP-1 nuclear localization, where it can influence expression of Runx3, a key transcription factor promoting SP $CD8^+$ thymocyte development, without modulating $\alpha 4\beta 1$-dependent cell adhesion [26].

As ICAP-1 targets a considerable number of genes, it is possible that it might be involved in indirect regulation of gene expression by controlling the levels of upstream genes in a circuit leading to changes in the expression of downstream genes, or alternatively, it could play a scaffold role forming part of complexes regulating transcription. Next experimental work should focus in elucidating the ICAP-1 interacting partners, with the goal of linking its interactome with its specific cell responses.

MATERIALS AND METHODS

Mice and cells. ICAP$^{+/-}$ mice were intercrossed to generate ICAP$^{-/-}$ mice, which were genotyped by PCR and confirmed by immunoblotting for ICAP-1 deletion [26]. Mice were maintained under pathogen-free conditions in the Animal Facility of the Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas. Single cell suspensions from spleens, lymph nodes (LN) and BM from femur and tibia were obtained from 7-11-week old male or female mice. For the preparation of chimeric mice, we followed the reported method [26]. Spleen and LN CD19^{+} B cells were purified by negative selection using the MojoSort Mouse Pan B Cell Isolation Kit II (BioLegend, San Diego, CA).

Flow cytometry, cell fractionation and immunoblotting. Cells were incubated with fluorochrome-conjugated or non-conjugated antibodies, followed by staining with secondary antibodies. To exclude dead cells, samples were exposed to Ghost Dye Red 780 (Tonbo Biosciences). List of antibodies is displayed on Table S1. Cell data were obtained using the Cytoflex S cytometer (Beckman Coulter), and analyzed using FlowJo v.10.8.1 software. The t-SNE (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) reduction algorithm (FlowJo) was used to visualize the developing transitional and mature B cells. For cell cycle, cells were incubated with or without anti-IgM and IL-4, and after fixation, they were resuspended in propidium iodide solution (PI/RNASE Solution). Cell cycle profiles were obtained by FACS, and cell proportions in the cell cycle phases was calculated following the Watson model of the FlowJo software. For cell fractionation, we followed the described method [26]. For immunoblotting, PVDF membranes were incubated with primary antibodies and with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Proteins were visualized as described [26].

Analysis of cell proliferation and activation, and cell chemotaxis Selected spleen CD19^{+} B cells were labelled with CellTrace Violet (CTV) [26]. Labelled cells in B cell-rich medium (RPMI 1640/FBS 10%, glutamine 2 mM, sodium pyruvate 1 mM, HEPES 10 mM pH 7.4, β-mercaptoethanol 0.05 mM, and nonessential aminoacids 400 μM), were incubated without or with anti-IgM (20 μg/mL; Jackson ImmunoResearch) and murine IL-4 (20 ng/mL; Preprotech), or with anti-CD40 (5 μg/mL; BioLegend) and IL-4, or in the presence of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS; 2.5 μg/mL, O111:B4; Sigma Aldrich). After 96h, cells were analyzed by FACS with APC-anti-CD19, FITC-anti-CD21 and PE-anti-CD23. The proliferation index was determined as before [26]. For cell stimulation, purified CD19^{+} B cells were resuspended in B cell-rich medium and incubated for 24 hours in the absence or presence of goat anti-mouse IgM, anti-mouse CD40 or LPS. Cells were subsequently labelled with different antibodies for FACS, using anti-CD19 antibodies to identify total B cells, and anti-CD21 and anti-CD23 for gating FO and MZ B cells. For chemotaxis, CD19^{+} B cells were cultured for 1 h in adhesion medium (RPMI 1640, HEPES 10 mM and fatty acid-free BSA 0.2%), and seeded ($3x10^5$) in triplicates on the top chambers of Transwells (5 μm pore size, Costar). Bottom chambers were filled with adhesion medium with or without CXCL13 (400 ng/ml; BioLegend), and samples incubated for 3 hours at 37ºC. Migrated cells were labelled with APC-anti-CD19, FITC-anti-CD21 or PE-anti-CD23 antibodies, and extent of cell

migration analyzed by FACS. Percentage of migration was calculated from the migrated FO and MZ cells, divided by their numbers and multiplied by 100.

Tissue immunofluorescence. Frozen spleen tissue sections were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized using Triton-X-100 0.3% in PBS, BSA 5% and normal goat serum 5%. To analyze *in situ* proliferation, samples were incubated with unlabeled primary purified antibodies, or with fluorochrome-conjugated antibodies. Samples exposed to primary unlabelled antibodies were subsequently incubated with secondary antibodies. Chambers were mounted with Fluoromont-G mounting medium, and images acquired using 63x and 40x oil immersion objectives on an inverted confocal laser microscope (Leica TCS-SP5), every 1 μm in the Z axis. Analysis was the result of Z-stack composition (merging) to quantify the staining of different markers using Fiji Image J software. To visualize apoptosis, spleen sections were incubated with unlabeled or biotinylated primary antibodies. Samples were permeabilized with PBS/Triton X-100 0.2%, and processed with the One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit (Elabscience. Houston, TX). Afterwards, all samples were incubated with fluorochrome-conjugated primary and secondary antibodies and analysis on a Leica TCS-SP5 microscope.

β-Galactosidase assay. Frozen spleen sections were fixed with 0.2% glutaraldehyde in PBS. After washing with a PBS/$MgCl_2$ 1 mM, an X-Gal dye solution composed of 1 mg/mL NN-Dimethylformamide, $K_3[Fe(CN)_6]$ 100 mM, and $K_4[Fe(CN)_6]*3H_2O$ 100 mM in PBS/$MgCl_2$ was added for 24-48h at 37ºC. Finally, the X-Gal-stained slices were washed with water, and images acquired on THUNDER Imager 3D Tissue Microscope (Leica Microsystems) under 40x and 63x oil immersion objectives, and analyzed by Fiji Image J software.

RNA sequencing. Sorted MZ B cells were resuspended in RLT plus buffer (RNeasy Plus Micro Kit, Qiagen) supplemented with β-mercaptoethanol 10%, and RNA extracted following the manufacturer instructions. RNA sequencing was conducted by Novogene (Cambridge, UK). The kit for library preparation was the Novogene NGS RNA Library Prep Set (PT042), and libraries were sequenced on the Illumina platform Novaseq6000. The reference genome assembly GRCm38 and its gene model annotation files were downloaded from Ensembl database. The transcript expression levels were quantified in terms of FPKM (expected number of Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions base pairs sequenced) values. The differential expression analysis between the two groups (ICAP-$1^{+/+}$ and ICAP-$1^{-/-}$; two replicates per condition) was carried out using the DESeq2 R package v1.36.0. The resulting P-values were adjusted using the Benjamini and Hochberg's procedure for controlling the FDR (false discovery rate). Genes with a padj <= 0.05 and |log2(FoldChange)| >= 1 were assigned as differentially expressed (DEGs). Functional enrichment analysis of DEGs was performed to determine significant (FDR <= 0.05) enrichment in GO terms and KEGG pathways. Sequence information will be deposited at the Gene Expression Omnibus (GEO) database.

Real-time quantitative PCR. RNA was extracted with the RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen), and cDNA obtained using the SuperScript III First-Stranded Synthesis SuperMix kit (Thermo Fisher), with 2.5 μM oligo-deoxynucleotides, 2.5 ng/μL random hexamers, $MgCl_2$ 10 mM and 500 μM dNTPs. RT-qPCR was performed using the LightCycler 480 thermocycler in 384-well plates (LightCycler 480 Multiwell Plate,

Roche), with 2.5 µL cDNA, 20 µM of specific DNA oligonucleotides, and FastStart Essential DNA Green Master reagent (Roche). Results were calculated using LightCycler 480 Software version 1.5.0 (Roche), based on the average of fluorescence threshold value (Ct) normalized by reference gene Ct values (TBP).

Statistical analyses. Differences were calculated using Student's *t*-test analysis (two samples) for normal populations. For three or more conditions, one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey-Kramer post-hoc test were used. The significance level was a p value <0.05. Data without statistical significance were represented as *ns*, while significant changes were indicated as $*p< 0.05$, $**p< 0.01$, and $***p< 0.001$. Statistics and graphs were obtained by GraphPad Prism software version 8.0.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Daniel Bouvard (Centre de Recherche en Biologie Cellulaire de Montpellier, Montpellier, France), Aldo Borroto and Balbino Alarcón (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC, Cantoblanco, Spain) for reagents and helpful suggestions. We thank the Histology Facility at Centro de Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) for the histological preparation of biological samples. Dr. Pedro Lastres and Patricia Yagüe-Fernández are acknowledged for help in cell sorting. We also thank Francisco Casado-Robledillo and Marta Cereceda-Díaz in the Animal Facilitiy, and Dr. Luisa Botella for her help with mice irradiation. This work was supported by grants PID2020-116291RB-I00 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) to J.T. The O'Loghlen Lab received funding from Barts Charity Grant (G-002158), grants PID2021-125656OB-I00 (MICINN) and CNS2022-135134 (MICINN), and grant SenesceX- CM P2022/BMD-7393 (Comunidad de Madrid).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JT wrote the manuscript. Experimental design, data analysis and interpretation were performed by Y.R.G., A.J.S, M.G.M., I.A.S., M.G.L., A.O'.L and J.T. Experimental performance was carried out by Y.R.G., A.J.S, M.G.M., I.A.S., M.M.G., and M.H.B.

ETHICS APPROVAL STATEMENT

All mouse experiments were approved by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas Ethics Committee.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

REFERENCES

1 **Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C. and Carsetti, R.,** B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* 1999. **190**: 75-89.

2 **Pillai, S. and Cariappa, A.,** The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* 2009. **9**: 767-777.

3 **Allman, D., Lindsley, R. C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S. A. and Hardy, R. R.,** Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol* 2001. **167**: 6834-6840.

4 **Su, T. T. and Rawlings, D. J.,** Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J Immunol* 2002. **168**: 2101-2110.

5 **Cerutti, A., Cols, M. and Puga, I.,** Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2013. **13**: 118-132.

6 **Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E. and Scott, M. L.,** An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 2001. **293**: 2111-2114.

7 **Sasaki, Y., Casola, S., Kutok, J. L., Rajewsky, K. and Schmidt-Supprian, M.,** TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and -independent roles for BAFF in B cell physiology. *J Immunol* 2004. **173**: 2245-2252.

8 **Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Walsh, M. E., Ng, L. G., MacKay, F., Rao, S. P., Kalled, S. L. and Scott, M. L.,** B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J Immunol* 2004. **173**: 2331-2341.

9 **Srivastava, B., Quinn, W. J., 3rd, Hazard, K., Erikson, J. and Allman, D.,** Characterization of marginal zone B cell precursors. *J Exp Med* 2005. **202**: 1225-1234.

10 **Wen, L., Brill-Dashoff, J., Shinton, S. A., Asano, M., Hardy, R. R. and Hayakawa, K.,** Evidence of marginal-zone B cell-positive selection in spleen. *Immunity* 2005. **23**: 297-308.

11 **Allman, D. and Pillai, S.,** Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2008. **20**: 149-157.

12 **Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Hamada, Y., Aizawa, S. and Hirai, H.,** Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 2003. **18**: 675-685.

13 **Witt, C. M., Won, W. J., Hurez, V. and Klug, C. A.,** Notch2 haploinsufficiency results in diminished B1 B cells and a severe reduction in marginal zone B cells. *J Immunol* 2003. **171**: 2783-2788.

14 **Hozumi, K., Negishi, N., Suzuki, D., Abe, N., Sotomaru, Y., Tamaoki, N., Mailhos, C., Ish-Horowicz, D., Habu, S. and Owen, M. J.,** Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol* 2004. **5**: 638-644.

15 **Chang, D. D., Wong, C., Smith, H. and Liu, J.,** ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally

important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol* 1997. **138**: 1149-1157.

16 **Zhang, X. A. and Hemler, M. E.,** Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J Biol Chem* 1999. **274**: 11-19.

17 **Chang, D. D., Hoang, B. Q., Liu, J. and Springer, T. A.,** Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *J Biol Chem* 2002. **277**: 8140-8145.

18 **Bouvard, D., Aszodi, A., Kostka, G., Block, M. R., Albiges-Rizo, C. and Fassler, R.,** Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development* 2007. **134**: 2615-2625.

19 **Faurobert, E., Rome, C., Lisowska, J., Manet-Dupe, S., Boulday, G., Malbouyres, M., Balland, M., Bouin, A. P., Keramidas, M., Bouvard, D., Coll, J. L., Ruggiero, F., Tournier-Lasserve, E. and Albiges-Rizo, C.,** CCM1-ICAP-1 complex controls beta1 integrin-dependent endothelial contractility and fibronectin remodeling. *J Cell Biol* 2013. **202**: 545-561.

20 **Martinez-Moreno, M., Leiva, M., Aguilera-Montilla, N., Sevilla-Movilla, S., Isern de Val, S., Arellano-Sanchez, N., Gutierrez, N. C., Maldonado, R., Martinez-Lopez, J., Buno, I., Garcia-Marco, J. A., Sanchez-Mateos, P., Hidalgo, A., Garcia-Pardo, A. and Teixido, J.,** In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by alpha4beta1 cytoplasmic-binding proteins. *Leukemia* 2016. **30**: 861-872.

21 **Zhang, J., Clatterbuck, R. E., Rigamonti, D., Chang, D. D. and Dietz, H. C.,** Interaction between krit1 and icap1alpha infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet* 2001. **10**: 2953-2960.

22 **Liu, W., Draheim, K. M., Zhang, R., Calderwood, D. A. and Boggon, T. J.,** Mechanism for KRIT1 release of ICAP1-mediated suppression of integrin activation. *Mol Cell* 2013. **49**: 719-729.

23 **Fournier, H. N., Dupe-Manet, S., Bouvard, D., Luton, F., Degani, S., Block, M. R., Retta, S. F. and Albiges-Rizo, C.,** Nuclear translocation of integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 stimulates cellular proliferation. *Mol Biol Cell* 2005. **16**: 1859-1871.

24 **Draheim, K. M., Huet-Calderwood, C., Simon, B. and Calderwood, D. A.,** Nuclear Localization of Integrin Cytoplasmic Domain-associated Protein-1 (ICAP1) Influences beta1 Integrin Activation and Recruits Krev/Interaction Trapped-1 (KRIT1) to the Nucleus. *J Biol Chem* 2017. **292**: 1884-1898.

25 **Su, V. L., Simon, B., Draheim, K. M. and Calderwood, D. A.,** Serine phosphorylation of the small phosphoprotein ICAP1 inhibits its nuclear accumulation. *J Biol Chem* 2020. **295**: 3269-3284.

26 **Sevilla-Movilla, S., Fuentes, P., Rodríguez-García, Y., Arellano-Sánchez, N., Krenn, P. W., de Val, S. I., Montero-Herradón, S., García-Ceca, J., Burdiel-Herencia, V., Gardeta, S. R., Aguilera-Montilla, N., Barrio-Alonso, C., Crainiciuc, G., Bouvard, D., García-Pardo, A., Zapata, A. G., Hidalgo, A., Fässler, R., Carrasco, Y. R., Toribio, M. L. and Teixidó, J.,** ICAP-1 loss impairs CD8(+) thymocyte development and leads to reduced marginal zone B cells in mice. *Eur J Immunol* 2022. **52**: 1228-1242.

27 **Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., Sedivy, J., Vougas, K., von**

Zglinicki, T., Zhou, D., Serrano, M. and Demaria, M., Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* 2019. **179**: 813-827.

28 **Benschop, R. J., Melamed, D., Nemazee, D. and Cambier, J. C.,** Distinct signal thresholds for the unique antigen receptor-linked gene expression programs in mature and immature B cells. *J Exp Med* 1999. **190**: 749-756.

29 **Ferrero, I., Anjuère, F., Martín, P., Martínez del Hoyo, G., Fraga, M. L., Wright, N., Varona, R., Márquez, G. and Ardavín, C.,** Functional and phenotypic analysis of thymic B cells: role in the induction of T cell negative selection. *Eur J Immunol* 1999. **29**: 1598-1609.

30 **Minguet, S., Dopfer, E. P., Pollmer, C., Freudenberg, M. A., Galanos, C., Reth, M., Huber, M. and Schamel, W. W.,** Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. *Eur J Immunol* 2008. **38**: 2475-2487.

31 **Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T. and Honjo, T.,** Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* 1995. **5**: 1416-1423.

32 **Tanigaki, K., Han, H., Yamamoto, N., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kuroda, K., Suzuki, A., Nakano, T. and Honjo, T.,** Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol* 2002. **3**: 443-450.

33 **Hampel, F., Ehrenberg, S., Hojer, C., Draeseke, A., Marschall-Schröter, G., Kühn, R., Mack, B., Gires, O., Vahl, C. J., Schmidt-Supprian, M., Strobl, L. J. and Zimber-Strobl, U.,** CD19-independent instruction of murine marginal zone B-cell development by constitutive Notch2 signaling. *Blood* 2011. **118**: 6321-6331.

34 **Lechner, M., Engleitner, T., Babushku, T., Schmidt-Supprian, M., Rad, R., Strobl, L.J., and Zimber-Strobl, U.,** Notch2-mediated plasticity between marginal zone and follicular B cells. *Nat Comm* 2021. **12**: 1111.

35 **Hart, G. T., Wang, X., Hogquist, K. A. and Jameson, S. C.,** Krüppel-like factor 2 (KLF2) regulates B-cell reactivity, subset differentiation, and trafficking molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011. **108**: 716-721.

36 **Winkelmann, R., Sandrock, L., Porstner, M., Roth, E., Mathews, M., Hobeika, E., Reth, M., Kahn, M. L., Schuh, W. and Jäck, H. M.,** B cell homeostasis and plasma cell homing controlled by Krüppel-like factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011. **108**: 710-715.

37 **Newman, R., Ahlfors, H., Saveliev, A., Galloway, A., Hodson, D.J., Williams, R., Besra, G.S., Cook, C.N., Cunningham, A.F., Bell, S.E. et al**, Maintenance of the marginal-zone B cell compartment specifically requires the RNA-binding protein ZFP36L1. *Nat Immunol* 2017. **18**: 683-693.

38 **Turner, M., Gulbranson-Judge, A., Quinn, M. E., Walters, A. E., MacLennan, I. C. and Tybulewicz, V. L.,** Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool. *J Exp Med* 1997. **186**: 2013-2021.

39 **Martin, F. and Kearney, J. F.,** Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity* 2000. **12**: 39-49.

40 **Jumaa, H., Wollscheid, B., Mitterer, M., Wienands, J., Reth, M. and Nielsen, P. J.,** Abnormal development and function of B lymphocytes in mice deficient for the signaling adaptor protein SLP-65. *Immunity* 1999. **11**: 547-554.

41 **Pappu, R., Cheng, A. M., Li, B., Gong, Q., Chiu, C., Griffin, N., White, M., Sleckman, B. P. and Chan, A. C.,** Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development. *Science* 1999. **286**: 1949-1954.

42 **Hayashi, K., Nittono, R., Okamoto, N., Tsuji, S., Hara, Y., Goitsuka, R. and Kitamura, D.,** The B cell-restricted adaptor BASH is required for normal development and antigen receptor-mediated activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. **97**: 2755-2760.

43 **Wolf, E. W., Howard, Z. P., Duan, L., Tam, H., Xu, Y. and Cyster, J. G.,** GPR174 signals via Gαs to control a CD86-containing gene expression program in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022. **119**: e2201794119.

44 **Cyster, J. G. and Allen, C. D. C.,** B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* 2019. **177**: 524-540.

45 **Schaum, N., Lehallier, B., Hahn, O., Pálovic, R., Hosseinzadeh, S., Lee. S.E., Sit, R., Lee, D.P., Morán Losada, P., Zardeneta, M.E. et al.**, Ageing hallmarks exhibit organ-specific temporal signatures. *Nature* 2020. **583**: 596-602.

46 **Wang, T. W. and Nakanishi, M.,** Immune surveillance of senescence: potential application to age-related diseases. *Trends Cell Biol* 2024.

47 **Brütsch, R., Liebler, S. S., Wüstehube, J., Bartol, A., Herberich, S. E., Adam, M. G., Telzerow, A., Augustin, H. G. and Fischer, A.,** Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 attenuates sprouting angiogenesis. *Circ Res* 2010. **107**: 592-601.

48 **Torres, R. M., Flaswinkel, H., Reth, M. and Rajewsky, K.,** Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. *Science* 1996. **272**: 1804-1808.

49 **Lam, K. P., Kühn, R. and Rajewsky, K.,** In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 1997. **90**: 1073-1083.

50 **Lenschow, D. J., Su, G. H., Zuckerman, L. A., Nabavi, N., Jellis, C. L., Gray, G. S., Miller, J. and Bluestone, J. A.,** Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 11054-11058.

51 **Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and Somoza, C.,** B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 1993. **366**: 76-79.

52 **Burke, K. P., Chaudhri, A., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H.,** The B7:CD28 family and friends: Unraveling coinhibitory interactions. *Immunity* 2024. **57**: 223-244.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Spleen B cell subsets in ICAP-1$^{-/-}$ mice. (A, B) Cell proportions and numbers of spleen B cell subsets in ICAP-1$^{+/+}$ (+/+) and ICAP-1$^{-/-}$ (-/-) mice. Panels show pooled data from two independent experiments (n=4-5; unpaired t-test; ns, non-significant.***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, mean±s.d). (C) High-dimensional data from FACS data using the t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) dimensionality reduction algorithm. Results show representative images of data from panels A and B (two independent experiments). (D) Shown is the distribution of immature BM cells as analyzed by FACS (pooled data from two independent experiments; n=4; unpaired test). (E) Spleens from chimeric mice were analyzed by FACS to assess proportions of MZ and FO B cells. Displayed are representative dot plots. Right panel shows pooled data from three independent experiments (donor CD45.2 (+/+) n=8, donor CD45.2 (-/-) n=5; unpaired t-test, ***p<0.001, mean±s.d).

Figure 2. Spleen B cell proliferation and apoptosis, and induction of senescence in ICAP-1-null mice. CD19^{+} B cells on frozen spleen tissue sections were analyzed for Ki67 expression (A), or subjected to TUNEL assays (B). Left panels show representative images, and right panels display quantification of the data from three control and three ICAP-1$^{-/-}$ mice (3-7 areas per section; unpaired t-test, ***p<0.001, mean±s.d). (C) Analysis of SA-β-Gal activity (blue cells), and (D) immunofluorescence of LaminB1 labelling from spleen frozen sections. (E) Representative images showing co-staining for SA-β-Gal positive labelling and LaminB1 negative staining. The right panels on C-E display data of three independent experiments from three ICAP-1$^{+/+}$ and three ICAP-1$^{-/-}$ mice (2-5 areas per section; unpaired t-test, ***p<0.001, mean±sem).

Figure. 3. Analysis of *in vitro* spleen B cell proliferation and activation in the absence of ICAP-1. (A) Purified CD19^{+} B cells were treated with or without anti-IgM and IL-4, and subsequently subjected to cell cycle analyses. A representative result (left), and pooled data (right) from two independent experiments are shown (n=4; Anova Tukey's multiple comparisons; **p<0.01, *p<0.05, mean±s.d). (B, C) CellTrace Violet (CTV)-labelled CD19^{+} cells were exposed to anti-IgM/IL-4 (B), or to either anti-CD40 plus IL-4 or to LPS (C), and the degree of proliferation of gated follicular (FO) CD21^{med}CD23^{+} and marginal zone (MZ) CD21^{high}CD23^{-} cells was analyzed by FACS. Panels B and C display pooled data from three independent experiments (n=5-6; unpaired t-test; ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, mean±s.d). (D) CD19^{+} B cells were incubated for 24 h without or with anti-IgM antibodies, and expression of CD69 and CD86 in FO and MZ B cells was assessed by FACS. Representative histograms (left) are shown. Data show pooled data from two independent experiments (n=4-5; unpaired t-test, ***p<0.001, **p<0.01, mean±s.d).

Figure 4. Differential expression of genes regulating transcription between control and ICAP-1$^{-/-}$ MZ B cells. A) Wild type CD19^{+}-selected cells were subjected to cell fractionation assays followed by immunoblotting. SAM68 and c-Myc, or vinculin, were

used as nuclear and cytoplasmic markers, respectively. Shown is a representative result out of four independent experiments. (B) Volcano plot showing upregulated, downregulated and unchanged gene expression (|log2(FoldChange)| >= 1), and (C) gene set enrichment analysis in ICAP$^{-/-}$ MZ B cells relative to wild type cells. (D) Heatmap plot showing differential expression of genes regulating transcription from control and ICAP-1-null MZ B cells (|FC|>=1.5; FDR<=0.05). Panels B-D show data of RNAseq analyses from two control and two ICAP-1-null sorted-purified MZ B cells. (E) Expression of the indicated genes in MZ and FO B cells was determined by RT-PCR. Data show pooled data from two independent experiments (n=3-6; unpaired t-test, **p<0.01, mean±s.d). (F) Histograms (left) show a representative result of Notch2 expression in permeabilized MZ and FO B cells, as assessed by FACS. The right panels display the geometric mean fluorescence intensities of the indicated spleen B cell subsets (pooled data from two independent experiments; n=5-6; unpaired t-test, *p<0.05, mean±s.d). (G) Expression of the indicated genes was determined by RT-PCR. Data from one experiment (n=3; unpaired t-test, *p< 0.05, mean±s.d).

Figure 5. Differential expression of immune receptors, cell signaling and adhesion and migration molecules between control and ICAP-1-null MZ B cells. (A) Heatmap showing differences in immune receptor gene expression in sorted MZ B cells from control and ICAP-1-deficient mice. (B) Expression of *Tnfrsf13c* in MZ B cells was analyzed by qPCR. Data from one experiment (***p< 0.001, mean±s.d). (C) BAFFR expression on MZ and FO cells from CD19^{+}-gated lymphocytes was assessed by FACS. (Left) A representative histogram is shown. (Right) Data display pooled data from two independent experiments (n=5; unpaired t-test, **p<0.01, mean±s.d). (D) Heatmap displaying differentially expressed genes for signalling molecules between control and ICAP-1-/- MZ B cells. (E) Expression of the indicated genes was analyzed by qPCR. Data show pooled data from two independent experiments (n=4-6; unpaired t-test; **p<0.01, *p<0.05, mean±s.d). (F) Heatmap showing distinct levels of expression of adhesion and migration molecules in control and ICAP-1-null MZ B cells. (G) Expression of CXCR5 and S1PR1 on MZ and FO B cells was determined by FACS. Representative histograms are shown. FACS results display pooled data from three independent experiments (n=5-8; unpaired t-test, *p<0.05, mean±s.d). (H) CD19^{+}-purified B cells were subjected to chemotaxis assays in the absence (Ctrl) or presence of CXCL13. Migrated cells were analyzed by FACS for the quantification of MZ and FO cells. Data show pooled data from three independent experiments (n=5; unpaired t-test, **p<0.01, *p<0.05, mean±s.d). Panels A, D and F show data of RNAseq analyses from two control and two ICAP-1-null sorted-purified MZ B cells. (DEG in heatmaps, |FC|>=1.5; FDR<=0.05).

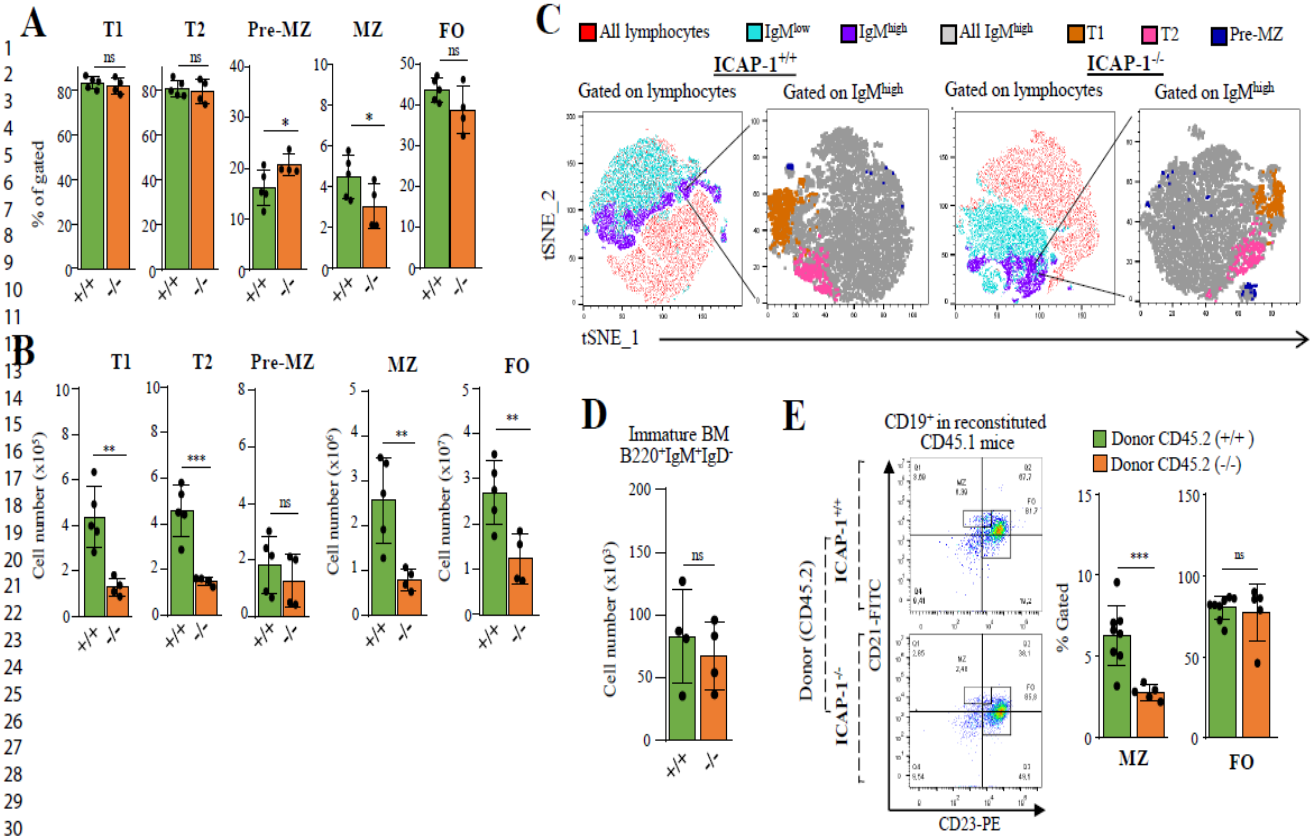

A
T1
T2
Pre-MZ
MZ
FO
% of gated
ns
*
+/+
-/-
B
Cell number (x10⁵)
Cell number (x10⁶)
Cell number (x10⁷)
**
***
C
All lymphocytes
IgM^low
IgM^high
All IgM^high
T1
T2
Pre-MZ
ICAP-1^+/+
ICAP-1^-/-
Gated on lymphocytes
Gated on IgM^high
tSNE_2
tSNE_1
D
Immature BM
B220⁺IgM⁺IgD⁻
Cell number (x10³)
E
CD19⁺ in reconstituted
CD45.1 mice
Donor (CD45.2)
ICAP-1^+/+
ICAP-1^-/-
CD21-FITC
CD23-PE
Donor CD45.2 (+/+)
Donor CD45.2 (-/-)
% Gated
MZ
FO

Fig. 1

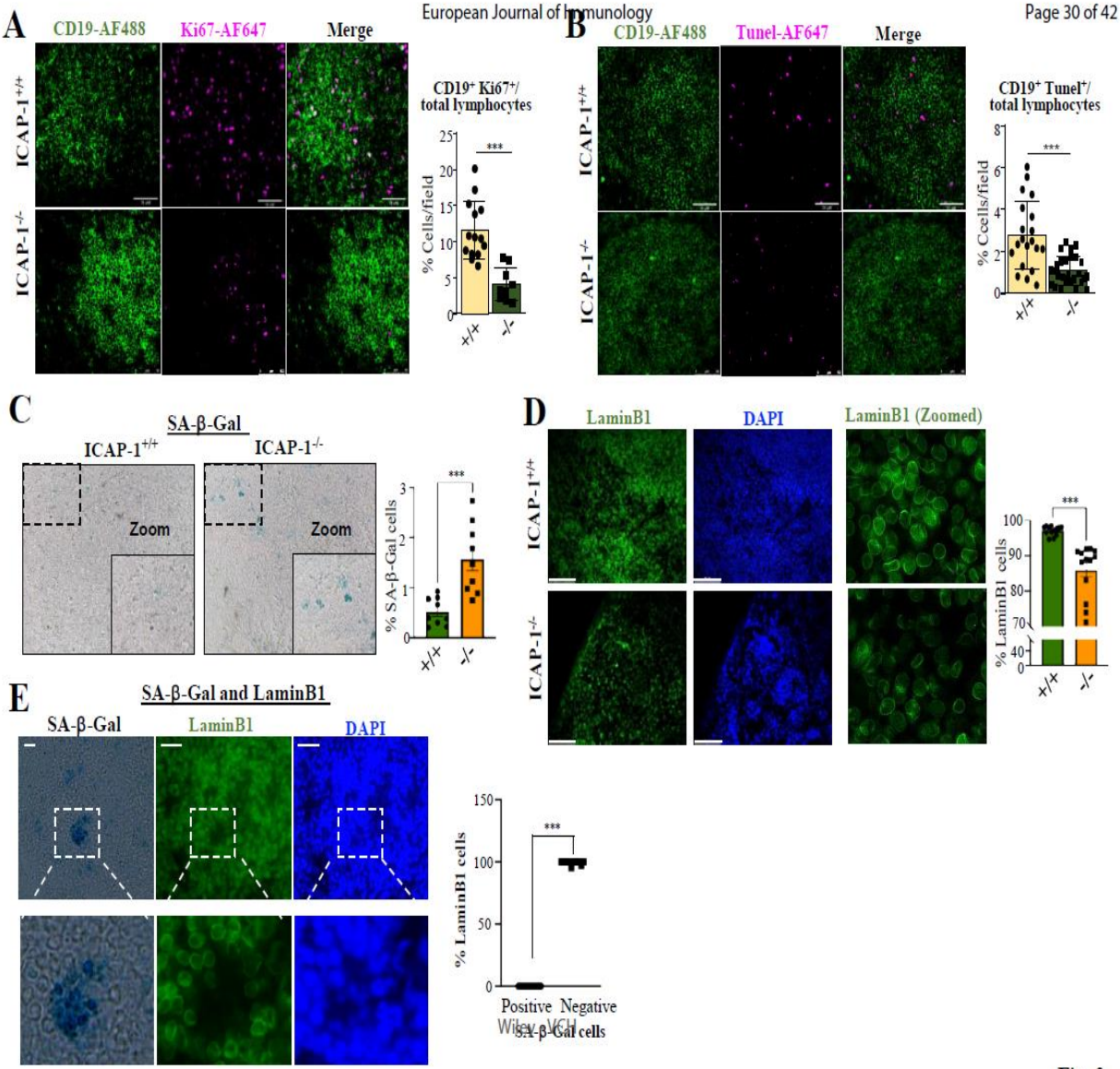

A
CD19-AF488
Ki67-AF647
Merge
ICAP-1+/+
ICAP-1-/-
CD19+ Ki67+/ total lymphocytes
% Cells/field
***
+/+
-/-
B
CD19-AF488
Tunel-AF647
Merge
ICAP-1+/+
ICAP-1-/-
CD19+ Tunel+/ total lymphocytes
% Ccells/field
***
+/+
-/-
C
SA-β-Gal
ICAP-1+/+
ICAP-1-/-
Zoom
Zoom
% SA-β-Gal cells
***
+/+
-/-
D
LaminB1
DAPI
LaminB1 (Zoomed)
ICAP-1+/+
ICAP-1-/-
% LaminB1 cells
***
+/+
-/-
E
SA-β-Gal and LaminB1
SA-β-Gal
LaminB1
DAPI
% LaminB1 cells
***
Positive
Negative
SA-β-Gal cells

Fig. 2

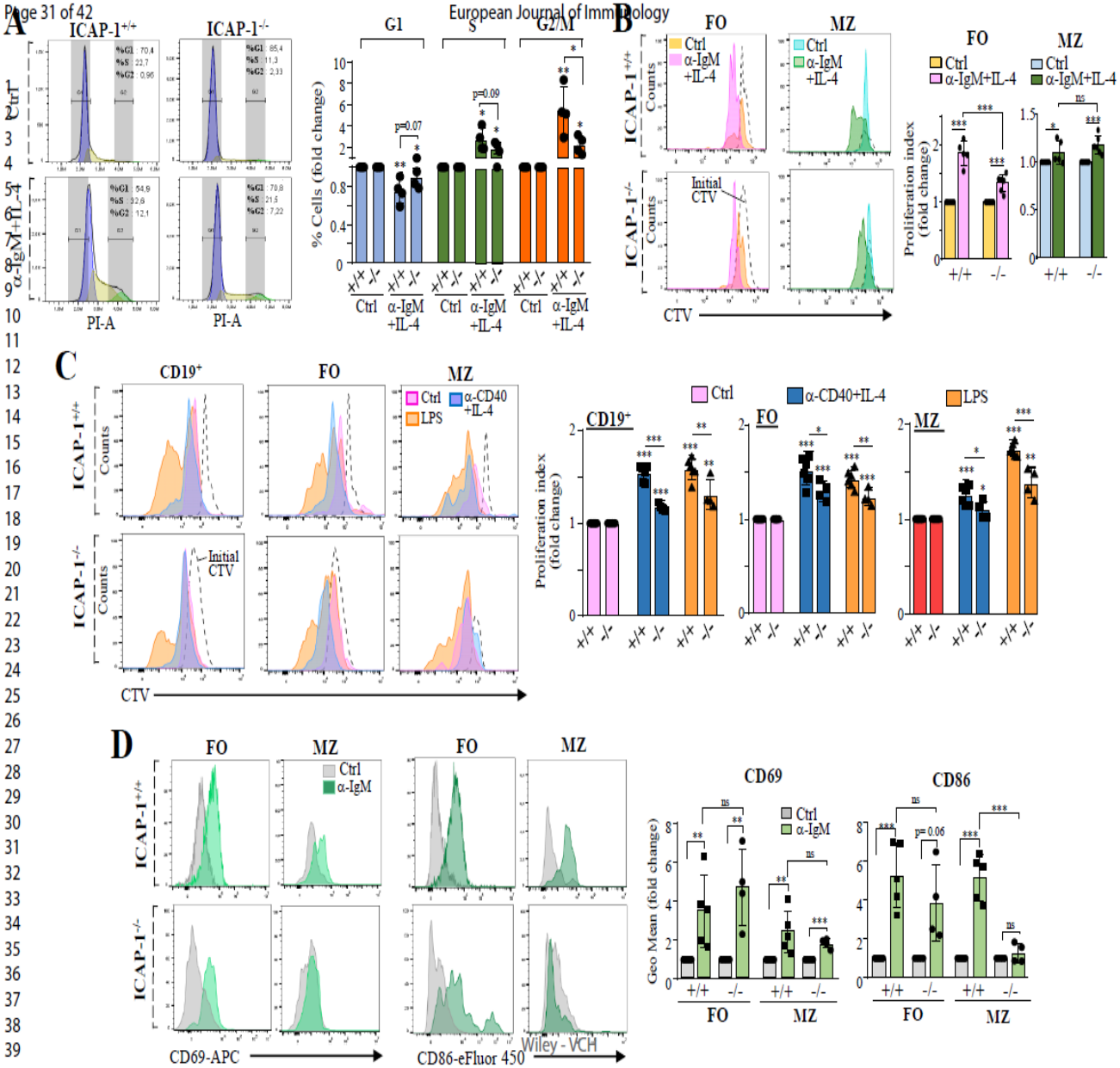
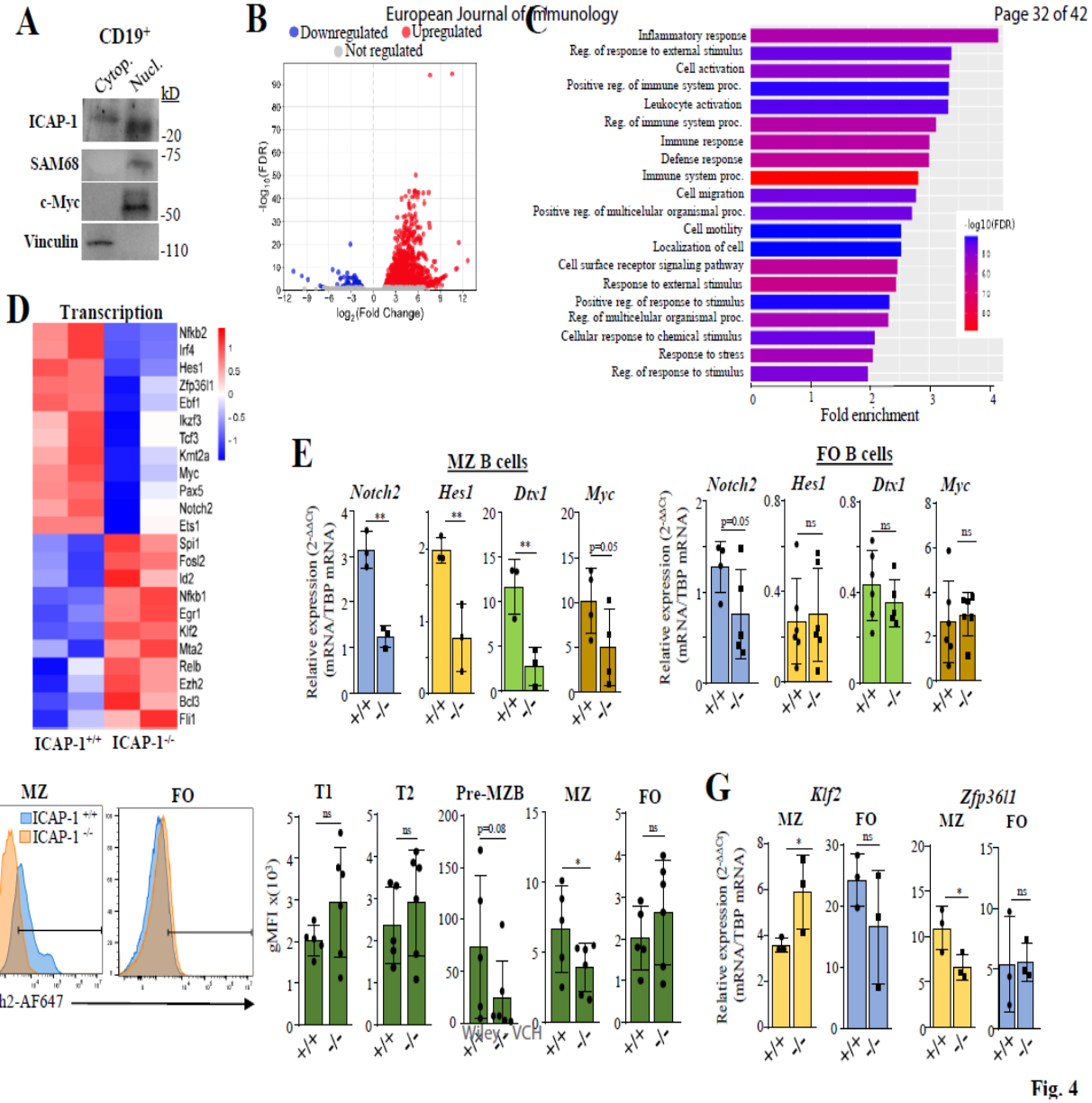

A
ICAP-1+/+
ICAP-1-/-
Ctrl
α-IgM+IL-4
PI-A
G1
S
G2/M
% Cells (fold change)
p=0.07
p=0.09
Ctrl
α-IgM +IL-4
B
FO
MZ
Ctrl
α-IgM +IL-4
Counts
Initial CTV
CTV
Proliferation index (fold change)
C
CD19+
α-CD40 +IL-4
LPS
α-CD40+IL-4
D
CD69-APC
CD86-eFluor 450
CD69
CD86
Geo Mean (fold change)
p= 0.06
Wiley - VCH

Fig. 3



Wiley - VCH

Fig. 4

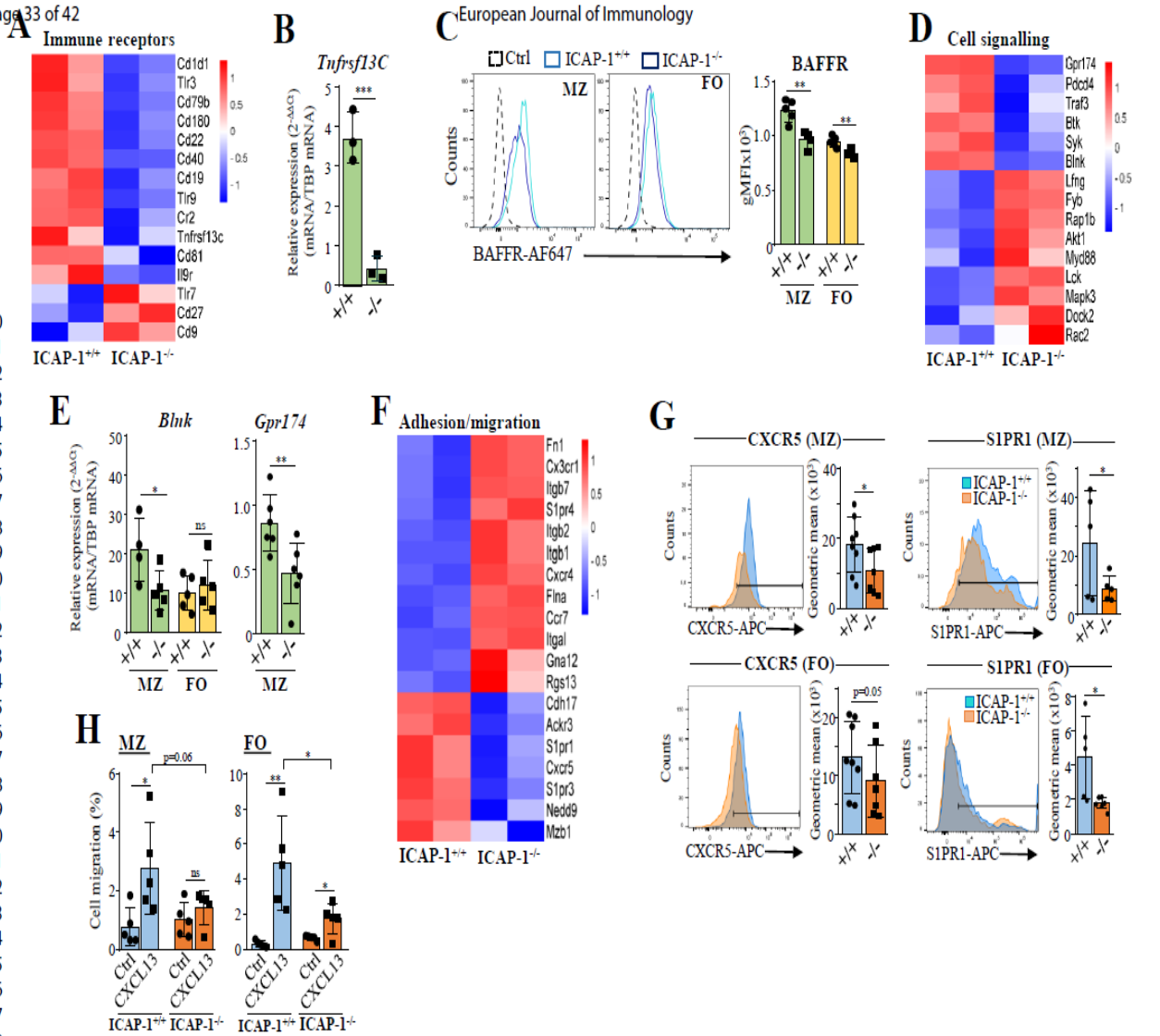

A
Immune receptors
Cd1d1
Tlr3
Cd79b
Cd180
Cd22
Cd40
Cd19
Tlr9
Cr2
Tnfrsf13c
Cd81
Il9r
Tlr7
Cd27
Cd9
ICAP-1+/+ ICAP-1-/-
B
Tnfrsf13C
Relative expression (2-ΔΔCt) (mRNA/TBP mRNA)
***
+/+ -/-
C
Ctrl ICAP-1+/+ ICAP-1-/-
MZ
FO
Counts
BAFFR-AF647
BAFFR
gMFIx10³
**
MZ FO
D
Cell signalling
Gpr174
Pdcd4
Traf3
Btk
Syk
Blnk
Lfng
Fyb
Rap1b
Akt1
Myd88
Lck
Mapk3
Dock2
Rac2
ICAP-1+/+ ICAP-1-/-
E
Blnk
Gpr174
Relative expression (2-ΔΔCt) (mRNA/TBP mRNA)
*
ns
**
MZ FO
MZ
F
Adhesion/migration
Fn1
Cx3cr1
Itgb7
S1pr4
Itgb2
Itgb1
Cxcr4
Flna
Ccr7
Itgal
Gna12
Rgs13
Cdh17
Ackr3
S1pr1
Cxcr5
S1pr3
Nedd9
Mzb1
ICAP-1+/+ ICAP-1-/-
G
CXCR5 (MZ)
S1PR1 (MZ)
Counts
CXCR5-APC
S1PR1-APC
Geometric mean (x10³)
ICAP-1+/+
ICAP-1-/-
CXCR5 (FO)
S1PR1 (FO)
p=0.05
H
MZ
FO
Cell migration (%)
p=0.06
Ctrl
CXCL13
ICAP-1+/+ ICAP-1-/-

Fig. 5

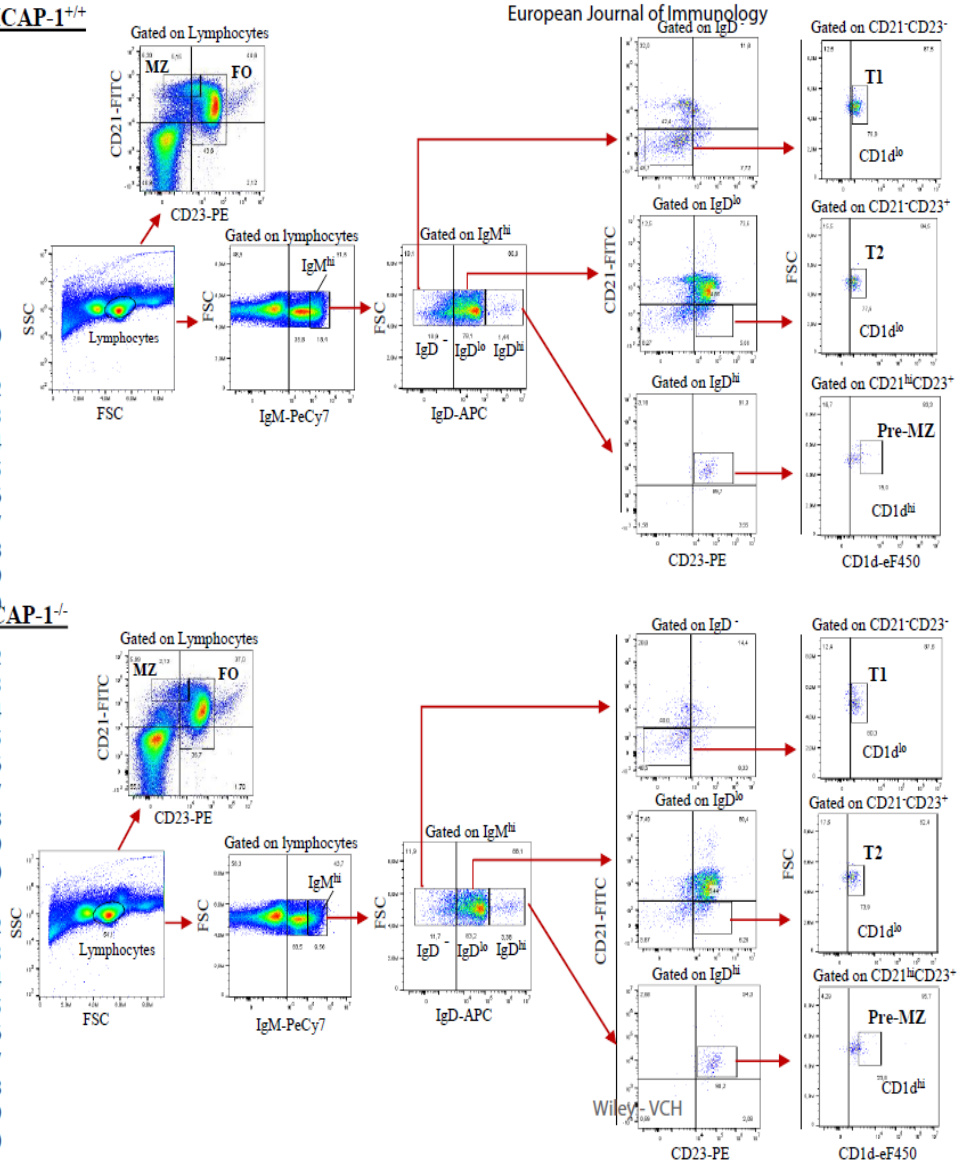


Fig. S1. Gating strategy for identification of spleen B cell subsets. Shown are representative flow cytometry results for identification of the T1, T2, pre-MZ, MZ and FO spleen B cell subpopulations from ICAP-$1^{+/+}$ (n=5) and ICAP-$1^{-/-}$ (n=4) mice.

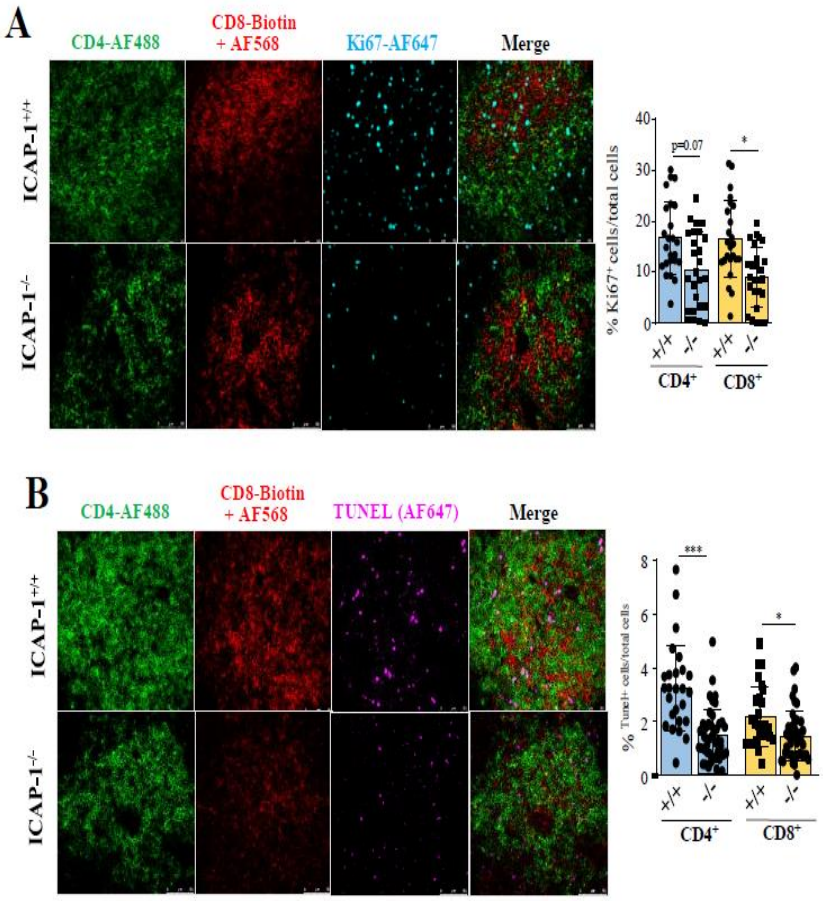


Fig. S2. Spleen T cell proliferation and apoptosis in the absence of ICAP-1. $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells from frozen spleen tissue sections of ICAP-$1^{+/+}$ and ICAP-$1^{-/-}$ mice were analyzed for Ki67 expression (A), or subjected to TUNEL assays (B). Left panels show representative images, and right panels display quantification of pooled data (n=4-5; 4-7 areas per section; unpaired t-test, ***$p<0.001$, *$p<0.05$, mean±s.d).

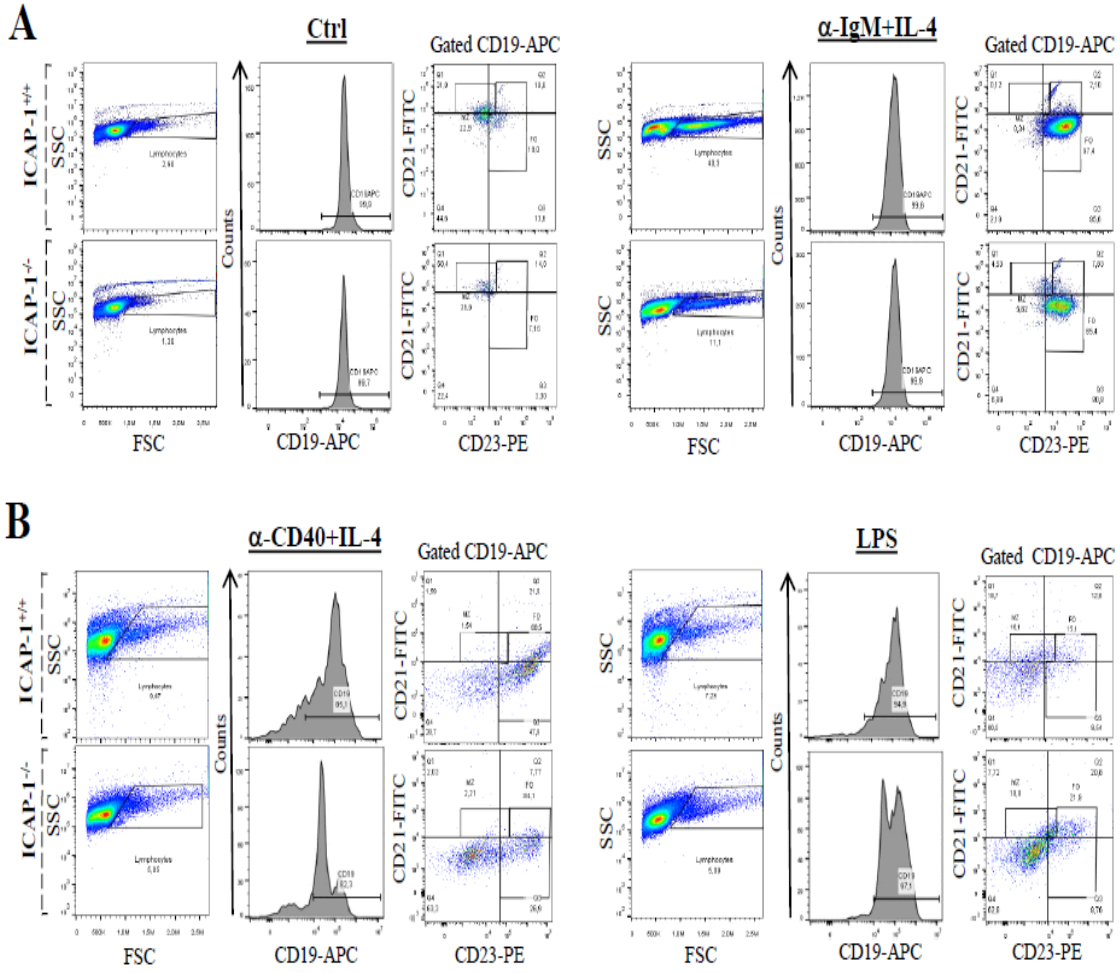


Fig. S3. ***In vitro*** **proliferative responses of spleen B cells lacking ICAP-1.** Gating strategy focusing on follicular ($CD21/35^{med}CD23^{+}$) and marginal zone ($CD21/35^{hi}CD23^{-}$) B cells from CTV-labelled $CD19^{+}$ cells incubated with anti-IgM/IL-4 (A; ICAP-$1^{+/+}$, n=5; ICAP-$1^{-/-}$, n=6), or with anti-CD40 plus IL-4 or LPS (B, left and right, respectively; ICAP-$1^{+/+}$, n=6; ICAP-$1^{-/-}$, n=4).

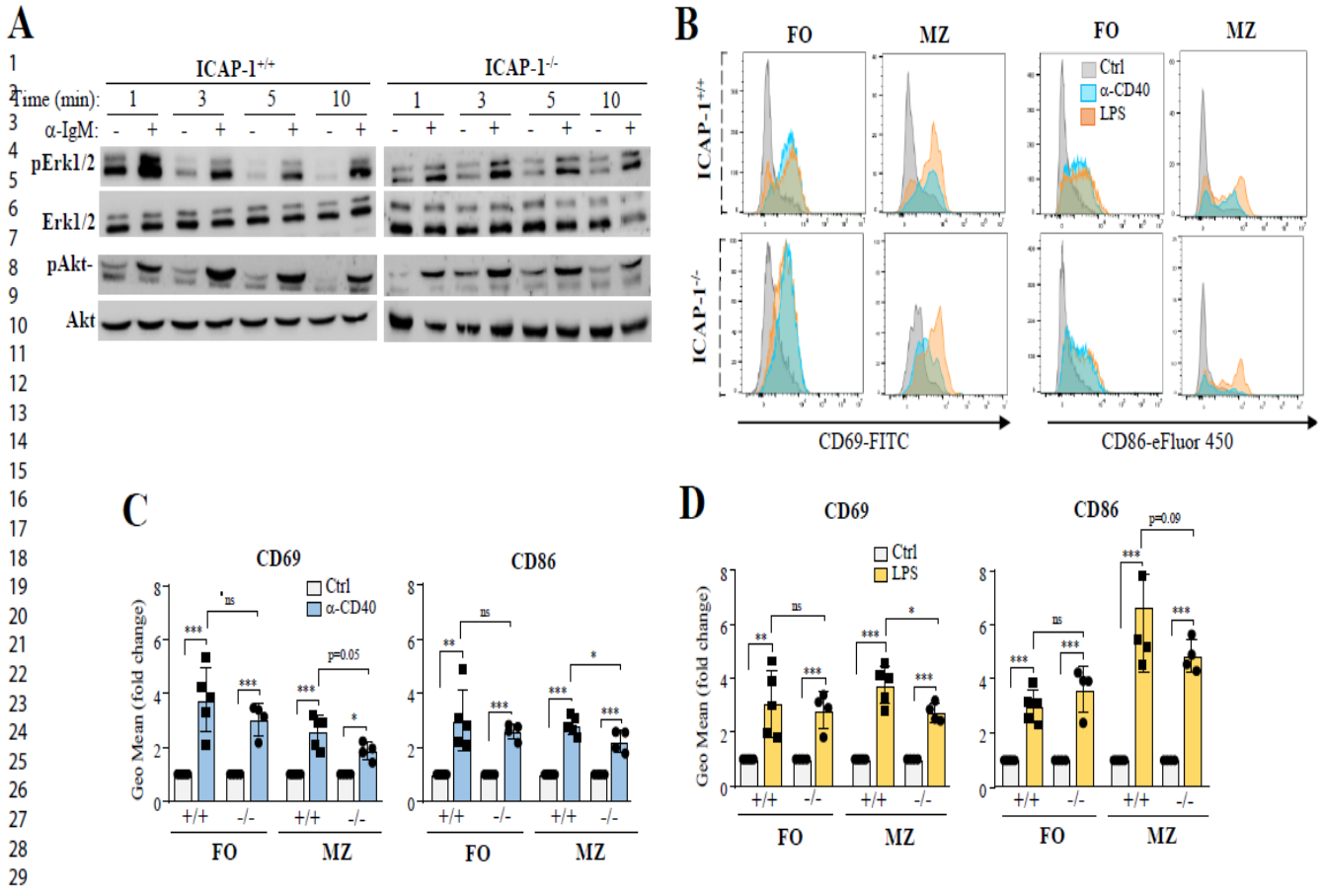


Fig. S4. Analysis of spleen B cell activation in ICAP-1-null mice. (A) Spleen CD19$^+$ B cells were purified by negative selection. Cells (3x10^6) were incubated for the indicated times in the absence or presence of goat anti-mouse IgM (10 µg/mL). Subsequently, control and stimulated B lymphocytes were lysed (Nonidet P-40 1%, NaCl 280 mM, Tris-HCl 40 mM pH 7.4, plus protease and phosphatase inhibitors). Lysates were centrifuged and supernatants tested by immunoblotting using antibodies to phospho-ERK1/2, total ERK1/2, phospho-Akt and total AKT. Representative results from ICAP-1$^{+/+}$ (n=3) and ICAP-1$^{-/-}$ (n=2) mice are displayed. (B-D) CD19$^+$ spleen B cells were incubated for 24 h with anti-CD40 antibodies or with LPS, and extent of expression of CD69 and CD86 in the FO and MZ B cell subsets was assessed by FACS. Representative histograms are shown in panel B. Data on panels C and D display pooled data from two independent experiments (n=4-5; unpaired t-test; $^{***}p<0.001$; $^{**}p<0.01$; $^{*}p<0.05$, mean±s.d).

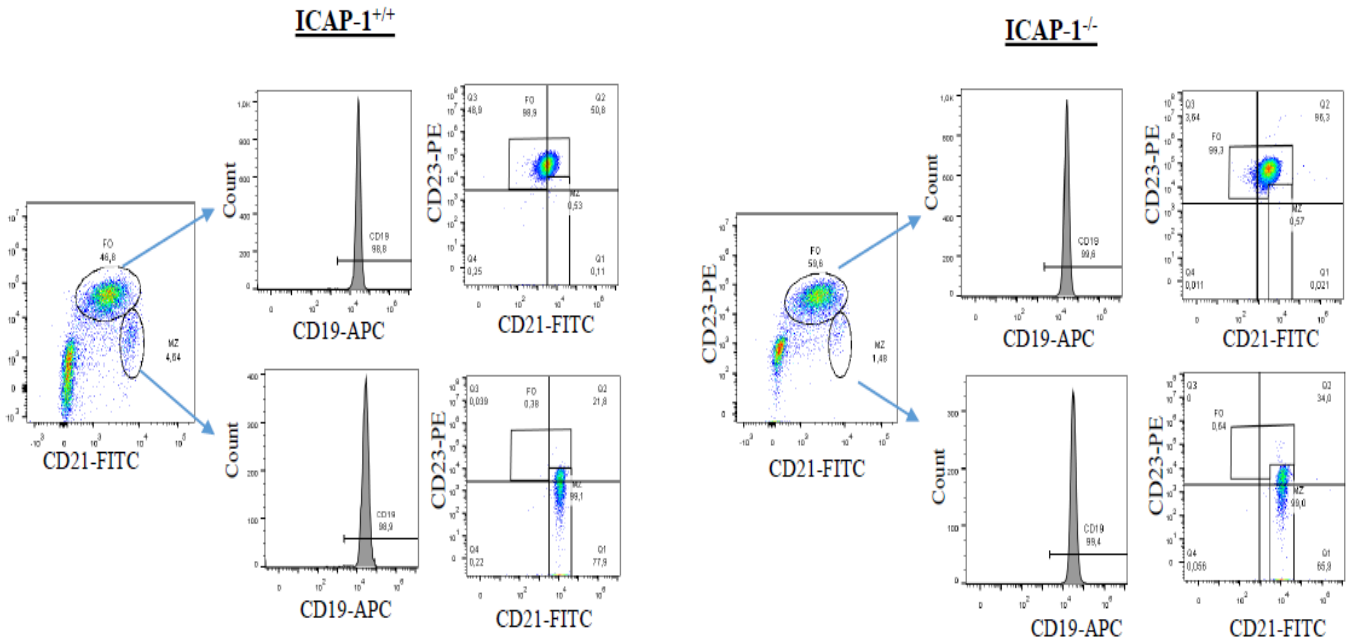


Fig. S5. Sorting of MZ and FO B cells from ICAP-1$^{+/+}$ and ICAP-1$^{-/-}$ mice. Splenocyte cell suspensions (30x10^6/mL) were incubated with FITC- and PE-conjugated anti-mouse CD21 and anti-mouse CD23, respectively, or with their respective isotype control antibodies prepared in sorting buffer (PBS, EDTA 1 mM, HEPES 25 mM pH 7.4, FBS 5%). Left panels show flow cytometry data from these incubations. Cells were filtered with 30 µm-pore membranes (CellTrics, Sysmex, Kobe, Japan) prior to separation in the sorter (FACSAria Fusion, Becton Dickinson). Sorting was carried out at 4°C under sterile conditions, and the isolated FO (CD21^{med}CD23^{+}) and MZ (CD21^{high} CD23^{-}) cells were collected in tubes filled with 2 mL of FBS, mixed by inversion to exclude electrostatic interactions, and centrifuged at 500 x *g* for 10-15 min. Isolated MZ (CD21^{high} CD23^{-} and FO (CD21^{med}CD23^{+}) cells (right panels) were analyzed for CD19 expression (middle panels). (ICAP-1$^{+/+}$, n=2; ICAP-1$^{-/-}$, n=2).

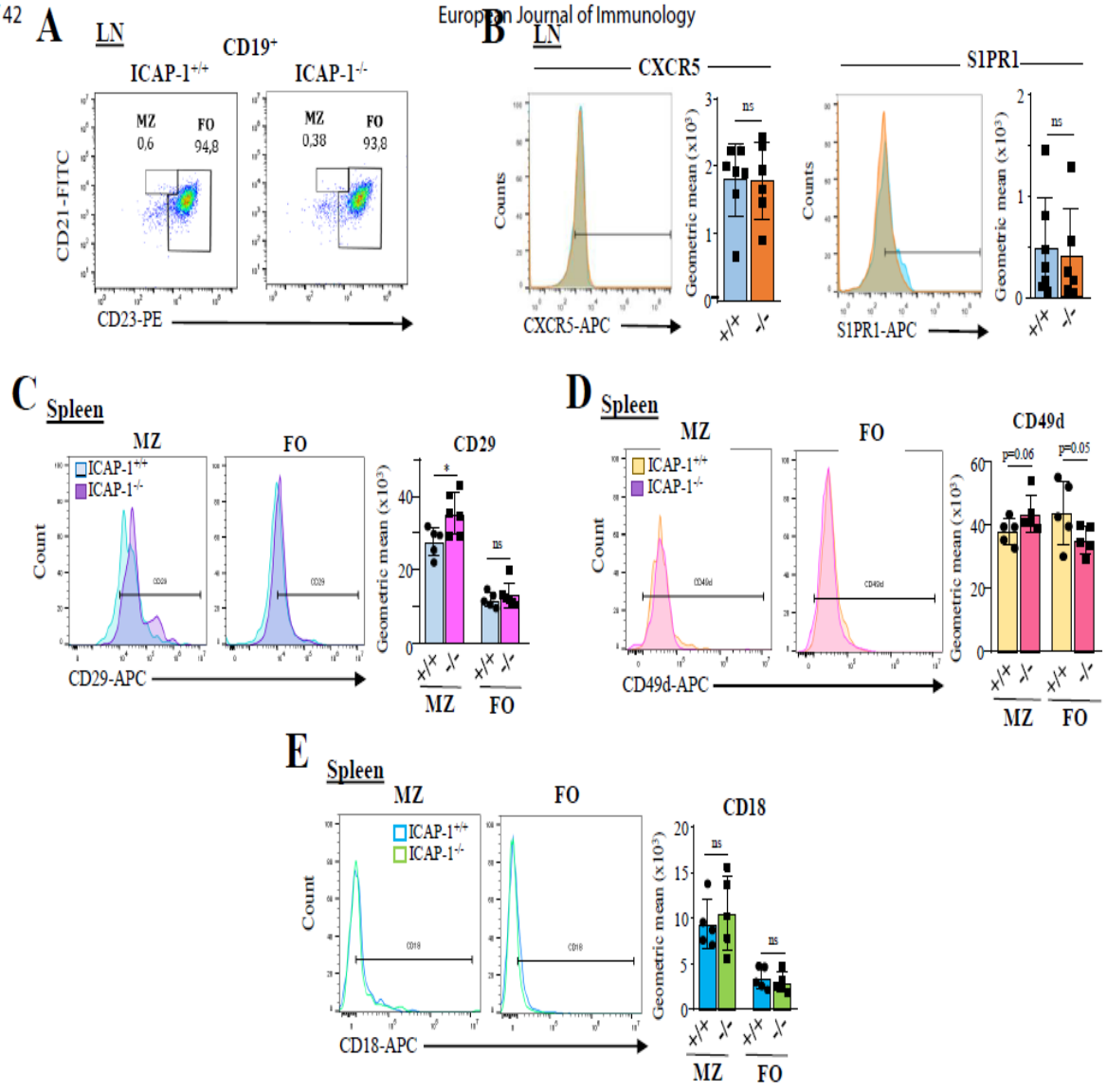


Fig. S6. Analysis of the expression of cell migration and adhesion molecules in spleen and LN B cells of ICAP-1-null mice. (A) Analysis by flow cytometry for the potential presence of MZ B cells in LNs of ICAP-1$^{-/-}$ mice. Shown are representative data from ICAP-1$^{+/+}$ (n=4) and ICAP-1$^{-/-}$ (n=4). (B, left panels) Representative FACS histograms showing expression of CXCR5 and S1PR1 on CD19^{+}-gated LN B cells. Right panels display pooled data from three independent experiments (n=6-7; unpaired t-test, mean±s.d). (C-E, left panels) Representative histograms of the expression of CD29, CD49d and CD18 on spleen MZ and FO B cells. Right panels show pooled data from two independent experiments (n=5-6; unpaired t-test, *p<0.05, mean±s.d).

Table S1. List of antibodies used for flow cytometry

ANTIBODY (Clone)	PROVIDER	ANTIBODY (Clone)	PROVIDER
Rat anti-mouse/human CD1d (1B1), eFluor™ 450 conjugated	Thermo Fisher Scientific	Rat anti-mouse CD19 (1D3), APC conjugated	Thermo Fisher Scientific
Rat anti-mouse CD86 (B7-2)(GL-1), eFluor™ 450 conjugated	Thermo Fisher Scientific	Rat anti-mouse CD19 (eBio1D3(1D3)), AF700 conjugated	Thermo Fisher Scientific
Rat anti-mouse CD86 (GL-1), PE conjugated	BioLegend	Rat anti-mouse CD23 (B3B4), PE conjugated	BD Biosciences
Rat anti-mouse CD21/CD35 (7G6), FITC conjugated	BD Biosciences	Rat anti-mouse IgM (II/41), PE conjugated	Thermo Fisher Scientific
Rat anti-mouse CD40 (3/23), FITC conjugated	BD Biosciences	Rat anti-mouse CD185 (CXCR5)(L138D7), APC conjugated	BioLegend
Purified armenian hamster anti-mouse CD40 (HM40-3)	BioLegend	Armenian hamster anti-mouse/rat CD29 (HMβ1), APC conjugated	BioLegend
Mouse anti-mouse CD45.2 (104), FITC conjugated	BioLegend	Rat anti-mouse IgD (11-26c), APC conjugated	Thermo Fisher Scientific
Mouse anti-mouse CD45.1 (A20), APC conjugated	BioLegend	Rat anti-mouse IgD (11-26c), AF700 conjugated	Thermo Fisher Scientific
Armenian hamster anti-mouse CD69 (H1.2F3), FITC conjugated	BioLegend	Rat anti-mouse $S1P_1$/EDG-1 (218713), APC conjugated	R&D Systems
Armenian hamster anti-mouse CD69 (H1.2F3), APC conjugated	Thermo Fisher Scientific	Rat anti-mouse IgM (II-41), PE-Cy7 conjugated	Thermo Fisher Scientific
Armenian hamster anti-mouse CD69 (H1.2F3), PE-Cy7 conjugated	Thermo Fisher Scientific	Rat anti-mouse CD268 (BAFF-R) (7H22-E16), AF647 conjugated	BioLegend
Rat anti-mouse CD93 (AA4.1), FITC conjugated	Thermo Fisher Scientific	Rat anti-mouse/human CD45R/B220 (RA3-6B2), Biotin	BioLegend
Rat anti-mouse CD19 (1D3) , FITC conjugated	BD Biosciences	Rabbit anti-mouse NOTCH2 (D76A6)	Cell Signaling Technology
		Purified rat anti-mouse CD16/CD32 (2.4G2)	BD Biosciences

Table S2. List of antibodies used for immunofluorescence

ANTIBODY (Clone)	PROVIDER	ANTIBODY (Clone)	PROVIDER
Rat anti-mouse CD4 (RM4-5), AF488 conjugated	BD Biosciences	Goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody, AF647 conjugated	Molecular Probes
Rat anti-mouse CD19 (6OMP31), AF488 conjugated	Thermo Fisher Scientific	Goat anti-rat IgG (H+L) secondary antibody, AF647 conjugated	Molecular Probes
Purified rat anti-mouse CD19 (6OMP31)	Thermo Fisher Scientific	Goat anti-mouse IgM (H) secondary antibody, AF647 conjugated	Molecular Probes
Goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, AF488 conjugated	Molecular Probes	Purified rabbit anti-mouse/human Ki67 (SP6), recombinant	Abcam
Goat anti-rat IgG (H+L) secondary antibody, AF488 conjugated	Molecular Probes	Purified rabbit anti-mouse/human Lamin-B1 (polyclonal)	Abcam
Goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody, AF488 conjugated	Molecular Probes	Rat anti-mouse CD8a (53-6.7), biotin	Thermo Fisher Scientific

Table S3. Oligonucleotide sequences used for qRT-PCR assays

Target	Forward (5′-3′)	Reverse (5′-3′)
ICAP-1	GCGTTCCCGTGACAGGTCTA	GTTTCCAGGACTGGGTGCAG
Baffr (Tnfrsf13c)	CCCTGGTGGGTCTAGTGAGT	ACATTTTCCAGGGACTCTTGCT
Blnk	AAAAGCCTGTACCCTTGCCA	GAGCAGTTCAGCCTCCTGG
c-Myc	AGCCCGACTCCGACCTCTTG	GAGACACCGCCCACCACCAG
Deltex-1	CAATGGCAACAAGGATGGCA	GAGTGCGGGATGAGGTGAAA
Gpr174	ACATGGTAGTGGTTTGAAAACGG	TGACAGCCACTCCAATGAGG
Hes1	AAAATTCCTCCTCCCCGGT	ATGATAGGCTTTGATGACTTTCTG
Klf2	ACCAACTGCGGCAAGACCTA	CATCCTTCCCAGTTGCAATGA
Notch2	CCACCTGCCTGGATAAGATCG	CTGCCCGTTGTTCACACAC
Tbp	GGTATCTGCTGGCGGTTTGG	CCATGAAATAGTGATGCTGGGC
Zfp36l1	CTTCACGACACACCAGATCCTAGT	TGCTGTAGTTGAGCATCTTGTTACC

ANEXO II

Received: 4 July 2023 | Accepted: 7 July 2023

DOI: 10.1002/jha2.756

eJHaem

British Society for Haematology

RESEARCH ARTICLE

Regulation of miRNA expression by α4β1 integrin-dependent multiple myeloma cell adhesion

Yaiza Rodríguez-García[1,#] | Mónica Martínez-Moreno[1,#] | Lola Alonso[2] | Anna Sánchez-Vencells[1] | Alicia Arranz[1,†] | Roger Dagà-Millán[1] | Silvia Sevilla-Movilla[1] | Antonio Valeri[3] | Joaquin Martínez-López[3] | Joaquin Teixidó[1]

[1]Department of Molecular Biomedicine, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC), Madrid, Spain

[2]Genetic and Molecular Epidemiology Group, Spanish National Cancer Research Centre and CIBERONC, Madrid, Spain

[3]Department of Translational Hematology, CNIO-ISCIII, CIBERONC, Hospital Universitario 12 de Octubre, imas12, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Correspondence
Joaquin Teixidó, Department of Molecular Biomedicine, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC), Madrid, Spain.
Email: joaquint@cib.csic.es

[†]Deceased

Funding information
Ministerio de Ciencia e Innovación, Grant/Award Numbers: SAF2017-85146-R, PID2020-116291RB-I00; Fundación CRIS Contra el cancer

Abstract

The α4β1 integrin regulates the trafficking of multiple myeloma (MM) cells and contributes to MM disease progression. MicroRNAs (miRNAs) can have both tumor suppressor and oncogenic roles and thus are key controllers of tumor evolution, and have been associated with different phases of MM pathogenesis. Using small RNAseq analysis, we show here that α4β1-dependent MM cell adhesion regulates the expression of forty different miRNAs, therefore expanding our current view of the α4β1 involvement in MM cell biology. Specific upregulation of miR-324-5p and miR-331-3p in cells attached to α4β1 ligands was confirmed upon silencing the α4 integrin subunit, and their increased levels found to be dependent on Erk1/2- and PI3K-Akt-, but not Src-dependent signaling. Enhanced miR-324-5p expression upon α4β1-mediated MM cell adhesion aimed the hedgehog (Hh) component *SMO*, revealing that the miR-324-5p-*SMO* module represents a α4β1-regulated pathway that could control Hh-dependent cellular responses in myeloma. Our results open new therapy research avenues around the α4β1 contribution to MM progression that deserve to be investigated.

KEYWORDS
integrins, miRNA, multiple myeloma, signaling

1 | INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is the second most common hematological disease and remains incurable despite significant advances in therapeutic options, including autologous stem cell transplantation, chimeric antigen receptor T cell and monoclonal antibody therapies, and the use of proteasome inhibitors and immunomodulatory drugs [1–4]. MM is characterized by clonal expansion of antibody-producing malignant plasma cells in the bone marrow (BM), causing osteolytic bone lesions, hypercalcemia, anemia, and renal failure [1, 2, 5]. MM progresses from a premalignant asymptomatic step called monoclonal gammopathy of undetermined significance, which might evolve to a subsequent phase named smouldering myeloma phase that ends up in active MM [2, 6].

The communication of MM cells with their surrounding BM microenvironment depends on specific adhesion receptor-ligand interactions, and is critical for MM cell localization and survival [1, 7].

[#]Yaiza Rodríguez-García and Mónica Martínez-Moreno contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2023 The Authors. *eJHaem* published by British Society for Haematology and John Wiley & Sons Ltd.

Integrins are heterodimeric cell membrane proteins composed of non-covalently associated α and β subunits, which mediate cell adhesion [8]. The $\alpha4\beta1$ (also called VLA-4) integrin is a main adhesion receptor mediating MM cell attachment to its ligands fibronectin and VCAM-1 expressed in the BM [7, 9], which provides MM cell trafficking into and within the BM [10]. In vivo approaches early demonstrated the importance of $\alpha4\beta1$-mediated MM cell attachment for disease progression [11, 12], and the humanized anti-$\alpha4$ monoclonal antibody natalizumab was shown to decrease MM cell growth [13]. In addition, $\alpha4\beta1$ interaction with VCAM-1 and fibronectin promotes MM cell adhesion-mediated drug resistance [14–16]. Importantly, integrins do not only mediate cell attachment to a variety of extracellular matrix and cell surface ligands, but they also form hubs for activation of cellular signaling, including stimulation of the MAPK and PI3K-Akt pathways, a cellular response called outside-in signaling [17, 18].

The microRNAs (miRNAs) are posttranscriptional regulators of tumor progression [19–21]. Mature miRNAs are 20–30 nucleotide-long RNAs that by targeting mRNA transcripts keep the transcriptome under control. miRNAs base-pair to partially complementary motifs in target mRNAs, usually in the 3′ UTR, leading to translational repression or exonucleolytic mRNA decay. Reduced expression of several miRNAs in MM, including miR-15a and miR-16, suggests that they might act as tumor suppressors [22], whereas other miRNAs such as miR-21 and miR-221 are upregulated, reflecting an oncogenic role (oncomiRs) [23–25].

While miRNAs targeting integrin subunit expression have been extensively studied [26–28], little is known on miRNAs whose expression is regulated upon cell adhesion mediated by integrins. Using CS-1/fibronectin as a $\alpha4\beta1$ ligand, here we have explored the potential of $\alpha4\beta1$-mediated MM cell adhesion to transmit outside-in signals leading to altered expression of miRNAs.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Cells and reagents

The human MM cell line MM1.S was purchased from the American Type Culture Collection, whereas the NCI-H929 and U266 MM cell lines were gifts from Dr. Giovanna Roncador (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO, Madrid, Spain). The cells were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal bovine serum (Lonza). NCI-H929 and U266 cells were authenticated by short tandem repeat analysis at CNIO, and all cell lines were tested every 2 months for mycoplasma contamination. RNA from $CD138^+$-purified BM samples from MM patients at diagnosis was obtained after informed consent, and followed the guidelines from the Ethics committee of the Hospital 12 de Octubre (Madrid, Spain). The inhibitors triciribine, SCH772984 and saracatinib were purchased from Selleckchem (Munich, Germany). Anti-Erk1/2, phospho-Erk1/2, Akt, phospho-Akt (Ser473) and phospho-Src family antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA), and anti-c-Src antibody was from R&D Systems (Minneapolis, MN).

2.2 | Cell adhesion and viability

For cell adhesion, we used the fibronectin recombinant fragment FN-H89, which contains the CS-1 site and lacks the RGD central binding domain (CS-1/FN; 3.5 μg/ml). FN-H89 in 100 mM $NaHCO_3$ (pH 8.8) was coated in 96-well dishes (High-binding, Costar), as reported [29], followed by blocking all wells for 2 h at 37°C with 0.25% bovine serum albumin in the same solution. Cells (10^5/well in RPMI 1640 medium, no serum) were plated in triplicate on wells and incubated for 18 h. After three washes with RPMI 1640 medium, cells were stained with crystal violet and extent of adhesion quantified with a enzyme-linked immunosorbent assay reader. Adhesion results are shown relative to control transfectants or to nonspecifically BSA-bound cells (typically between 5000–8000/well). Cell viability was measured after the 18 h adhesion assays using the tetrazolium salt CCK-8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), as described [16].

2.3 | Flow cytometry and immunoblotting

Cells were stained for 30 min on ice with control or anti-$\alpha4$ ALC 1/63 mAb [10], followed by incubation with secondary antibodies. Analysis were performed with a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA), and data analyzed using CXP and FlowLogic software. Cell apoptosis was determined by flow cytometry using Annexin V FITC (Immunostep, Salamanca, Spain) and propidium iodide (Sigma-Aldrich). For immunoblotting, we followed the described procedure [16]. Briefly, proteins from solubilized cells were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to polyvinylidene fluoride membranes, and incubated with primary antibodies followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Proteins were visualized using Immobilon Western and a chemiluminiscence detector.

2.4 | Real-time quantitative PCR and siRNA and oligonucleotide transfection

Total RNA from MM cell adhesions was extracted using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). To analyze miRNA expression, we used the miRNA-specific Taqman MicroRNA Assay Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA). miRNA-enriched RNA was first reverse-transcribed with the Taqman microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), and quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed in triplicate with corresponding Taqman PCR primers (Applied Biosystems), and Taqman Universal Master Mix, according to manufacturer's instructions. The RNU44 small RNA was used for normalization. To analyze mRNA expression in MM cells by quantitative PCR we followed the described method [16], and the oligonucleotide sequences are listed in Table S1. Control and $\alpha4$ siRNAs were obtained from Sigma-Aldrich and nucleofected as we previously described [16]. After 24 h, extent of $\alpha4$ silencing was tested by flow cytometry. miRIDIAN miRNA Hairpin

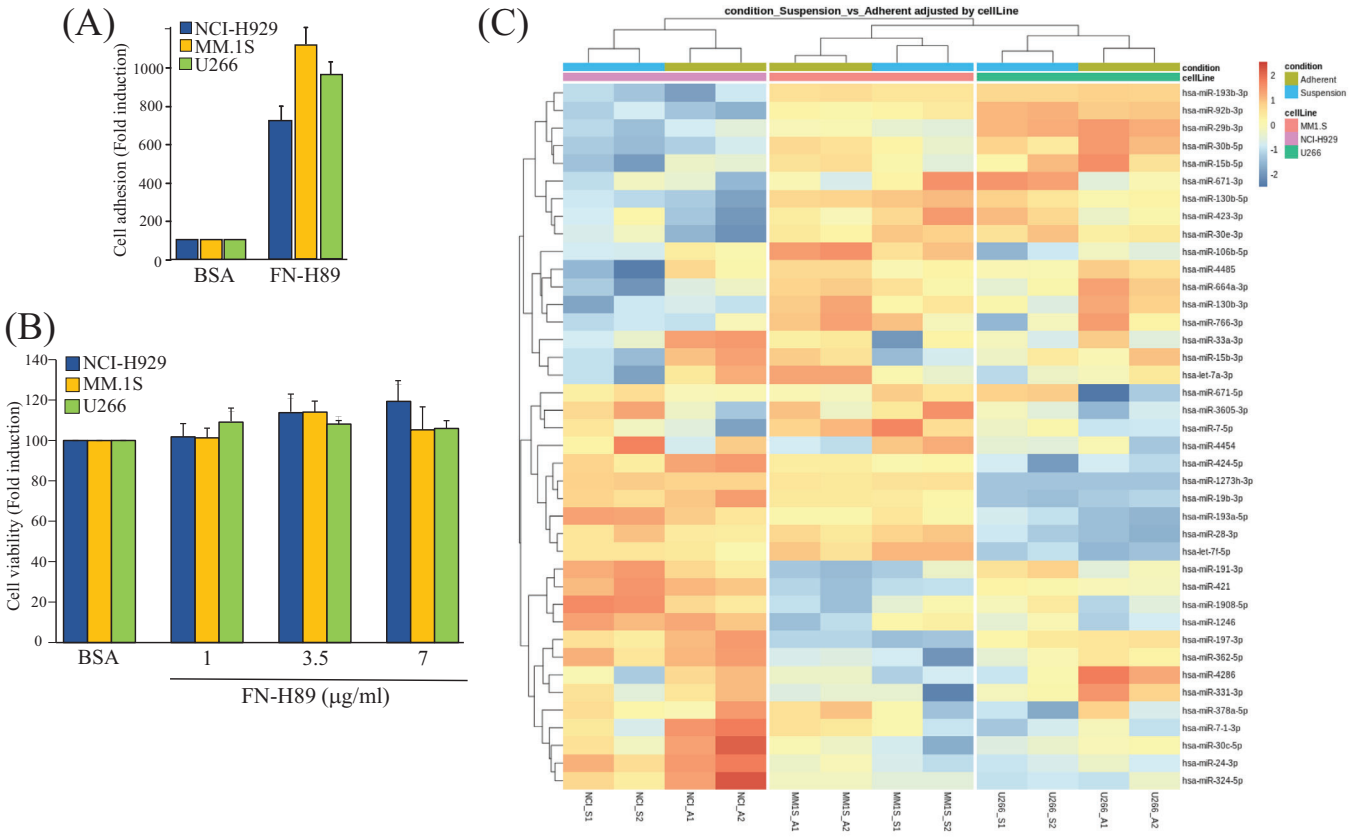


FIGURE 1 $\alpha 4\beta 1$-dependent upregulation of miRNA expression in multiple myeloma (MM) cells. (A) Cells were subjected to adhesion assays to FN-H89 (18 h), and extent of adhesion measured as indicated in the Methods ($n = 4$), or tested in cell viability experiments using the CCK8 reagent (B). (C) Heatmap of the $\log_{10}$ normalized counts of the 40 differentially-expressed miRNAs obtained at false discovery rate (FDR) 0.10 (Suspension/Adherent). A1 and A2, and S1 and S2 denote duplicates from adhered and suspension cells.

inhibitor for miR-324-5p and a Hairpin inhibitor negative control (40 nmol/L) (Dharmacon) were transfected by nucleofection (Amaxa, Cologne, Germany) into NCI-H929 cells, using kit V and program T-01.

2.5 | Small RNA-Seq and data analysis

RNA was extracted in duplicate from NCI-H929, MM1.S and U266 cells, either in suspension or attached to the $\alpha 4\beta 1$ ligand FN-H89 (total 12 samples), using the mirVana miRNA Isolation kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Small RNA sequencing was performed at the Genomics Unit of the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (Madrid), using Next Generation Sequencing (NGS, Illumina HiSeq 2500, Illumina, San Diego, CA). To prepare the sequencing data for analysis, 3′ adapters were removed from the sequencing reads using CutAdapt version 1.7.1, a widely used tool for adapter trimming (Martin M, 2011; https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200.). The subsequent analysis involved mapping the trimmed reads to known human mature miRNAs database (miRBase20) [30]. This database contains well-characterized and annotated miRNA sequences. The mapping process was performed using Bowtie version 1 [31] with specific parameters (-v 0 –tryhard -k 1 –best –norc), including a requirement for a 100% sequence identity match between the reads and the known miRNA mature sequences. Additionally, only one alignment per read was reported to ensure accurate mapping results and avoid multimapping reads. The output files from this mapping step were then converted into binary alignment map format, sorted, indexed, and counted using Samtools [32]. Differential expression analysis between samples was carried out using the DESeq2 R package [33]. For downstream analysis, miRNAs that showed no expression in any sample or were absent in at least four samples were excluded from further consideration. This filtering step ensured that only miRNAs with detectable expression levels across the dataset were included in the subsequent analysis. By removing these non-expressed or minimally represented miRNAs, the focus was directed towards those with potential biological relevance and sufficient evidence of expression in the samples under investigation. For the subsequent analysis, a multifactorial design was employed, incorporating the cell line as a factor in the model while testing the condition of interest, specifically the comparison between Suspension and Adherent conditions. This is to account for the potential influence of the cell line on the observed differences between the conditions. By including the cell line as a factor in the statistical model, any variation or effect associated with the cell line itself can be accounted for and

separated from the variation attributable to the condition being investigated (suspension vs. adherent). By accounting for the cell line as a factor, the statistical model can better estimate the true differences between the suspension and adherent conditions while minimizing the potential confounding effects of the cell line. Finally, to account for multiple testing, the p-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg correction. Differentially expressed miRNAs were identified based on a false discovery rate threshold of ≤0.10, indicating statistical significance, and they were subsequently selected with an absolute log_2FC greater than 0.5, and a minimum baseMean count of 65. This filtering step resulted in a total of 676 miRNAs out of 2578 mature sequences present in miRBase 20, that were selected for further analysis in the subsequent pipeline. The RNAseq data generated in this study is currently in progress to be deposited at the European Nucleotide Archive.

2.6 | Statistical analysis

Analyses were performed with GraphPad Prism 5 and 8. The data were analyzed using unpaired t-Student test (for two conditions). Results were considered significantly different when $p < 0.05$. The significant differences were represented as $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, and $^{*}p < 0.05$.

3 | RESULTS

The MM cell lines NCI-H929, MM1.S and U266 displayed strong and specific attachment to FN-H89, a recombinant $\alpha4\beta1$ ligand that encompasses the CS-1 region of fibronectin [29] (Figure 1A), and adhesion was specifically mediated by this integrin as it was blocked by the anti-$\alpha4$ ALC 1/63 mAb (not shown). Cell viability under the 18 h-adhesion assay conditions was not affected, as determined in CCK8 viability assays (Figure 1B).

Using the small RNAseq approach outlined in the Methods section, we conducted data analysis to identify differentially expressed (DE) miRNAs between cells attached to FN-H89, and those remaining in suspension. From this analysis, a total of 40 DE miRNAs were identified, with 42% showing upregulation and 57% displaying downregulation. Therefore, the statistical model used for this analysis incorporated the condition of interest, specifically Suspension versus Adherent, while also accounting for the cell line factor (Table 1; Figure 1C).

To refine the selection and focus on the most significant DE miRNAs, a filtering criterion was applied. Specifically, miRNAs with an absolute Log_2 fold change greater than 0.5 and a minimum baseMean (mean of the normalized counts across all samples for a specific miRNA) count of 65 were retained. Out of the initial 40 DE miRNAs, this filtering step resulted in the selection of fourteen miRNAs that exhibited substantial changes in expression (Table 1, marked with arrows). Notably,

TABLE 1 $\alpha4\beta1$-dependent, differentially-expressed miRNAs in multiple myeloma (MM) cells using condition_Suspension_vs_Adherent adjusted by cell line.

	baseMean	log_2FC	padj		baseMean	log_2FC	padj
hsa-let-7a-3p	15	−1.17	0.00776373	hsa-miR-30e-3p	994	0.26	0.03392761
hsa-let-7f-5p	54355	0.25	0.07974571	→hsa-miR-324-5p	68	−0.54	0.09917113
hsa-miR-106b-5p	835	−0.21	0.04361873	→hsa-miR-331-3p	134	−0.77	0.03284187
→hsa-miR-1246	114	0.71	0.01858221	hsa-miR-33a-3p	17	−1,00	0.03284187
hsa-miR-1273h-3p	52	0.64	0.06082913	hsa-miR-3605-3p	14	1.40	0.03322701
→hsa-miR-130b-3p	1291	−0.62	0.00495146	→hsa-miR-362-5p	126	−0.58	0.04361873
→hsa-miR-130b-5p	141	0.51	0.01467974	hsa-miR-378a-5p	44	−0.67	0.09789865
→hsa-miR-15b-3p	280	−0.56	0.00230029	hsa-miR-421	1024	0.32	0.05540024
hsa-miR-15b-5p	2029	−0.29	0.05609010	→hsa-miR-423-3p	5026	0.61	0.00044633
hsa-miR-1908-5p	23	0.94	0.00764918	→hsa-miR-424-5p	173	−1.07	0.01333190
→hsa-miR-191-3p	160	0.70	0.00046507	hsa-miR-4286	14	−1.20	0.01467974
hsa-miR-193a-5p	27	1.03	0.01858221	→hsa-miR-4454	571	0.62	0.09336752
→hsa-miR-193b-3p	304	−0.65	0.00764918	hsa-miR-4485	36	−2.52	0.00000029
hsa-miR-197-3p	1300	−0.45	0.02063071	→hsa-miR-664a-3p	76	−0.87	0.00087373
hsa-miR-19b-3p	2205	−0.35	0.07941021	hsa-miR-671-3p	463	0.33	0.05946799
hsa-miR-24-3p	373	−0.32	0.04361873	hsa-miR-671-5p	14	0.79	0.09158251
hsa-miR-28-3p	2724	0.31	0.03999384	hsa-miR-7-1-3p	51	−0.71	0.01858221
hsa-miR-29b-3p	257	−0.48	0.01145095	hsa-miR-7-5p	34	0.67	0.09917113
hsa-miR-30b-5p	2069	−0.25	0.03949914	→hsa-miR-766-3p	75	−0.96	0.03284187
hsa-miR-30c-5p	351	−0.38	0.02023448	hsa-miR-92b-3p	13120	0.40	0.01858221

Note: Arrows denote miRNAs with absolute Log_2FC > 0.5, and baseMean (reads) > 65 (see Methods).

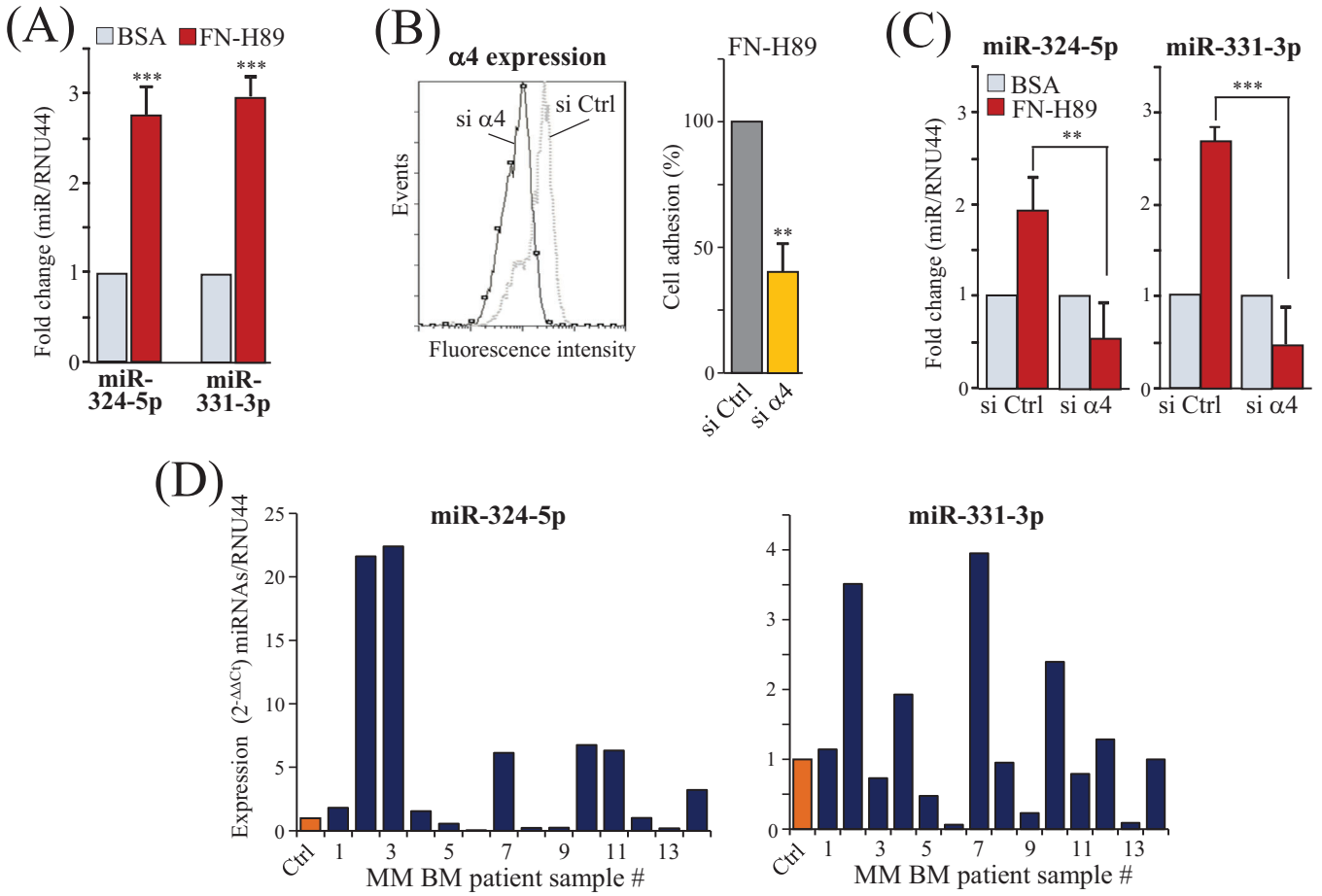


FIGURE 2 Specific increase in miR-324-5p and miR-331-3p expression upon $\alpha4\beta1$-mediated multiple myeloma (MM) cell adhesion. (A) NCI-H929 cells from the adhesion assays (18 h) were subjected to RT-qPCR analyses to determine the levels of the indicated miRNAs. Fold induction values are relative to wells with BSA ($n = 3$–4). NCI-H929 cells were transfected with control (Ctrl) or $\alpha4$ siRNA (si$\alpha4$), and $\alpha4$ expression analyzed by flow cytometry (B, left), and extent of transfectant adhesion evaluated after 18 h (B, right). (C) Expression levels of the indicated miRNAs in transfectants was analyzed by RT-qPCR ($n = 2$-3). (D) Expression of miR-324-5p and miR-331-3p was determined in RNA extracted from $CD138^+$-purified BM samples from MM patients. ($^{***}p < 0.001$; $^{**}p < 0.01$).

nine of the 14 miRNAs were downregulated, indicating an enhanced expression in $\alpha4\beta1$-mediated attached cells, suggesting that these miRNAs may play a role in the regulation of cellular processes associated with cell attachment mediated by $\alpha4\beta1$. Furthermore, it is noteworthy that several of the selected miRNAs, such as miR-193b-3p, miR-324-5p, miR-331-3p, and miR-424-5p have been previously implicated at various stages of MM progression [23, 34–36].

We then decided to focus on miR-324-5p and miR-331-3p as models for confirmation of their specific upregulation using NCI-H929 cells attached to FN-H89, as these miRNAs target the Hedgehog (Hh) signaling, a pathway that contributes to MM disease progression [37, 38]. We confirmed by qPCR the increased expression of these miRNAs (Figure 2A), and the specificity of their upregulation was validated upon silencing the $\alpha4$ subunit, which led to decreased MM cell adhesion to FN-H89 (Figure 2B), and to inhibition of the enhanced miRNA expression in attached MM cells (Figure 2C). Consistent with their reported expression in MM [35, 36], we found that six and four of 14 MM BM samples at diagnosis expressed miR-324-5p and miR-331-3p, respectively (43% and 29%) (Figure 2D). In addition, these miRNAs were co-expressed in three of these 14 samples.

As integrins contribute to activation of cellular signaling pathways in addition to mediate cell adhesion [18], we therefore analyzed pathways which could mediate the $\alpha4\beta1$-dependent enhanced miRNA expression. Thus, we exposed the MM cells to the AKT inhibitor (AKTi) triciribine, to the Erk1/2 inhibitor (ERKi) SCH772984 or to the Src inhibitor (SRCi) saracatinib during attachment to FN-H89. Notably, decrease in cell attachment by triciribine or SCH772984 (Figure 3A, left) correlated with inhibition of miR-324-5p and miR-331-3p expression relative to controls (Figure 3A, right). Instead, exposure to saracatinib did not significantly alter the MM cell adhesion to FN-H89 nor the expression of these miRNAs. Immunoblotting control experiments confirmed that the inhibitors specifically affected their corresponding signaling pathways (Figure 3B), and control flow cytometry assays revealed that cell viability and the expression of the integrin $\alpha4$ subunit were not significantly altered by the inhibitors (Figures 3C). These results unveil the involvement of the Erk1/2- and

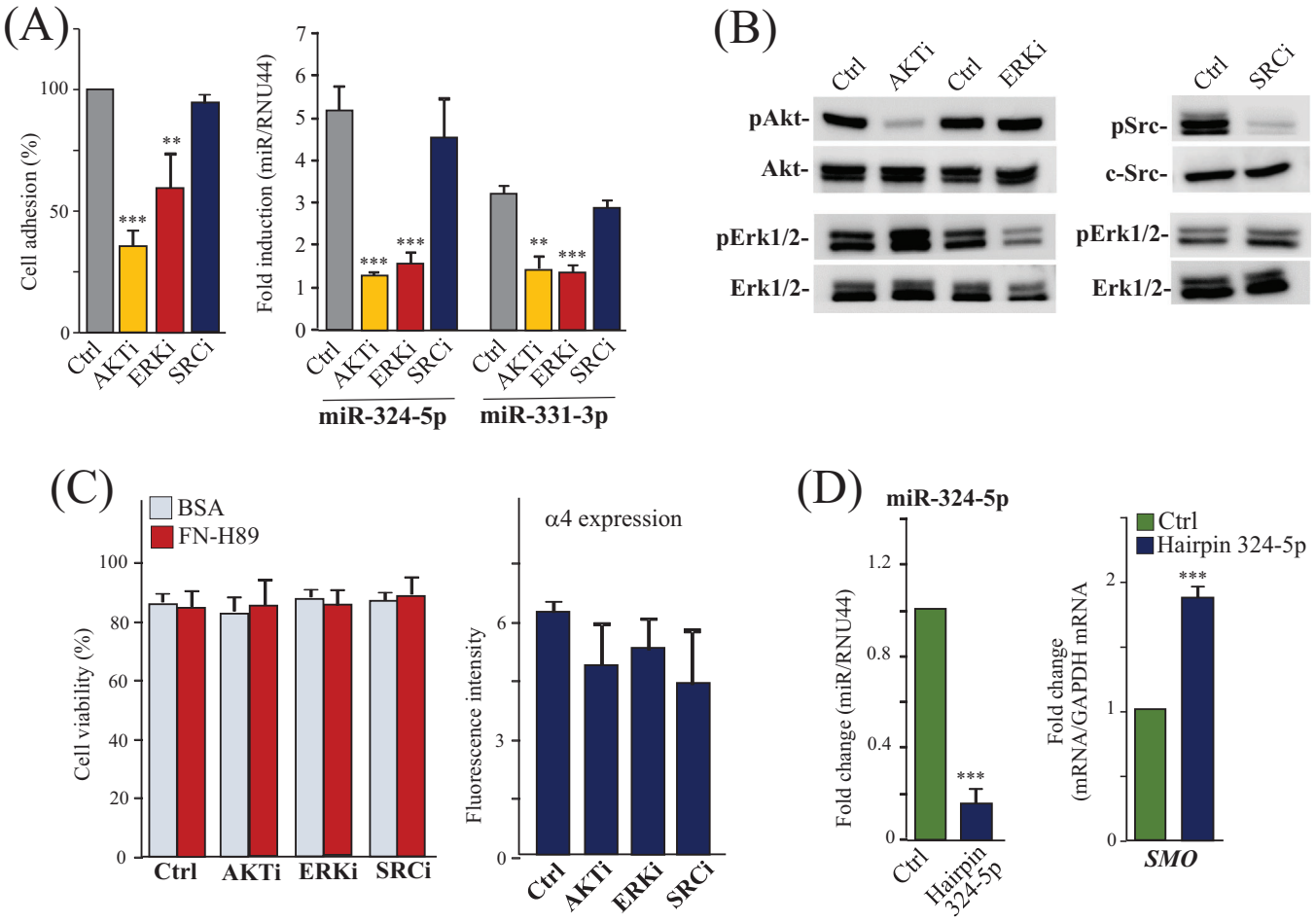


FIGURE 3 Cell signaling required in increased miRNA expression upon $\alpha4\beta1$-mediated multiple myeloma (MM) cell adhesion, and identification of the miR-324-5p-*SMO* module as a $\alpha4\beta1$-regulated pathway. (A, left) NCI-H929 cells were tested in adhesion assays to FN-H89 (18 h) in the absence (Ctrl) or presence of triciribine (AKTi; 1 μM), SCH772984 (ERKi; 1 μM) or saracatinib (SRCi; 0.5 μM), and expression of the indicated miRNAs on attached cells was analyzed by RT-qPCR (right) ($n = 3$). (B) Expression levels of the indicated signalling proteins in inhibitor-treated cells from adhesion assays was analyzed by immunoblotting. (C) Cell viability (left) and expression of the integrin $\alpha4$ subunit (right) were analyzed by flow cytometry ($n = 3$). (D) NCI-H929 cells were transfected with control or miRIDIAN hairpin 324–5p inhibitor, and miR-324-5p (left) and *SMO* expression in FN-H89-attached cells (right) determined by qPCR ($n = 2$-3) (***$p < 0.001$; **$p < 0.01$).

PI3K-Akt-dependent signaling pathways in the upregulation of miR-324-5p and miR-331-3p expression following MM cell adhesion mediated by $\alpha4\beta1$.

The Hh pathway component Smoothened (Smo) is a known target of miR-324-5p [36, 39]. We found that miR-324-5p silencing with miRIDIAN hairpin inhibitors (Figure 3D, left) led to enhanced *SMO* expression in adhered cells compared to control transfectants (Figure 3D, right), strongly suggesting that miR-324-5p limits *SMO* levels in $\alpha4\beta1$-mediated MM cell adhesion.

4 | DISCUSSION

The $\alpha4\beta1$ integrin plays key roles in MM cell adhesion and trafficking, and contributes to disease progression [7, 10–13]. Ligand-engaged integrins recruit intracellular and adaptor proteins which overall are capable of transmitting intracellular signals that can ultimately regulate gene expression [18]. We show here that $\alpha4\beta1$-mediated MM cell adhesion to fibronectin, a main component of the BM microenvironment, leads to regulation of miRNA expression. Our small RNAseq data identified forty miRNAs which are differentially expressed between cells attached to CS-1/FN and unattached cells. These miRNAs included several reportedly linked to distinct phases of the MM progression, such as miR-324-5p [36], miR-29b-3p [40, 41], miR-30b,c-5p [42, 43], miR-331-3p, miR-15b-5p, miR-191-3p and miR-106b-5p [23, 35], and miR-424-5p [23]. From the list of the forty differentially-expressed miRNA upon $\alpha4\beta1$-dependent MM cell adhesion, nine displayed upregulated expression, including miR-324-5p and miR-331-3p. These miRNAs were qPCR-confirmed to be specifically upregulated in cells attached to CS-1/FN, and their enhanced levels found to be dependent on Erk1/2 and PI3K-Akt signaling, which are well-known targets of integrin-mediated outside-in signaling [18].

Therefore, these results open new research avenues around the involvement of $\alpha4\beta1$ in MM cell biology and disease progression, from its adhesive function to the targets of its regulated miRNAs. The $\alpha4\beta1$-mediated regulation of miRNA expression reported here joins previous

observations of other adhesion molecules such as the integrins $\beta4$ and $\beta5$, which also control the levels of different miRNAs, such as miR-29a and miR-125b [44, 45].

The increased miR-324-5p expression following $\alpha4\beta1$-mediated MM cell adhesion aimed the Hh pathway component *SMO*, a well-known target of miR-324-5p [39]. These results reveal that the miR-324-5p-*SMO* module represents a $\alpha4\beta1$-regulated pathway that could control Hh-dependent cellular responses in multiple myeloma. Based on the reported $\alpha4\beta1$ contribution to MM cell growth [11, 12] and on the involvement of the Hh signaling in MM cell proliferation [37, 38], the reduction in *SMO* expression driven by miR-324-5p upon $\alpha4\beta1$-dependent adhesion suggests that $\alpha4\beta1$ contribution to MM cell growth would be independent of its negative regulation of *SMO* expression. The targets of miR-331-3p, miR-424-5p, and miR-193b-3p are important regulators of several key cellular processes. Thus, several reports concluded that miR-331-3p targets Erbb2 [46, 47], a protein that controls cellular signaling and activation, whereas miR-424-5p regulates E2F7 expression and cellular proliferation [48]. As for miR-193b-3p, it is considered to have a tumor suppressor role by targeting Myb and the MAPK pathway [49, 50]. Given the involvement of $\alpha4\beta1$ in different processes of MM cell biology, our results may lead to novel therapeutic scenarios that deserve to be investigated.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Joaquin Teixidó wrote the manuscript. Experimental design, data analysis and interpretation were performed by Yaiza Rodríguez-García, Mónica Martínez-Moreno, Lola Alonso, Alicia Arranz, Antonio Valeri, Joaquin Martínez-López and Joaquin Teixidó. Experimental performance was performed by Yaiza Rodríguez-García, Mónica Martínez-Moreno, Lola Alonso, Anna Sánchez-Vencells, Alicia Arranz, Roger Dagà-Millán and Silvia Sevilla-Movilla.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Nohemi Arellano-Sánchez for expert technical support, Haydeé Artaza for her contribution to analysis of RNAseq data, and Dr. Angeles García-Pardo for helpful discussions. This study was supported by grants SAF2017-85146-R and PID2020-116291RB-I00 from the Ministerio de Ciencia e Innovación to J.T. and by a grant from the Fundación CRIS Contra el cancer to J.M.L.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no financial interests.

FUNDING INFORMATION

The Ministerio de Ciencia e Innovación, Grant Numbers: SAF2017-85146-R and PID2020-116291RB-I00; The Fundación CRIS Contra el cancer

PATIENT CONSENT STATEMENT

BM samples from MM patients at diagnosis were obtained after informed consent and followed the guidelines from the Ethics committee of the Hospital 12 de Octubre (Madrid, Spain).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Joaquin Martínez-López https://orcid.org/0000-0001-5904-0902
Joaquin Teixidó https://orcid.org/0000-0002-3177-4151

REFERENCES

1. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. Nat Rev Cancer. 2007;7(8):585–98.
2. Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. J Clin Invest. 2012;122(10):3456–63.
3. Kumar SK, Anderson KC. Immune therapies in multiple myeloma. Clin Cancer Res. 2016;22(22):5453–60.
4. Hoyos V, Borrello I. The immunotherapy era of myeloma: monoclonal antibodies, vaccines, and adoptive T-cell therapies. Blood. 2016;128(13):1679–87.
5. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. Nat Rev Cancer. 2012;12(5):335–48.
6. van Nieuwenhuijzen N, Spaan I, Raymakers R, Peperzak V. From MGUS to multiple myeloma, a paradigm for clonal evolution of premalignant cells. Cancer Res. 2018;78(10):2449–56.
7. Ghobrial IM. Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. Blood. 2012;120(1):20–30.
8. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 2002;110(6):673–87.
9. Sanz-Rodriguez F, Ruiz-Velasco N, Pascual-Salcedo D, Teixido J. Characterization of VLA-4-dependent myeloma cell adhesion to fibronectin and VCAM-1. Br J Haematol. 1999;107(4):825–34.
10. Martinez-Moreno M, Leiva M, Aguilera-Montilla N, Sevilla-Movilla S, Isern de Val S, Arellano-Sanchez N, et al. In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by alpha4beta1 cytoplasmic-binding proteins. Leukemia. 2016;30(4):861–72.
11. Mori Y, Shimizu N, Dallas M, Niewolna M, Story B, Williams PJ, et al. Anti-alpha4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. Blood. 2004;104(7):2149–54.
12. Olson DL, Burkly LC, Leone DR, Dolinski BM, Lobb RR. Anti-alpha4 integrin monoclonal antibody inhibits multiple myeloma growth in a murine model. Mol Cancer Ther. 2005;4(1):91–9.
13. Podar K, Zimmerhackl A, Fulciniti M, Tonon G, Hainz U, Tai YT, et al. The selective adhesion molecule inhibitor Natalizumab decreases multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment: therapeutic implications. Br J Haematol. 2011;155(4):438–48.
14. Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. Blood. 1999;93(5):1658–67.
15. Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, et al. Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. Oncogene. 2009;28(2):231–42.
16. Sevilla-Movilla S, Arellano-Sánchez N, Martínez-Moreno M, Gajate C, Sánchez-Vencells A, Valcárcel LV, et al. Upregulated expression and function of the $\alpha4\beta1$ integrin in multiple myeloma cells resistant to bortezomib. J Pathol. 2020;252(1):29–40.
17. Ivaska J, Heino J. Cooperation between integrins and growth factor receptors in signaling and endocytosis. Annu Rev Cell Dev Biol. 2011;27:291–320.

18. Cooper J, Giancotti FG. Integrin signaling in cancer: mechanotransduction, stemness, epithelial plasticity, and therapeutic resistance. Cancer Cell. 2019;35(3):347–67.
19. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. Nat Rev Cancer. 2015;15(6):321–33.
20. Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. Nature. 2012;482(7385):347–55.
21. Bartel DP. Metazoan microRNAs. Cell. 2018;173(1):20–51.
22. Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, Leleu X, Azab AK, Azab F, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. Blood. 2009;113(26):6669–80.
23. Corthals SL, Sun SM, Kuiper R, de Knegt Y, Broyl A, van der Holt B, et al. MicroRNA signatures characterize multiple myeloma patients. Leukemia. 2011;25(11):1784–9.
24. Gutierrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, Delgado M, De Las Rivas J, Ticona FV, et al. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. Leukemia. 2010;24(3):629–37.
25. Leone E, Morelli E, Di Martino MT, Amodio N, Foresta U, Gullà A, et al. Targeting miR-21 inhibits in vitro and in vivo multiple myeloma cell growth. Clin Cancer Res. 2013;19(8):2096–106.
26. Li D, She J, Hu X, Zhang M, Sun R, Qin S. The ELF3-regulated lncRNA UBE2CP3 is over-stabilized by RNA-RNA interactions and drives gastric cancer metastasis via miR-138-5p/ITGA2 axis. Oncogene. 2021;40(35):5403–15.
27. Ohyagi-Hara C, Sawada K, Kamiura S, Tomita Y, Isobe A, Hashimoto K, et al. miR-92a inhibits peritoneal dissemination of ovarian cancer cells by inhibiting integrin α5 expression. Am J Pathol. 2013;182(5):1876–89.
28. Li G, Luna C, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P. Targeting of integrin beta1 and kinesin 2alpha by microRNA 183. J Biol Chem. 2010;285(8):5461–71.
29. Wright N, de Lera TL, Garcia-Moruja C, Lillo R, Garcia-Sanchez F, Caruz A, et al. Transforming growth factor-beta1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. Blood. 2003;102(6):1978–84.
30. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Nucleic Acids Res. 2011;39(Database issue):D152–7.
31. Langmead B. Aligning short sequencing reads with Bowtie. Curr Protoc Bioinformatics. 2010;Chapter 11:Unit 11 7.
32. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinformatics. 2009;25(16):2078–9.
33. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 2014;15(12):550.
34. Unno K, Zhou Y, Zimmerman T, Platanias LC, Wickrema A. Identification of a novel microRNA cluster miR-193b-365 in multiple myeloma. Leuk Lymphoma. 2009;50(11):1865–71.
35. Zhou Y, Chen L, Barlogie B, Stephens O, Wu X, Williams DR, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. Proc Nat Acad Sci USA. 2010;107(17):7904–9.
36. Tang B, Xu A, Xu J, Huang H, Chen L, Su Y, et al. MicroRNA-324-5p regulates stemness, pathogenesis and sensitivity to bortezomib in multiple myeloma cells by targeting hedgehog signaling. Int J Cancer. 2018;142(1):109–20.
37. Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, et al. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. Proc Nat Acad Sci USA. 2007;104(10):4048–53.
38. Blotta S, Jakubikova J, Calimeri T, Roccaro AM, Amodio N, Azab AK, et al. Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. Blood. 2012;120(25):5002–13.
39. Ferretti E, De Smaele E, Miele E, Laneve P, Po A, Pelloni M, et al. Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. EMBO J. 2008;27(19):2616–27.
40. Jagannathan S, Vad N, Vallabhapurapu S, Vallabhapurapu S, Anderson KC, Driscoll JJ. MiR-29b replacement inhibits proteasomes and disrupts aggresome+autophagosome formation to enhance the antimyeloma benefit of bortezomib. Leukemia. 2015;29(3):727–38.
41. Amodio N, Stamato MA, Gulla AM, Morelli E, Romeo E, Raimondi L, et al. Therapeutic targeting of miR-29b/HDAC4 epigenetic loop in multiple myeloma. Mol Cancer Ther. 2016;15(6):1364–75.
42. Zhao JJ, Lin J, Zhu D, Wang X, Brooks D, Chen M, et al. miR-30-5p functions as a tumor suppressor and novel therapeutic tool by targeting the oncogenic Wnt/beta-catenin/BCL9 pathway. Cancer Res. 2014;74(6):1801–13.
43. Kassambara A, Jourdan M, Bruyer A, Robert N, Pantesco V, Elemento O, et al. Global miRNA expression analysis identifies novel key regulators of plasma cell differentiation and malignant plasma cell. Nucleic Acids Res. 2017;45(10):5639–52.
44. Yu X, Cohen DM, Chen CS. miR-125b is an adhesion-regulated microRNA that protects mesenchymal stem cells from anoikis. Stem Cells. 2012;30(5):956–64.
45. Gerson KD, Shearstone JR, Maddula V, Seligmann BE, Mercurio AM. Integrin β4 regulates SPARC protein to promote invasion. J Biol Chem. 2012;287(13):9835–44.
46. Epis MR, Giles KM, Barker A, Kendrick TS, Leedman PJ. miR-331-3p regulates ERBB-2 expression and androgen receptor signaling in prostate cancer. J Biol Chem. 2009;284(37):24696–704.
47. Liu XH, Sun M, Nie FQ, Ge YB, Zhang EB, Yin DD, et al. Lnc RNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer. Mol Cancer. 2014;13:92.
48. Zhao Y, Zhu C, Chang Q, Peng P, Yang J, Liu C, et al. MiR-424-5p regulates cell cycle and inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by targeting E2F7. PlosOne. 2020;15(11):e0242179.
49. Mets E, Van der Meulen J, Van Peer G, Boice M, Mestdagh P, Van de Walle I, et al. MicroRNA-193b-3p acts as a tumor suppressor by targeting the MYB oncogene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2015;29(4):798–806.
50. Bhayadia R, Krowiorz K, Haetscher N, Jammal R, Emmrich S, Obulkasim A, et al. Endogenous tumor suppressor microRNA-193b: therapeutic and prognostic value in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2018;36(10):1007–16.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Rodríguez-García Y, Martínez-Moreno M, Alonso L, Sánchez-Vencells A, Arranz A, Dagà-Millán R, et al. Regulation of miRNA expression by α4β1 integrin-dependent multiple myeloma cell adhesion. eJHaem. 2023;4:631–638. https://doi.org/10.1002/jha2.756

ANEXO III

Check for updates

European Journal of Immunology

Immunity to infection

Basic

Research Article

ICAP-1 loss impairs CD8$^+$ thymocyte development and leads to reduced marginal zone B cells in mice

Silvia Sevilla-Movilla[#1], Patricia Fuentes[#2], Yaiza Rodríguez-García[#1], Nohemi Arellano-Sánchez[1], Peter W. Krenn[3,4], Soledad Isern de Val[1], Sara Montero-Herradón[5,6], Javier García-Ceca[5,6], Valeria Burdiel-Herencia[1], Sofía R. Gardeta[7], Noemí Aguilera-Montilla[1], Celia Barrio-Alonso[1,10], Georgiana Crainiciuc[10,11], Daniel Bouvard[8], Angeles García-Pardo[1], Agustin G. Zapata[5,6], Andrés Hidalgo[9,11], Reinhard Fässler[3], Yolanda R. Carrasco[7], Maria L. Toribio[2] and Joaquin Teixidó[1]

[1] Department of Molecular Biomedicine, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC), Madrid, Spain
[2] Development and Function of the Immune System Unit, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain
[3] Department of Molecular Medicine, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany
[4] Department of Biosciences and Medical Biology, Cancer Cluster Salzburg, Paris-Lodron University of Salzburg, Salzburg, Austria
[5] Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid
[6] Spain and Health Research Institute, Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, Spain
[7] Department on Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC, Madrid, Spain
[8] Centre de Recherche en Biologie Cellulaire de Montpellier, Montpellier, France
[9] Institute for Cardiovascular Prevention, Ludwig-Maximilians University, Munich, 80336, Germany
[10] Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain
[11] Area of Developmental and Cell Biology, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, Spain

ICAP-1 regulates β1-integrin activation and cell adhesion. Here, we used ICAP-1-null mice to study ICAP-1 potential involvement during immune cell development and function. Integrin α4β1-dependent adhesion was comparable between ICAP-1-null and control thymocytes, but lack of ICAP-1 caused a defective single-positive (SP) CD8$^+$ cell generation, thus, unveiling an ICAP-1 involvement in SP thymocyte development. ICAP-1 bears a nuclear localization signal and we found it displayed a strong nuclear distribution in thymocytes. Interestingly, there was a direct correlation between the lack of ICAP-1 and reduced levels in SP CD8$^+$ thymocytes of Runx3, a transcription factor required for CD8$^+$ thymocyte generation. In the spleen, ICAP-1 was found evenly distributed between cytoplasm and nuclear fractions, and ICAP-1$^{-/-}$ spleen T and B cells displayed upregulation of α4β1-mediated adhesion, indicating that ICAP-1 negatively controls their attachment. Furthermore, CD3$^+$- and CD19$^+$-selected spleen cells from ICAP-1-null mice showed reduced proliferation in response to T- and B-cell stimuli, respectively. Finally, loss of ICAP-1 caused a remarkable decrease in marginal zone B- cell frequencies and a moderate increase in follicular B cells. Together, these data unravel an ICAP-1 involvement in the generation of SP CD8$^+$ thymocytes and in the control of marginal zone B-cell numbers.

Keywords: B- cell maturation · cell adhesion · ICAP-1 · integrins · thymocyte development

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Correspondence: Joaquin Teixidó
e-mail: joaquint@cib.csic.es

[#]Silvia Sevilla-Movilla, Patricia Fuentes, and Yaiza Rodríguez-García contributed equally to this work.

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Integrins are heterodimeric cell membrane proteins composed of noncovalently associated α- and β-subunits which mediate cell adhesion [1]. The cytoplasmic domains of the β-subunits of integrins contain binding sites for proteins which regulate integrin activation and cell adhesion including talin, kindling, and ICAP-1 [2, 3]. Talin binds to membrane-proximal NPXY and kindlin to membrane-distal NPXY motifs in β-subunit cytoplasmic domains, causing an extension of the heterodimeric ectodomain from a bent inactive conformation, and leading to high-affinity, active integrins supporting cell adhesion [2, 4, 5].

The ICAP-1 large isoform, also known as ICAP-1α or ITGB1BP1, is ubiquitously expressed and contains a C-terminal phosphotyrosine-binding domain that interacts with a valine residue located at position-5 from the membrane-distal NPXY β1 motif [6–8]. ICAP-1 can interact with β1, but not with β2, β3, or β5 cytoplasmic regions [6, 7]. By competing with talin and kindlin for binding to β-subunit cytoplasmic regions, ICAP-1 can suppress integrin activation [9, 10]. ICAP-1 also contains an *N*-terminal nuclear localization signal (KKRH) enabling its nuclear translocation [11–13], suggesting that ICAP-1 might have integrin-dependent and -independent functions. Located downstream of this nuclear localization signal resides a motif susceptible of Ser and Thr phosphorylation, with potential to regulate integrin activation and ICAP-1 cellular distribution [12–14]. In addition to bind β1, ICAP-1 can also interact with KRIT1 (Krev interaction trapped-1; also known as CCM1), a protein containing three NPX(Y/F) motifs, of which the first one mediates interaction with ICAP-1 [15, 16]. KRIT binding to ICAP-1 blocks ICAP-1 interaction with β1, leading to upregulated integrin activation [12, 16, 17].

Characterization of ICAP-1-null mice revealed defective osteoblastic function and showed that ICAP-1-deficient osteoblasts harbor integrin receptors, with an active conformation leading to increased adhesion to fibronectin [18]. Furthermore, ICAP-1 was shown to play important roles in the development of the vascular system [17]. In addition, we recently reported that ICAP-1-silenced multiple myeloma cells display upregulated adhesion to the α4β1 integrin ligands VCAM-1 and the CS-1 region of fibronectin (CS-1/FN) [19].

Immune cells and BM HSPCs express several β1-class integrins [20], especially α4β1. This integrin mediates important interactions of HSPC and B cells with their ligands in the BM microenvironment [21, 22], is involved in cell trafficking to sites of inflammation, and contributes to lymphocyte migration to lymphoid tissues [23]. Given that ICAP-1 has the potential of competing with talin and kindlin for β1-integrin binding, thus, being able to regulate cell adhesion, and in light of its potential integrin-independent functions, we hypothesized that ICAP-1 might regulate the immune cell function. In the present work, we tested this hypothesis using ICAP-1-KO mice.

Results

Normal hematopoietic stem and progenitor cell content and unaltered B- lymphopoiesis in ICAP-1$^{-/-}$ mice

Confirming earlier results [18], ICAP-1$^{-/-}$ mice were smaller than control animals, which was especially evident among 3- to 5-week old littermates (Supporting information Fig. S1A). We did not find significant differences in cell numbers from BM samples relative to body weight of control and ICAP-1-null mice (Supporting information Fig. S1B). *ICAP-1* is expressed in BM hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) (Gene Expression Commons, http://gexc.stanford.edu, and GEO GSE77078) [24]. To study if ICAP-1 loss affects HSPC populations in BM, committed cells were first gated out from subsequent FACS analyses, thereby focusing on lineage negative cells harboring the Sca-1^{+}c-kit^{+} (LSK) markers. There were no remarkable differences in LSK cells between ICAP-1$^{+/+}$ and ICAP-1$^{-/-}$ mice (Fig. 1A, top left; and Supporting information Fig. S1C). Further analysis using the CD150 and CD48 markers showed no major changes in HSC/multipotent progenitor cell 1 (MPP1; LSK CD48^{-} CD150^{+}), MPP2 (LSK CD48^{+} CD150^{+}), or MPP3/4 (LSK CD48^{+} CD150^{-}) (Fig. 1A, top middle and right, and bottom panels). These results reveal that ICAP-1 does not contribute to the HSPC compartment at any stage of their differentiation program.

The frequency of B220^{+} BM B cells was also similar in control and ICAP-1$^{-/-}$ mice (Fig. 1B), and we found no significant alterations in cell numbers and proportions in the B220^{+}IgM^{-} and B220^{+}IgM^{+} fractions in ICAP-1-null mice (Fig. 1C; Supporting information Fig. S1D). Analysis of B-cell progenitors from the proB stage (CD19^{+}-gated), and based on B220/CD43 and B220/CD25 expression, revealed no differences in the proB and preB cell distribution, and we also found no remarkable changes in immature and recirculating mature B cells, according to IgM and IgD expression levels, respectively (Fig. 1C and D). These results suggest that ICAP-1 is dispensable (or redundant) for medullary B lymphopoiesis.

Defective CD8^{+} single-positive thymocyte development in ICAP-1-null mice

ICAP-1 expression was found in thymic cells, largely composed of thymocytes (Supporting information Fig. S1E, top). In agreement with a proportionate dwarfism, ICAP-1$^{-/-}$ thymi were smaller than those from control mice (Supporting information Fig. S1E, bottom), and displayed a reduced total cellularity, although no remarkable differences in cell numbers per body weight were observed between control and ICAP-1$^{-/-}$ thymi (Supporting information Fig. S1F).

Analysis of thymocytes at the CD4^{-}CD8^{-} double-negative (DN) developmental state revealed that the total numbers and proportions of DN cells were not significantly altered in ICAP-1-deficient mice (Fig. 2A and B; Supporting information Fig. S2A and B).

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

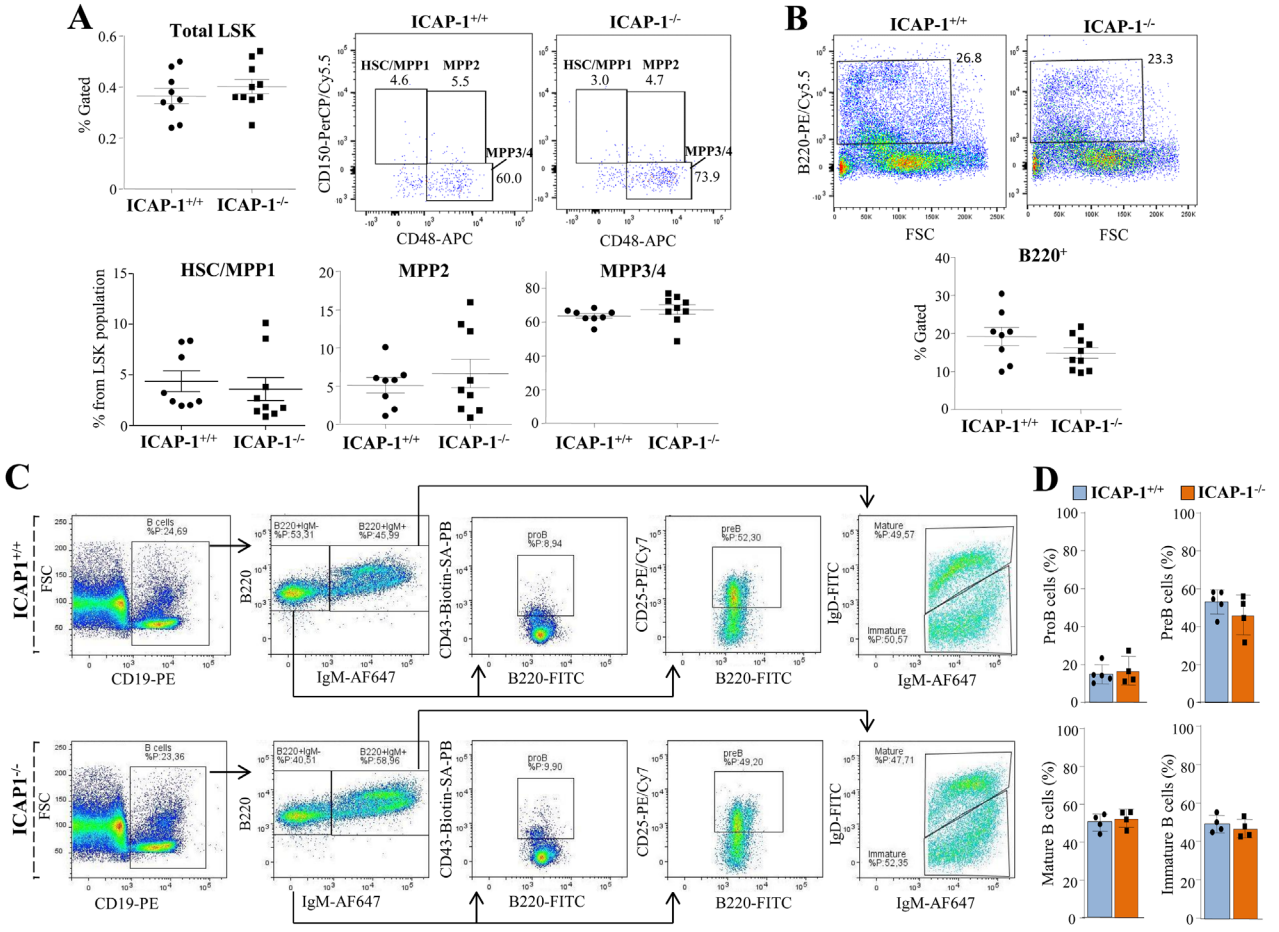


Figure 1. Analysis of BM cell populations in ICAP-1-null mice. (A) LSK cells (from total BM), and HSC/MMP1, MPP2 and MPP3/4 BM cell populations from ICAP-1$^{+/+}$ and ICAP-1$^{-/-}$ mice were analyzed by FACS. (B) Percentage of BM B220^{+} cells was assessed by FACS. (C) Gated CD19^{+} BM cells were subsequently gated on B220^{+} cells as indicated (either PE- or FITC-labelled depending on the posterior antibody mixtures), and analyzed for the expression of CD43 and CD25, and IgM and IgD. (D) Data quantification of the indicated B-cell populations in the BM of ICAP-1$^{+/+}$ and ICAP-1$^{-/-}$ mice. Panels A and B show representative dot plots and pooled data from three independent experiments. Panels C and D display representative dot plots and pooled data from two independent experiments.

Although, we found a small decrease in cell number and frequency of the DN1 (CD44^{+}CD25^{-}) thymocyte subset in ICAP-1$^{-/-}$ thymi relative to control ones, it did not reach statistical significance, whereas the proportions of the DN2 (CD44^{+}CD25^{+}), DN3 (CD44^{lo}CD25^{+}), and DN4 (CD44^{-}CD25^{-}) subsets were comparable to the controls (Supporting information Fig. S2C and D). These results indicate that lack of ICAP-1 does not substantially affect thymic T-cell development at the DN stage.

Reduced numbers of CD4^{+}CD8^{+} double-positive (DP), and CD4^{+} and CD8^{+} single-positive (SP) thymocytes were found in ICAP-1$^{-/-}$ mice, especially in 3- to 5-week- old animals (Fig. 2A; Supporting information Fig. S2A). However, the frequencies of DP and SP CD4^{+} cells were unaffected in ICAP-1-null thymi, whereas those from SP CD8^{+} thymocytes were significantly lower in ICAP-1$^{-/-}$ than in control thymi (Fig. 2B; Supporting information Fig. S2B), in spite that ICAP-1 is expressed at similar levels in DP and SP CD4^{+} and CD8^{+} thymocytes (Fig. 2C).

CD8^{+} SP thymocytes encompass both immature SP (ISP) TCRαβ^{-}CD8^{+} and mature SP TCRαβ^{+}CD8^{+} subpopulations during murine T-cell development [25]. Analysis of the impact of ICAP-1 deficiency on the distribution of both SP CD8^{+} subsets revealed a significant decrease in absolute numbers and frequencies of the mature SP subset in ICAP-1-null relative to control counterparts, whereas no alterations were detected in ICAP-1$^{-/-}$ ISP cell numbers, with this subset displaying a higher cell proportion than the control ISP subpopulation (Fig. 2D). These results reveal a deficient generation of mature SP TCRαβ^{+}CD8^{+} thymocytes in mice lacking ICAP-1.

Defective CD8^{+} SP cell development in ICAP-1$^{-/-}$ mice is thymocyte-autonomous

Isolated EpCAM^{+}CD45^{-} thymic epithelial cells (TECs) displayed low *Icap-1* levels (Supporting information Fig. S3A). The distribution of Ly51^{+}UEA1^{-} cortical (c) and Ly51^{-}UEA1^{+} medullary (m) subsets in EpCAM^{+}CD45^{-} TEC was analyzed by flow cytometry. Data showed a moderate increase in the frequency of cTECs

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

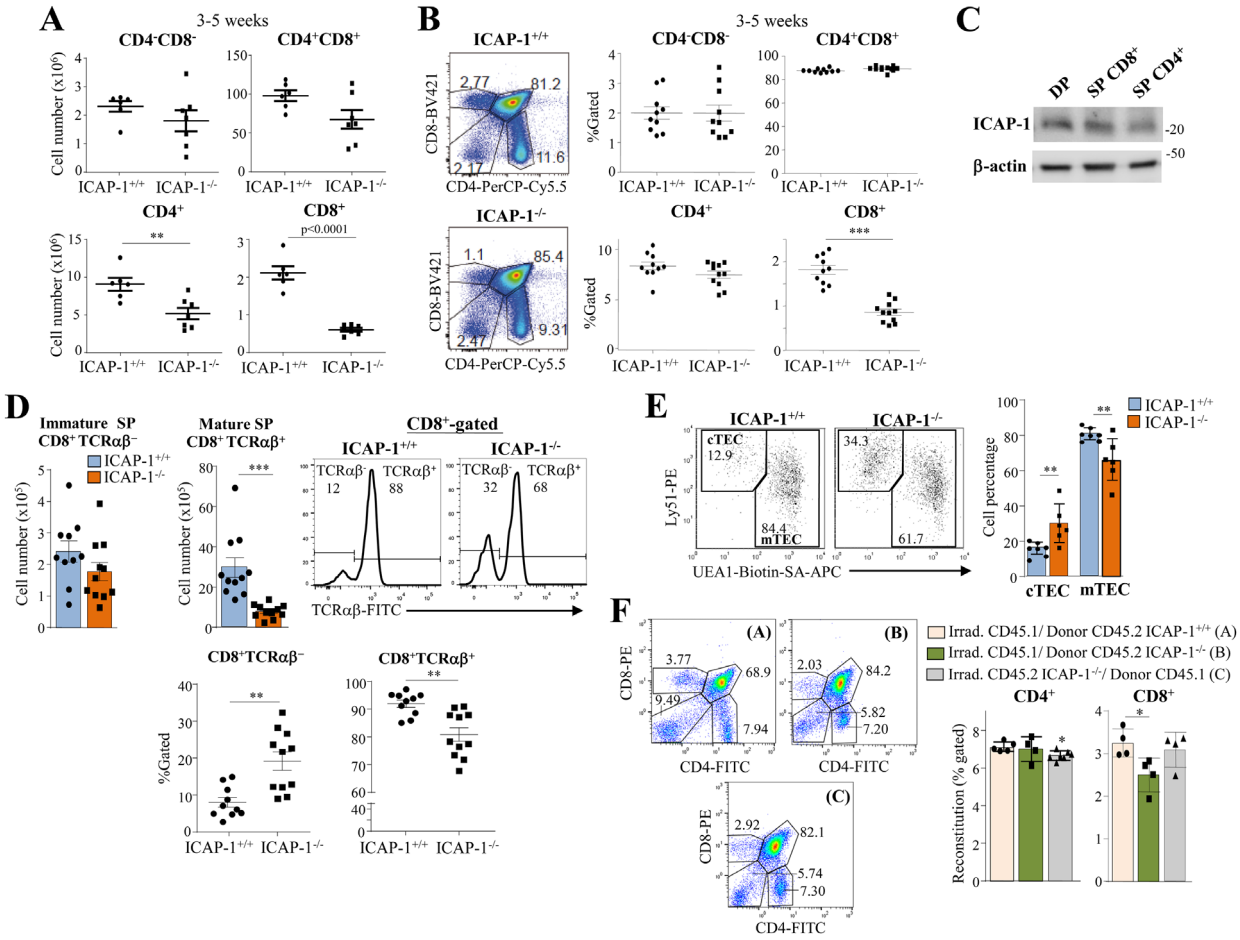


Figure 2. Defective SP CD8$^+$ thymocyte development in ICAP-1-null mice. Total numbers (A) and proportions (B) of the indicated thymocyte subsets in ICAP-1$^{+/+}$ and ICAP-1$^{-/-}$ mice were analyzed by flow cytometry. (C) Expression of ICAP-1 in the isolated thymocyte populations was analyzed by immunoblotting. Loading control was assessed with anti-β-actin antibodies. Shown is a representative result out of two independent experiments. (D) Cell numbers and frequencies of the indicated immature and mature SP CD8$^+$ thymocyte subpopulations were determined by flow cytometry. (E) Dot plots (left) and proportions (right) of EpCAM$^+$CD45$^-$-gated cTEC and mTEC subpopulations. (F) Thymi from the indicated chimeric mice were analyzed by FACS to assess percentages of SP CD4$^+$ and CD8$^+$ cells. A, B, D, and E show pooled data from at least three independent experiments. Representative dot plots and histograms are shown in panels B, D, E and F ($^{***}p < 0.001$; $^{**}p < 0.01$; $^{*}p < 0.05$).

linked to reduced proportions of mTECs in ICAP-1$^{-/-}$ thymi as compared with ICAP-1$^{+/+}$ counterparts (Fig. 2E), indicating that loss of ICAP-1 causes a partial defect of mTEC generation. Examination of ICAP-1$^{-/-}$ thymi sections revealed no major alterations in the distribution of DP cells in the PanCK$^+$ thymic cortex, or in the distribution of the SP CD4$^+$ and CD8$^+$ thymocytes in the medullary K5$^+$ area (Supporting information Fig. S3B).

To investigate whether the deficient SP CD8$^+$ cell development in ICAP-1$^{-/-}$ mice was thymocyte- or TEC-intrinsic, we first inoculated equal numbers of CD45.2$^+$ ICAP-1$^{+/+}$ and ICAP-1$^{-/-}$ BM cells into the same lethally irradiated CD45.1$^+$ B6.SJL hosts, allowing both cell types to develop in an identical environment. These experiments revealed that ICAP-1$^{-/-}$ BM cells are completely outcompeted by the ICAP-1$^{+/+}$ hematopoietic counterparts (data not shown), and therefore, we generated single BM chimeric mice. In line with the decreased proportion of SP CD8$^+$ thymocytes in ICAP-1$^{-/-}$ mice, lethally irradiated CD45.1$^+$ mice transplanted with BM from ICAP-1-null animals displayed a significant 20–25% reduction in thymus SP CD8$^+$ cells relative to the irradiated mice reconstituted with BM from ICAP-1$^{+/+}$ animals (Fig. 2F; Supporting information Fig. S3C and D). Instead, the proportion of thymic SP CD4$^+$ cells in the reconstituted mice did not change. When irradiated CD45.2$^+$ ICAP-1$^{-/-}$ mice were transplanted with BM from control CD45.1 animals, we did not detect alterations in CD8$^+$ SP frequencies compared to control irradiated animals, although a 5–8% decrease in SP CD4$^+$ cells was observed (Fig. 2F; Supporting information Fig. S3C and D). Together, these results indicate that the deficient SP CD8$^+$ cell development in ICAP-1-null mice is thymocyte-autonomous.

Role of ICAP-1 in SP CD8$^+$ thymocyte positive selection

To dissect the alterations causing the deficient SP CD8$^+$ cell generation in ICAP-1$^{-/-}$ mice, we first analyzed the expression of markers defining the multistep positive selection process [26, 27].

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

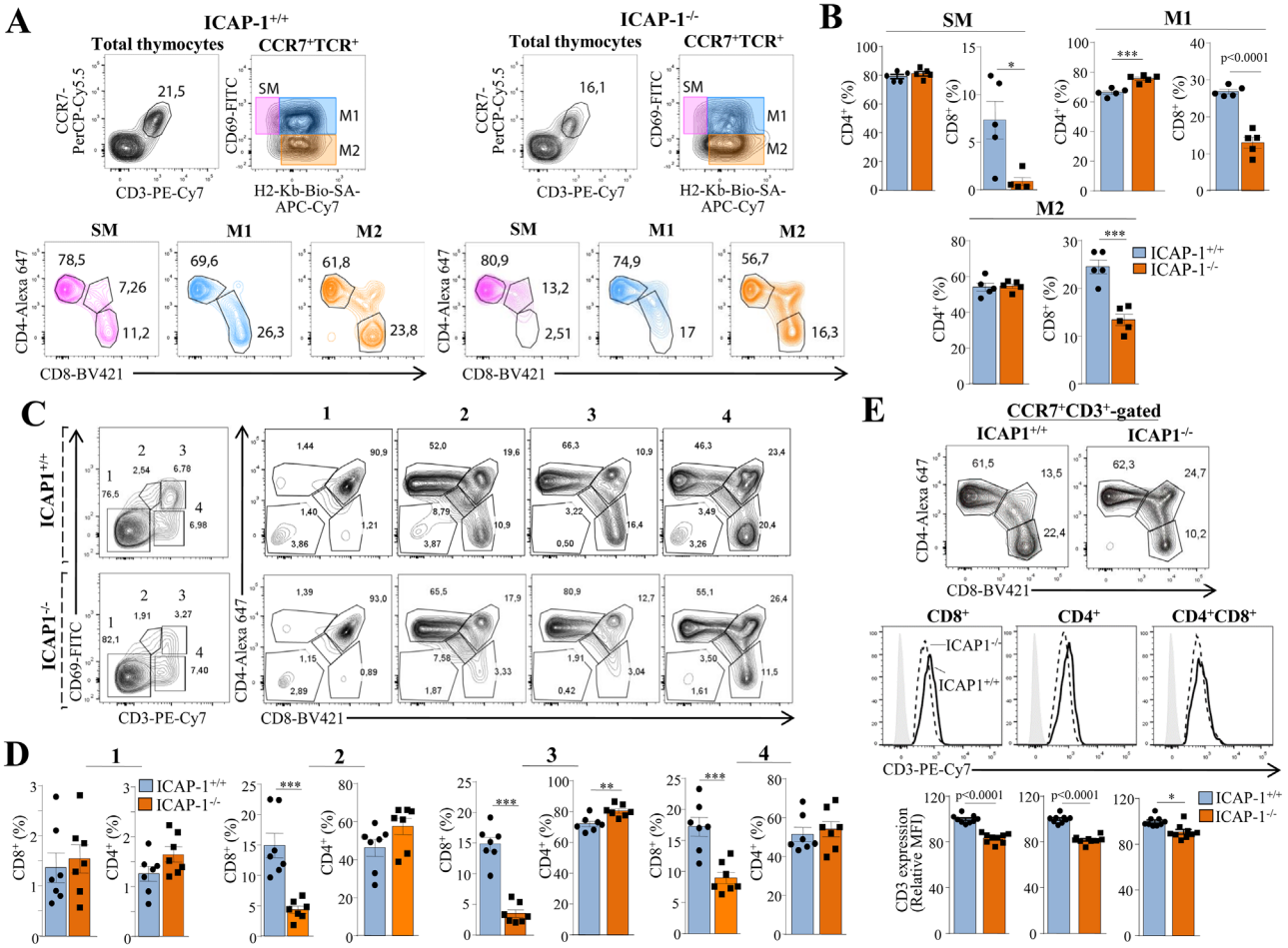


Figure 3. Role of ICAP-1 during SP CD8$^+$ thymocyte positive selection. Analysis of the multistep maturation stages encompassing positive selection. Cells were first gated on CCR7$^+$CD3$^+$, and the SM, M1 and M2 subpopulations were defined according to CD69 and H2-Kb expression. Each of these populations was subsequently analyzed for the CD4 and CD8 levels. A representative dot plot result is shown (A), and data quantification of CD4$^+$ and CD8$^+$ proportions in the SM, M1 and M2 subsets is displayed in (B). (C) Cells were gated on CD3 and CD69 to mark the fractions 1 to 4, and each fraction was analyzed for CD4 and CD8 expression. Representative dot plots are shown, and panel (D) displays quantification of the data of CD4$^+$ and CD8$^+$ frequencies in fractions 1 to 4. (E) Analysis of CD3 expression on SP CD4$^+$ and CD8$^+$ thymocytes from ICAP-1-null and control mice was assessed by flow cytometry. Panels B, D, and E (bottom) show pooled data from two to four independent experiments ($^{***}p < 0.001$; $^{**}p < 0.01$; $^{*}p < 0.05$).

As TCR signals mediating positive selection lead to upregulated expression of the chemokine receptor CCR7 in DP thymocytes [28–30], we first gated on CCR7$^+$TCR$^+$ positively selected thymocytes, and subsequently analyzed coexpression of CD69 and MHC class I molecules, as described in Ref. [27]. We found a slight increase in H2-Kb expression in CCR7$^+$TCR$^+$ thymocytes from ICAP-1-deficient mice, but it did not reach a statistical significance (not shown). CD69 and MHC class I expression was used to identify three distinct subsets of positively selected thymocytes at different maturation stages [27]. These subsets include (i) CD69$^+$MHCI$^-$ semimature (SM) cells which undergo apoptosis upon TCR engagement, (ii) CD69$^+$MHCI$^+$ mature 1 (M1) cells that are competent to proliferate, and (iii) CD69$^-$MHCI$^+$ mature 2 (M2) proliferating thymocytes, which express surface molecules allowing egress from thymus [26]. We next determined the proportions of SP CD4$^+$ and CD8$^+$ cells in the SM, M1, and M2 subsets (Fig. 3A), and quantification of the data revealed remarkable reductions of SP CD8$^+$ thymocyte frequencies in the SM, M1, and M2 subpopulations in ICAP-1-null mice, while no alterations were observed in the SP CD4$^+$ subsets (Fig. 3B), in line with a possible defective positive selection of SP CD8$^+$ thymocytes.

We further studied the positive selection process by analyzing the expression of CD69 and CD3 on thymocytes, as reported in Ref. [31]. In this analysis, fraction 1 corresponds to preselection DP thymocytes; fraction 2 represents a transitional population after TCR engagement; fraction 3 shows the CD69^{hi}CD3^{hi} post-positive selected cells, and fraction 4 displays the more mature thymocyte population. We observed a reduced frequency of the fraction 3 cells in ICAP-1-deficient thymocytes (Fig. 3C, left). Of note, there was a marked decrease in SP CD8$^+$ cell proportions in fractions 2, 3, and 4 from ICAP-1$^{-/-}$ mice compared to control counterparts, whereas minor increases in SP CD4$^+$ percentages were detected (Fig. 3C and D). Together, these results reveal that impaired maturation of SP CD8$^+$ thymocytes in ICAP-1-null mice

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

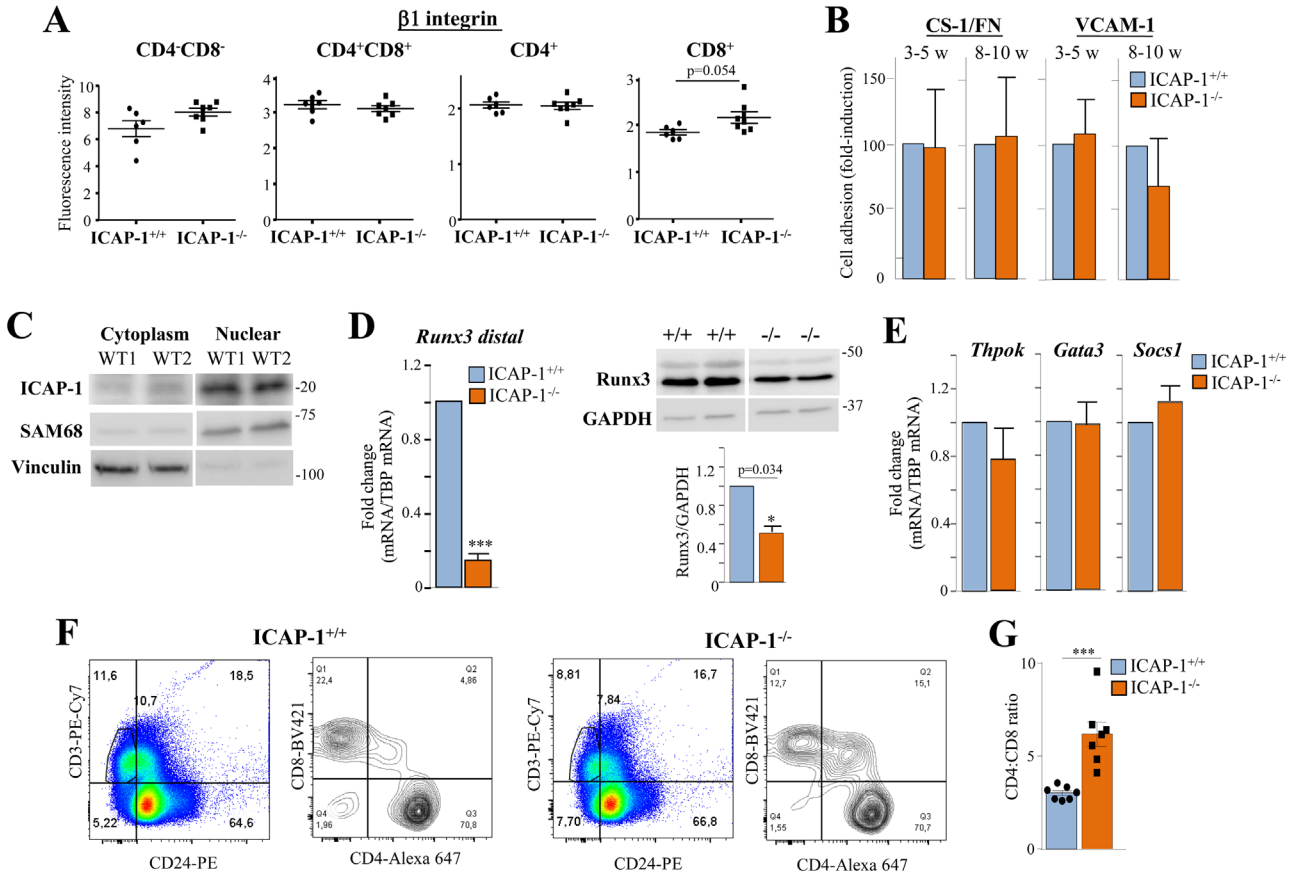


Figure 4. Unaltered adhesive properties and reduced Runx3 levels in thymocytes from ICAP-1$^{-/-}$ mice. (A) β1-integrin expression on the indicated thymocyte subpopulations of 3- to 5-week-old control and ICAP-1-null mice was analyzed by flow cytometry. Data display pooled data from three independent experiments. (B) Thymocytes were subjected to adhesion assays to CS-1/FN (n = 8) or to VCAM-1 (n = 5). (C) Thymic cells from 3- to 5-week-old WT mice were subjected to cell fractionation assays to enrich for cytoplasmic and nuclear fractions. SAM68 and vinculin were used as nuclear and cytoplasmic markers, respectively. Shown is a representative result out of three independent experiments. (D, left) Expression of *Runx3*d in isolated SP CD8$^+$ cells was determined by RT-PCR (n = 3). (Right) Thymic cells were tested by immunoblotting to assess Runx3 expression (n = 3). (E) Thymic cells were tested by qPCR for expression of the indicated transcription factors (n = 3–4). (F) CD3$^+$CD24$^-$-gated thymocytes were analyzed for CD4 and CD8 expression, and (G) the proportion of CD8$^+$ cells coexpressing CD4 from these analyses is shown as CD4:CD8 ratios. A representative dot plot result is shown in (F), and panel (G) displays pooled data from three independent experiments ($^{***}p < 0.001$).

is associated with alterations in the expression of developmental markers of positive selection. CD3 expression showed minor decreases on gated SP CD4$^+$ and CD8$^+$ (12–16%) and on DP (<9%) thymocytes from ICAP-1-null mice relative to their corresponding cell subsets in control mice (Fig. 3E).

Unaltered α4β1-dependent adhesion of ICAP-1$^{-/-}$ thymocytes

Lack of ICAP-1 did not remarkably affect β1-surface levels in different thymocyte subpopulations (Fig. 4A; Supporting information Fig. S4), and *Krit1* mRNA was barely detectable in thymus of control and ICAP-1$^{-/-}$ mice (not shown). The α4β1 integrin mediates thymocyte adhesion to the thymic epithelium [32, 33], although it has been demonstrated to be dispensable for thymic T-cell differentiation [34–36]. Adhesion assays using ICAP-1$^{+/+}$ and ICAP-1-deficient thymocytes (85–90% DP cells) revealed similar adhesion levels to CS-1/FN and VCAM-1, regardless of adhesion times (2–4 min, Fig. 4B; 20–30 min, not shown), suggesting that altered SP thymocyte development in ICAP-1-null mice occurs under normal α4β1-dependent thymocyte attachment.

Reduced Runx3 levels in ICAP-1-deficient CD8$^+$ SP thymocytes

In addition to binding β1 at the cell membrane, ICAP-1 bears a nuclear localization signal which mediates its export to the nucleus [11–13]. Remarkably, ICAP-1 displayed a strong nuclear distribution in thymic cells (Fig. 4C). As *Runx3* is a transcription factor required for SP CD8$^+$ thymocyte generation [37–40], we assessed its expression in isolated SP CD8$^+$ cells. *Runx3* transcription is regulated by two different promoter regions, P1 (also called distal) and P2 [41]. The *Runx3* exon 1 is transcribed from the distal promoter, which is exclusively expressed in SP CD8$^+$ cells [39].

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

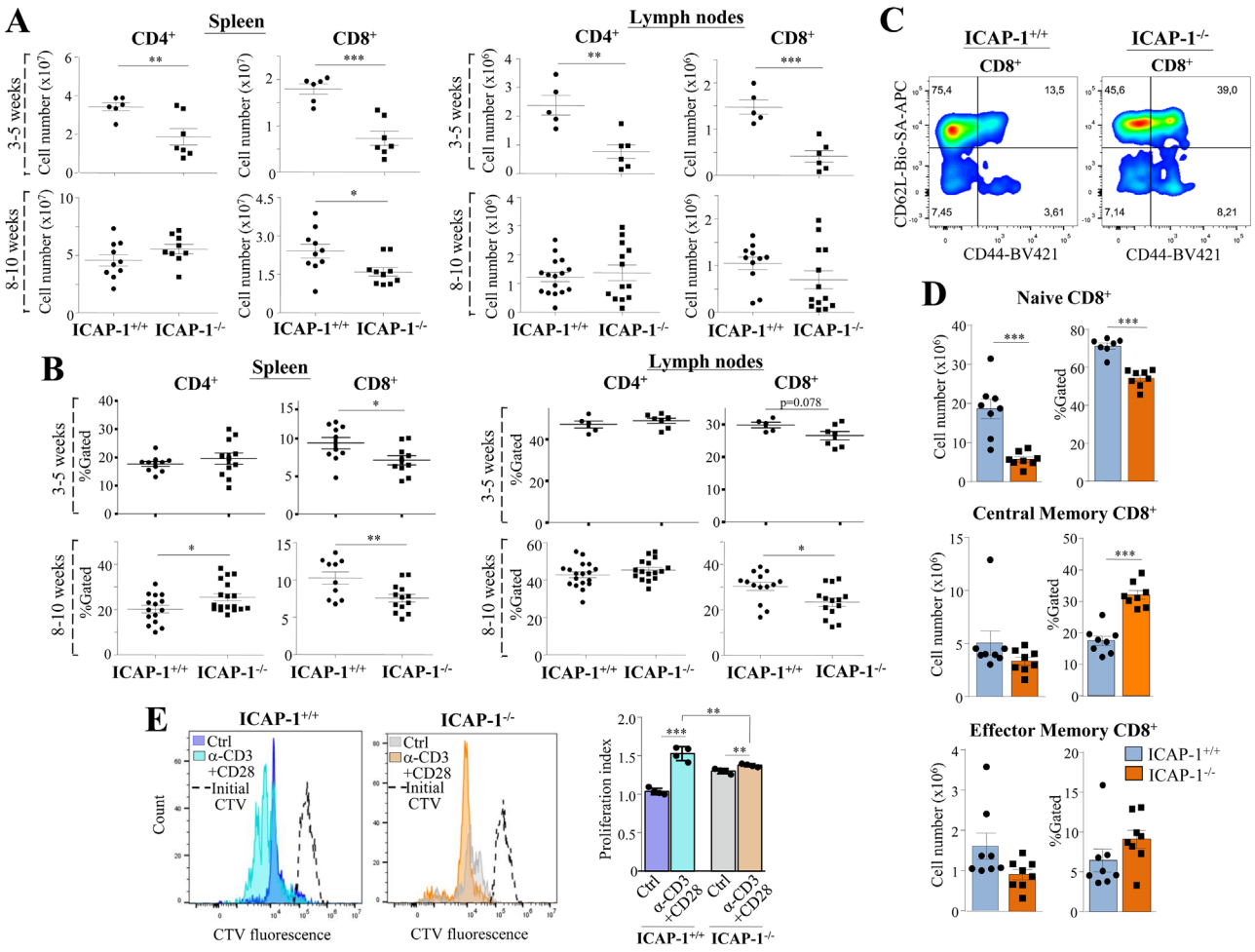


Figure 5. Analysis of peripheral T-cell distribution and function in ICAP-1-null mice. Cell numbers (A) and frequencies (B) of $CD4^+$ and $CD8^+$ cells in spleens and LNs from ICAP-$1^{+/+}$ and ICAP-$1^{-/-}$ mice. (C, D) Proportions of naïve and memory $CD8^+$ cells in control and ICAP-$1^{-/-}$ spleens were assessed by FACS using the CD62L and CD44 markers. A representative dot plot result is shown on (C), and quantification of data (D) displays pooled data from three independent experiments. (E) $CD3^+$-selected spleen T cells were labeled with CellTracer Violet and incubated in the absence (Ctrl) or presence of coimmobilized anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Cell division (left) and the associated proliferation indexes (right) were analyzed by flow cytometry. Shown are representative dot plots and pooled data from two independent experiments. ($^{***}p < 0.001$; $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$).

Of note, RT-PCR analyses using specific oligonucleotides to detect the *Runx3* distal (*Runx3*d) form revealed that *Runx3*d expression was markedly reduced in ICAP-1-null SP $CD8^+$ cells (Fig. 4D, left). Furthermore, we found decreased Runx3 protein levels in thymus cells (Fig. 4D, right). In contrast, expression of *Thpok*, *Gata3*, and *Socs1*, which are transcription factors controlling SP $CD4^+$ thymocyte production [42–44] was comparable between ICAP-$1^{-/-}$ and control cells (Fig. 4E).

Previous studies revealed that the development of DP thymocytes into SP $CD4^+$ and $CD8^+$ cells correlated with the loss of CD24 expression [45]. Furthermore, it has been demonstrated that Runx3-deficiency leads to CD4 expression in thymic mature SP $CD8^+$ T cells [40]. Interestingly, we found that decreased $CD8^+$ SP cell frequency in selected $CD3^+CD24^-$ subset from ICAP-1-null mice was associated with a threefold increase in the proportion of $CD8^+$ cells coexpressing CD4 (Fig. 4F and G). Together, these results raise the possibility that *Runx3* reduction might represent one of the mechanisms underlying the defective SP $CD8^+$ cell development in ICAP-$1^{-/-}$ mice.

Distribution and function of peripheral T cells in ICAP-1-null mice

Coincident with their smaller size, spleens from 3- to 5-week old ICAP-$1^{-/-}$ mice displayed decreased total cellularity, whereas cell numbers were similar in spleens from 8- to 10-week-old animals (Supporting information Fig. S5A and B). The $CD8^+$ cell numbers and proportions were lower in ICAP-1-null spleens and LNs than those in control mice (Fig. 5A and B; Supporting information Fig. S5C and D). $CD4^+$ cell numbers displayed a reduction only in 3- to 5-week old ICAP-1-deficient animals but not in older counterparts, but $CD4^+$ cell proportions did not change or moderately increased (Fig. 5A and B; Supporting information Fig. S5C and D).

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

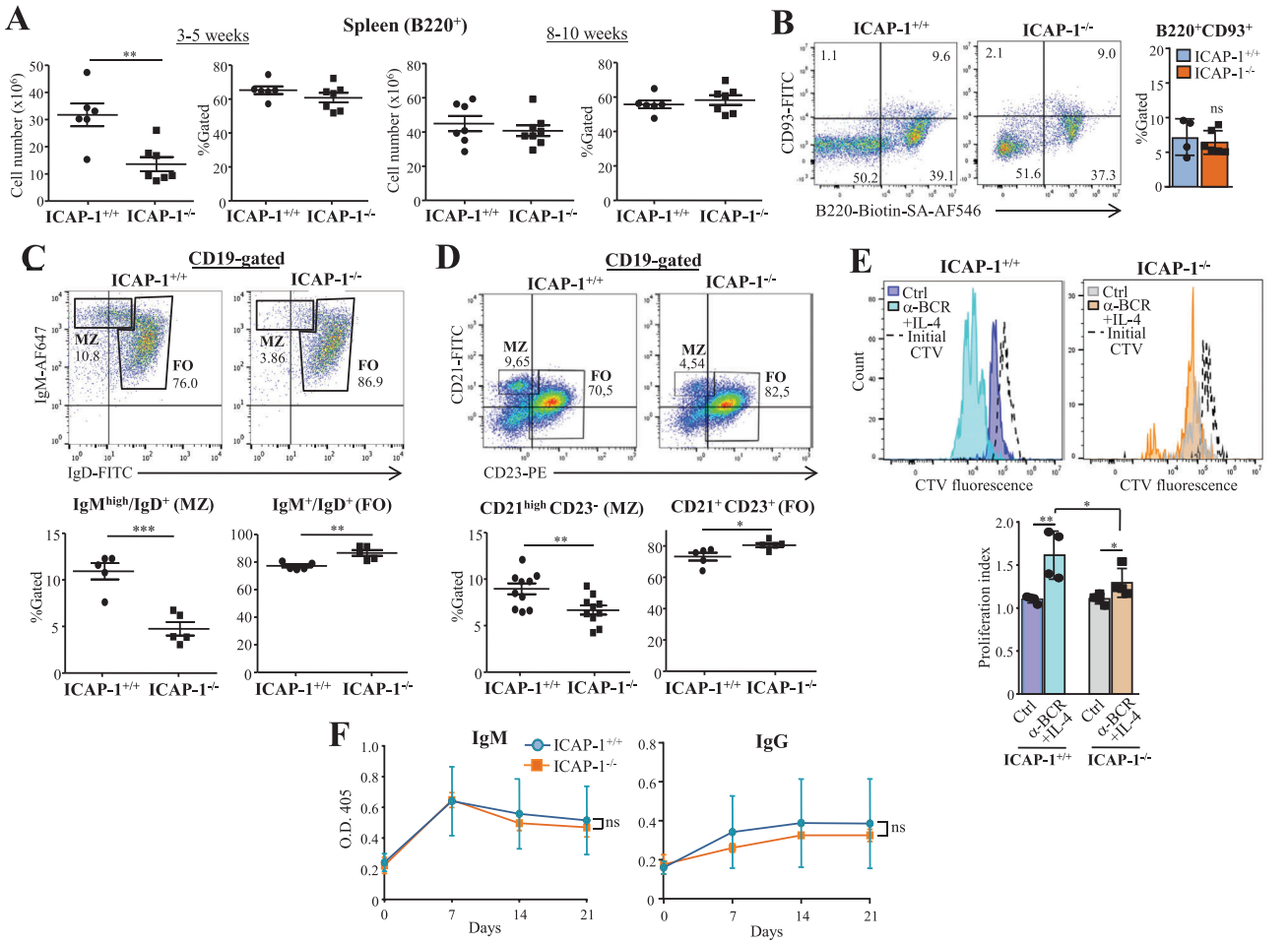


Figure 6. Altered marginal zone (MZ) and follicular (FO) B-cell proportions, and reduced B-cell proliferation in spleens from ICAP-1-null mice. (A) Number and proportions of B220$^+$ cells in spleens from ICAP-1$^{+/+}$ and ICAP-1$^{-/-}$ mice were assessed by flow cytometry. (B, left) Representative dot plots showing the CD93$^+$ immature B-cell fraction in spleen B220$^+$ cells from 8- to 10-week-old mice. (Right) Data show pooled data from two independent experiments. (C, D) The proportions of MZ and FO CD19$^+$-gated spleen B cells were determined by FACS with anti-IgM or anti-IgD (C), or with anti-CD21 and anti-CD23 antibodies (D). Top panels show representative dot plots, and bottom results display pooled data from two to four independent experiments. (E) CD19$^+$-selected spleen B cells were labeled with CellTracer Violet and incubated in the absence (Ctrl) or presence of anti-BCR and IL-4. Cell division and the associated proliferation indexes were analyzed by flow cytometry. Shown is a representative result out of two independent experiments. (F) Analysis by ELISA of TNP-specific IgM and IgG antibodies at different days postimmunization in the serum of control and ICAP-1-deficient mice. Shown is a representative result out of two independent experiments ($^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, and $^{*}p < 0.05$).

To look for potential alterations in naïve versus memory CD8$^+$ cell distribution in ICAP-1$^{-/-}$ spleens, we analyzed the expression of CD62L and CD44 markers. Interestingly, numbers and proportions of naïve CD62L^{hi}CD44$^-$ cells were significantly reduced in ICAP-1-null CD8$^+$ splenocytes (Fig. 5C and D). The total numbers of CD8$^+$ central memory CD62L^{hi}CD44$^+$ and effector memory CD62L$^-$CD44^{hi} cells were not remarkably altered in the mutant animals, but their proportions increased, especially in central memory CD8$^+$ cells (Fig. 5C and D).

As an assessment of the function of peripheral T cells lacking ICAP-1, we subjected spleen T cells to in vitro proliferation assays. CD3$^+$-selected, CellTracer Violet (CTV)-labelled T splenocytes were incubated with or without plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, and the extent of proliferation assessed by FACS. Of note, CD3$^+$-gated spleen T cells from ICAP-1$^{-/-}$ mice displayed significantly less division and proliferation rates than WT counterparts in response to the stimuli (Fig. 5E; Supporting information Fig. S5E).

Distribution and function peripheral B cells in ICAP-1-null mice

Reflecting the reduced cell numbers in the spleen (see Supporting information Fig. S5B), we found decreased B220$^+$ cellularity only in spleens from 3- to 5-week-old ICAP-1-null mice, but B220$^+$ cell proportions were unaltered in these mice as well as in older animals (Fig. 6A; Supporting information Fig. S6A). Analysis of the B220$^+$CD93$^+$ immature B-cell proportions in spleens revealed no remarkable alterations in ICAP-1$^{-/-}$ mice relative to control coun-

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

terparts (Fig. 6B). In addition, B220$^+$ cell numbers and frequencies were similar in LNs from control and ICAP-1-deficient mice (Supporting information Fig. S6B).

B cells in the spleen undergo transitional stages into mature follicular (FO) IgM$^+$IgD$^+$ cells or marginal zone (MZ) IgM^{high}/IgD$^+$ B cells [46, 47]. Notably, the proportion of CD19-PE-gated spleen B cells displaying a MZ-like phenotype was markedly lower in ICAP-1-null mice than control littermates, whereas a moderate increase in FO cell frequencies in ICAP-1$^{-/-}$ mice was observed (Fig. 6C). We further evaluated MZ and FO B cells based on CD21 and CD23 expression which revealed reduced CD21^{high}CD23$^-$ MZ and enhanced CD21$^+$CD23$^+$ FO cell proportions in CD19-APC-gated cells from ICAP-1$^{-/-}$ mice (Fig. 6D, Supporting information Fig. S6C). Immunohistology using anti-IgM and anti-IgD antibodies showed similar B-cell distributions in the white pulps of control and ICAP-1$^{-/-}$ mice, and evaluation of the MZ showed no differences in thickness compared to control animals (Supporting information Fig. S6D). Furthermore, the structure of follicles and paracortex appeared normal in ICAP-1$^{-/-}$ mice, and we observed no significant alterations in the formation of B-cell follicles or the MZ located near MOMA-1$^+$ metallophilic macrophages (Supporting information Fig. S6D). The discrepancy between the flow cytometry and histology data on the MZ analyses could be related to the differences in sample processing. While lower frequencies of MZ B cells are detected by flow cytometry in the homogenized tissue of ICAP-1-null mice, these cells could be able and enough in numbers to distribute within the whole MZ niche, and when analyzed by immunofluorescence of tissue sections, we might not detect clear differences between ICAP-1$^{-/-}$ and control mice in relation with thickness.

To examine the function of peripheral B cells lacking ICAP-1, we first assessed in vitro B-cell proliferation in the presence of anti-BCR plus IL-4. CTV-labelled, CD19$^+$-selected spleen B cells from ICAP-1-deficient mice proliferated significantly less than control cells (Fig. 6E). We next compared T-independent, B-cell specific humoral immune responses by immunization with TNP-Ficoll (a TI-2 antigen), measuring by ELISA the levels of TNP-specific antibodies in the serum at different days postimmunization. Data revealed no major differences in IgM and IgG serum content between control and ICAP-1-null mice (Fig. 6F). These results indicate that ICAP-1 does not play significant roles in B-cell antibody responses to T-independent antigens.

Adhesion properties of ICAP-1-deficient splenocytes

β1-integrin expression on spleen CD4$^+$ and CD8$^+$ cells of ICAP-1$^{-/-}$ and ICAP-1$^{+/+}$ mice was mostly comparable, whereas a tendency to increased expression was detected on B220$^+$ cells (Fig. 7A; Supporting information Fig. S7A). Examination of β1-levels separately on MZ and FO B cells, revealed only a minimal increase in expression in both cell subsets (Supporting information Fig. S7B). In addition, ICAP-1 loss did not affect talin and kindlin-3 expression (Supporting information Fig. S7C), and *KRIT1* mRNA remained almost undetectable in control and ICAP-1-deficient spleens (not shown). Unlike thymic cells, ICAP-1 expression was more evenly distributed between cytoplasm and nuclear fractions of spleen cells (Fig. 7B). Notably, ICAP-1-null total splenocytes displayed stronger adhesion to α4β1 ligands than control cells, and in support of lack of ICAP-1 binding to β2-integrins [6, 7], there were no changes in adhesion to ICAM-1 between control and ICAP-1$^{-/-}$ splenocytes (Fig. 7C). Moreover, spleen-derived selected CD3$^+$ T and CD19$^+$ B cells showed similar levels of ICAP-1 expression and upregulation of α4β1-dependent attachment (Fig. 7D and E). Results from adhesion assays under shear stress measuring splenocytes attached to VCAM-1 coimmobilized with CXCL12 showed higher numbers of stably arrested ICAP-1$^{-/-}$ cells than control cells (Fig. 7F), confirming that ICAP-1 negatively regulates α4β1-mediated splenocyte adhesion. The 9EG7 mAb, which binds to an activation-induced epitope on murine β1-integrins [48], displayed stronger binding to ICAP-1$^{-/-}$ splenocytes than to control counterparts (Fig. 7G), indicating that ICAP-1 controls the β1-integrin affinity of splenocytes. Finally, ICAP-1$^{+/+}$ and ICAP-1$^{-/-}$ splenocytes exhibited similar spreading on VCAM-1/CXCL12 (Fig. 7H), suggesting that ICAP-1 does not regulate α4β1-mediated postligand binding events.

Discussion

Using ICAP-1-null mice, we have investigated the role of ICAP-1 in the regulation of immune cell differentiation and function. We found that the HSC and HPC compartments in the BM as well as B lymphopoiesis were not remarkably affected by ICAP-1 loss. Examination of the development of the different thymocyte subsets revealed a defective generation of mature SP TCRαβ$^+$CD8$^+$ thymocytes in mice lacking ICAP-1, thus, unveiling an ICAP-1 involvement in SP thymocyte development. Based on the marked reductions in the proportions of the SM, M1 and M2 SP CD8$^+$ cellular subsets [26], as well as on the decreased frequencies of SP CD8$^+$ thymocytes within the CD69$^+$CD3$^+$ and the more mature CD69$^-$CD3$^+$ subsets in ICAP-1-null mice, we concluded that lack of ICAP-1 causes a defective maturation of SP CD8$^+$ cell. The altered expression of different markers associated with positive selection suggests an impairment of this process in the SP CD8$^+$ thymocyte lineage in ICAP-1-deficient mice, but we cannot formally exclude that ICAP-1 could also affect the negative selection process.

Adhesion assays to α4β1 ligands using total thymocytes (mostly DP) showed similar attachment levels between ICAP-1$^{-/-}$ and control thymocytes, suggesting that defective SP thymocyte development in ICAP-1-null mice is probably independent of potential adhesion alterations. We have not determined if ICAP-1 absence in selected SP CD4$^+$ and CD8$^+$ thymocytes affects their α4β1-dependent attachment. ICAP-1 bears a nuclear localization signal that has been shown to facilitate ICAP-1 shuttling into the nucleus of fibroblasts and epithelial cells, with functional consequences on transcriptional activities [11–13]. Interestingly, ICAP-1 showed a strong preferential localization in the nucleus of thymic cells, and it is therefore, tempting to hypothesize that the

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

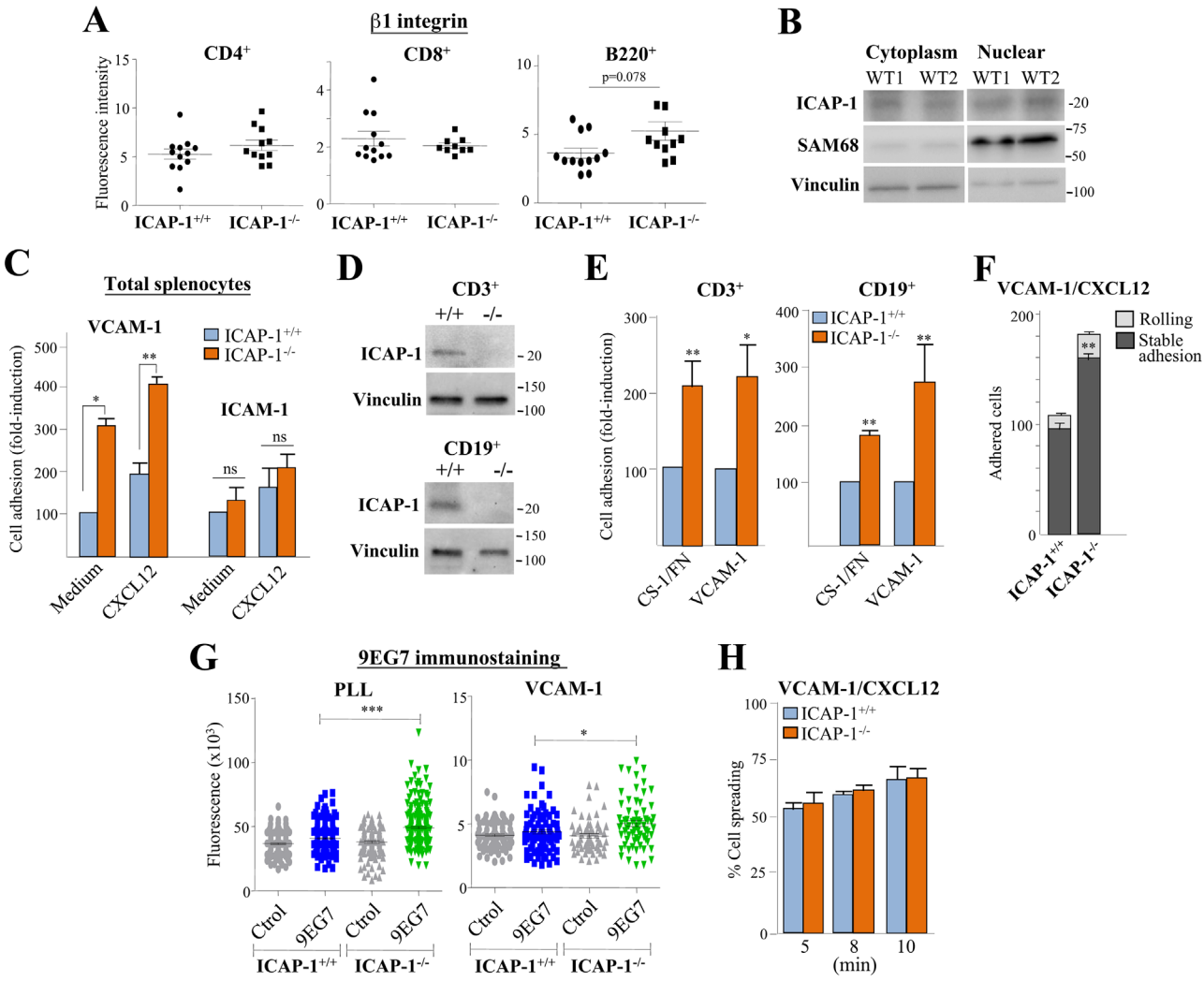


Figure 7. ICAP-1$^{-/-}$ splenocytes display increased α4β1-dependent attachment. (A) β1- integrin expression on the indicated T- and B-spleen cell populations was analyzed by FACS. Data show pooled data from four independent experiments. (B) Spleen cells from WT mice were subjected to cell fractionation assays as in Figure 4. Shown is a representative result out of three independent experiments. (C) Total splenocytes from ICAP-1$^{+/+}$ or ICAP-1$^{-/-}$ mice were subjected to static adhesion assays to VCAM-1 or ICAM-1 coimmobilized without (Medium) or with CXCL12 (n = 3-6). CD3^{+}- or CD19^{+}-selected T or B cells from ICAP-1$^{+/+}$ or ICAP-1-null spleens were analyzed by immunoblotting for ICAP-1 expression (D), or tested in static adhesion assays to VCAM-1 or CS-1/FN (n = 3) (E). (F) Splenocytes were perfused in flow chambers coated with VCAM-1 coimmobilized with CXCL12, and analyzed for rolling and stable cell arrest. Data are presented as mean ± SD of adhered cells (n = 3). (G) Splenocytes were attached onto PLL or VCAM-1, incubated with isotype control or with the 9EG7 anti-β1 mAb and subjected to fluorescence microscopy. Shown is a representative result out of two independent experiments. (H) Splenocytes were allowed to attach to VCAM-1 coimmobilized with CXCL12, and spreading was evaluated from Nomarski images at the indicated times. Percentage of cell spreading was determined from cells (2500–3000) from different fields of view (n = 2) ($^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$).

ICAP-1 predominant nuclear localization might be responsible for its lack of regulation of α4β1-mediated thymocyte adhesion.

Interactions of TCRs on DP thymocytes with self-peptides presented by MHC molecules on TECs regulate the expression of transcription factors that ultimately direct cell fates and positive selection toward the CD4^{+} or CD8^{+} lineages [43, 49, 50]. The transcription factor Runx3 is required for SP CD8^{+} cell development from thymic DP cells and for repression of CD4 expression [37-39, 43]. Intriguingly, we have detected a direct correlation between the lack of ICAP-1 and strongly reduced *Runx3* mRNA levels in isolated SP CD8^{+} thymocytes. Moreover, we found an increment in the frequency of CD8^{+}CD3^{+}CD24^{-} mature thymocytes that coexpress CD4 in ICAP-1-null mice, a result in line with the observed CD4 expression in mature SP CD8^{+} T cells in Runx3-deficient mice [40]. These data raise the possibility of a potential involvement of nuclear ICAP1 in the regulation of *Runx3* expression, which could be behind the deficient transcriptional regulation of CD8 that results in the altered development of SP CD8^{+} thymocytes in ICAP-1$^{-/-}$ mice. Notably, decreased expression of the bone marker *Runx2*, another member of the RUNX transcription family [51], was also observed in ICAP-1-null mice [18]. As selected thymocytes contribute to the development of mTECs [52,

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

53], it remains an open question whether the impaired production of mature SP CD8$^+$ thymocytes in ICAP-1-deficient mice impacts the maturation of their mTECs.

The strength and duration of signaling transduced by TCR is also important for controlling the development of CD4$^+$ and CD8$^+$ thymocytes, so that strong and durable signaling are associated with CD4$^+$ development, whereas weak and short signaling is linked to the generation of CD8$^+$ thymocytes (reviewed in [43]). A key kinase needed in early TCR signaling is ZAP-70, whose increased abundance is required in DP3 thymocytes for the efficient generation of SP CD8$^+$ cells [54]. Therefore, it will be interesting to characterize the TCR-dependent signaling players in ICAP-1-null mice, including ZAP-70, to assess their potential links to the observed defective SP CD8$^+$ thymocyte development.

Reduced cell numbers and proportions of spleen CD8$^+$ T cells in ICAP-1$^{-/-}$ mice were exclusively found in the naïve CD62L^{hi}CD44$^-$ subset, which could likely reflect the reduced CD8$^+$ cell production from their thymi. The decrease in CD8$^+$ cell numbers in LNs from ICAP-1-null mice could also correlate with the diminished SP CD8$^+$ thymic cell production, but it could also be accounted for by the reduced proliferation of T cells, as we found that ICAP-1$^{-/-}$ T cells have lower proliferation rates in response to combined CD3 plus CD28 antibodies. Interestingly, reduced proliferation of T-cell splenocytes in response to anti-CD3 plus anti-CD28 was described in Runx3$^{-/-}$ mice [37], again revealing functional similarities with ICAP-1-deficient mice.

Both total and CD3$^+$-selected splenocytes from ICAP-1$^{-/-}$ mice showed an upregulation of adhesion to α4β1 ligands, indicating that ICAP-1 negatively controls their α4β1-dependent attachment. Thus, the more even distribution of ICAP-1 in the cytoplasm and nucleus of splenocytes might contribute to ICAP-1 regulation of their α4β1-mediated adhesion, as compared to the predominant nuclear localization of ICAP-1 in thymocytes. The higher α4β1-dependent adhesion of ICAP-1$^{-/-}$ spleen T cells could open the likelihood that an increased number of T cells might be retained in the splenic T-cell zone. However, as mentioned above, this does not seem the case for CD8$^+$ cells, as their diminished frequencies in the spleens and LNs of ICAP-1$^{-/-}$ mice most likely reflect the reduced CD8$^+$ cell production from their thymi. Nonetheless, we cannot exclude intrinsic alterations in trafficking to and within these lymphoid organs, as we detected increased PB CD8$^+$ cells in ICAP-1$^{-/-}$ mice linked to the reduced CD8$^+$ cell numbers in spleen and LNs.

Correlating with the observed in vitro spleen B cell upregulated attachment to α4β1 ligands, a remarkable decrease in MZ B-cell frequencies and a moderate increase in FO B cells was observed in ICAP-1-null spleens, without gross changes in the splenic microarchitecture. Retention of MZ B cells in the MZ depends on α4β1 and αLβ2, whereas these integrins are not required for FO B cell lodging in the follicles [55]. The frequency of mature B cells in the BM was similar between ICAP-1$^{-/-}$ and control mice, indicating that enhanced FO B-cell percentages in ICAP-1-deficient spleens do not lead to their increased recirculation to the BM. An enhanced α4β1-dependent MZ B- cell adhesion could theoretically augment their retention in the MZ, causing a reduction in their shuttling to the follicles, although total cell numbers should not change. We have not tested if reduced MZ B-cell frequency is associated with potential MZ B-cell egress from the spleen. Regulated cell trafficking in the spleen is one of the several mechanisms controlling MZ B-cell maturation [46]. These mechanisms are dictated by commitment signals to a MZ B-cell fate such as those depending on the strength of BCR signaling, Notch2 activity, BAFF-BAFFR interactions and the NF-κB pathway [46, 56-59]. Whether any of such processes is perturbed in ICAP-1$^{-/-}$ spleens dependently or independently of the altered α4β1-mediated B-cell adhesion, whether increased apoptosis of ICAP-1-deficient B cells occurs, or alternatively, if inhibition of MZ B-cell generation from their precursors takes place, warrants further studies.

Finally, reduced proliferation in response to soluble, adhesion-independent anti-BCR plus IL-4 stimuli was found in CD19$^+$ B cells from ICAP-1-null mice. We have not yet addressed whether early B-cell activation events are altered in ICAP-1$^{-/-}$ spleen B cells, or if the deficient proliferation might be linked with defective cell survival. The fact that ICAP-1-deficient spleen T cells also display reduced proliferation in response to stimuli provided by CD3 and CD28 antibodies, suggests that ICAP-1 can regulate lymphocyte proliferation. It will be important to unveil the molecular mechanisms associated with this regulation.

Collectively, the results from this study unravel an involvement of ICAP-1 in the generation and/or maintenance of CD8$^+$ SP thymocytes and MZ B cells, and indicate that the distinct ICAP-1 functions might be controlled by its cellular localization.

Materials and methods

Mice and cells

ICAP$^{+/-}$ mice were intercrossed to generate ICAP$^{-/-}$ mice that were genotyped by PCR [18]. Confirmation of ICAP-1 deletion was further assessed by immunoblotting with anti-ICAP-1 antibodies [18]. Mice were kept under pathogen-free conditions at the Animal Facility of the Centro de Investigaciones Biológicas. Single-cell suspensions from spleens, LNs, thymus, and BM from femur and tibia were obtained from 3- to 5- or 8- to 10-week-old male or female mice. Spleen CD3$^+$ T cells were enriched by negative selection (EasySep, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) (purity > 85%), or were positively selected by cell sorting (FACSAria Fusion, Becton-Dickinson) using an Alexa Fluor647 anti-mouse CD3ε antibody (see Supporting information Table S1). SP CD8$^+$ thymocytes were isolated with the MagCellect Mouse CD8$^+$ T-Cell Isolation Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN; purity > 80%). DP CD4$^+$CD8$^+$ and SP CD4$^+$ thymocytes were stained with FITC-anti-mouse CD4$^+$ and PE-anti-mouse CD8$^+$ antibodies (Supporting information Table S1), and positively selected by cell sorting. CD19$^+$ spleen B cells were isolated (purity > 90%) by cell depletion with the MagCellect Mouse B-Cell Isolation Kit (R&D Systems, purity > 90%). TECs enrichment was achieved following

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

the described method [60]. For the preparation of chimeric mice, BM cell suspensions from donors (6- to 7-week-old) were intravenously injected into lethally irradiated (twice 600 rad doses, separated by 3 h) recipient animals. Thymocyte populations from recipient mice were analyzed by flow cytometry 6–7 weeks post-transplantation. All T-cell assays comply with the guidance provided by MIATA.

Flow cytometry

Cells were stained on ice with fluorochrome-conjugated antibodies, followed by incubation with secondary antibodies or streptavidin-conjugated fluorochromes. Conjugated Rat IgG2b κ and Armenian Hamster IgG were used as isotype controls. The antibodies used for FACS are listed in Supporting information Table S1. For characterization of TECs, cells were incubated with UEA1-Biotin (Vector Laboratories, Burlingame, CA), which was detected by incubating with streptavidin-APC (BioLegend, San Diego, CA). Samples were analyzed either with a FC500 or a Cytoflex-S (Beckman Coulter), with a FACs Canto II, or with a FACS Calibur (BD Biosciences). We used CXP, FlowLogic, FlowJo X (Tree Star, Inc), FlowJo v10.7.1, or FCS Express III software for analysis of FACS data. We have adhered to the guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.202170126).

Cell adhesion and spreading assays

Static adhesion assays to α4β1 ligands were carried out as described [61]. In brief, labeled cells were plated on wells coated with the fibronectin fragment FN-H89 (CS-1/FN) or with recombinant VCAM-1 or ICAM-1 (R&D Systems), in the absence or presence of immobilized CXCL12 (R&D Systems). Plates were incubated for 2–4 min at 37°C after a short spin and adhesions quantified with a fluorescence analyzer. Adhesion data are presented relative to control cells, which were given an arbitrary value of 100. For flow chamber adhesion assays [61], cells were infused at 1 dyn/cm^2 into flow chambers containing coimmobilized VCAM-1 and CXCL12. Rolling cells subsequently attached were expressed as stable arrest, whereas tethered cells not arrested were expressed as rolling cells. For cellular spreading, CXCL12-stimulated cells attached on VCAM-1 were analyzed as previously described [61].

Analysis of high-affinity β1-integrins

Splenocytes were cultured for 1 h at 37°C onto slides (Ibidi GmbH, Planegg, Germany) coated with poly-L-lysine (PLL; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) or with Protein A (Sigma Aldrich)/mouse VCAM-Fc (R&D), and subsequently fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Then cells were blocked with Fc receptor-blocking antibodies (rat anti-mouse CD16/CD32, BD Biosciences), followed by incubation at 37°C with the 9EG7 rat anti-mouse β1 mAb (BD Biosciences) or with isotype controls, and finally incubated with fluorochrome-conjugated secondary antibodies. Samples were mounted with ProLong diamond antifade mountant with DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR), and were analyzed using a fluorescence microscope CCD Digital Camera Leica DFC 350 FX, coupled with a light microscopy Zeiss Axioplan with a 100× oil immersion objective.

Immunoblotting and cell fractionation

For immunoblotting, cells were solubilized as described [62]. After SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF membranes and incubated with primary antibodies and HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch). Proteins were visualized using Immobilon Western (Millipore, Billerica, MA) and a chemiluminiscence detector (Fujifilm LAS 3000 Image Reader). For cell fractionation, cells were lysed in ice (HEPES 10 mM pH 8.0, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, sucrose 34 mM, glycerol 10%, DTT 1 mM, and Triton X-100 0.1%, supplemented with protease inhibitors; CFL buffer), and subsequently samples were centrifuged at 3500 rpm for 5 min at 4°C. Supernatant represented the cytosolic fraction. The pellet was washed once with CFL buffer, sonicated in lysis buffer, followed by centrifugation at high speed for 15 min at 4°C. The resulting supernatant was considered the nuclear fraction, and proteins from each pool were tested by immunoblotting according to the described method [62]).

In vitro cell proliferation and T-independent immunization assays

For T-cell proliferation assays, purified spleen CD3$^+$ cells from 8- to 10-week old mice were labelled with 5 μM CTV (Thermo Fisher, Waltham, MA). After washing, cells were resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 μM β-mercaptoethanol, and nonessential amino acids (400 μM). CTV-labelled cells (2×10^5/well; counted using a hemocytometer) were cultured at 37°C in p96 flat-bottom plates coated without (PBS) or with anti-CD3 (clone 145-2C11, BioLegend) plus anti-CD28 (clone 37.51, BioLegend). Cells were harvested at 72 h, CD3-labelled for T-cell identification, and analyzed by flow cytometry. Proliferation indexes were obtained with FlowJo analysis software (BD Biosciences), showing the ratio of the total number of divisions between the number of cells that went into division. For B-cell proliferation assays, we followed the described method [63]. Briefly, CTV-labelled CD19$^+$ B cells were cultured with goat anti-BCR (20 μg/mL; Jackson Immunoresearch, Ely, UK) plus recombinant mouse IL-4 (20 ng/mL Peprotech, London, UK), and after 96 h, cells were analyzed by flow cytometry and proliferation indexes obtained using FlowJo analysis software. For T-independent immunization assays, groups of four control and ICAP-1-null mice were immunized with TNP-Ficoll (Biosearch Technologies) as described in

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

Ref, [63]. Peripheral blood samples were taken 24 h before immunization, and at days 7, 14, and 21 postimmunization. Serum levels of TNP-specific IgM and IgG antibodies were evaluated in triplicates by ELISA. Antibodies bound to specific antigens were detected with biotinylated goat anti-mouse IgM and anti-IgG antibodies, respectively (Southern Biotech, Birmingham, AL), plus alkaline phosphatase-streptavidin (SIGMA). After *p*-nitrophenyl phosphate addition, plates were measured at 405 nm in a plate reader at 45 min after the reaction.

Real-time quantitative PCR

For mRNA expression analyses, RT-qPCR was performed in triplicate using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) and LightCycler 480 II (Roche). Results were normalized according to the expression levels of *TBP* (TATA-binding protein) RNA. Sequences for oligonucleotides are shown in Supporting Information Table S2.

Statistical analyses

Analyses were performed with GraphPad Prism 5. Outliers according to the Grubbs' test were excluded. Two groups of normally distributed data were compared using the paired and unpaired *t*-test. The results were considered significantly different when $p < 0.05$. Nonsignificant differences were marked as ns. Error bars show ±SD.

Acknowledgments: We thank Dr. Corinne Albiges-Rizo (Institut for Advanced Biosciences, La Troche, France) for anti-ICAP-1 antibodies, and Dr. Aldo Borroto for helpful suggestions. Dr. Pedro Lastres and Patricia Yagüe-Fernández are acknowledged for help in flow cytometry, Guillermo Padilla Alonso for bioinformatics analyses, and Dr. Nuria Gironès for figure editing. We also thank Francisco Casado-Robledillo, Olivia Barcón-Minchán, Carolina Navas-Jiménez, and Sandra Martin-Salamanca for assistance in the Animal Facilities, and Drs. Silvia Santamaría and José Alberto García Sanz and Luisa Botella for their contribution with mice irradiation.

Funding sources: This work was supported by grants SAF2017-85146-R and PID2020-116291RB-I00 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) to J.T., PID2019-105623RB-I00 from MICINN to M.L.T., BFU2013-48828-P from MICINN to Y.R.C., ERC Synergy Grant (2018) to R.F., RTI2018-095497-B-I00 from MICINN to A.H, and RTI2018-093938-B-I100 from MICINN, and (RD16/0011/0002, TERCEL) from Instituto de Salud Carlos III to A.G.Z.

Conflict of interest: The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

Author contributions: JT wrote the manuscript. Experimental design, data analysis, and interpretation were performed by SSM, PF, PWK, SIV, JGC, DB, AGP, AGZ, AH, RF, YRC, MLT, and JT. Experimental performance was performed by SSM, PF, NAS, YRG, PWK, SIV, SMH, JGC, VBH, SRG, NAM, CBA, and GC.

Ethics approval statement: All mouse experiments were approved by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas Ethics Committee.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Peer review: The peer review history for this article is available at https://publons.com/publon/10.1002/eji.202149560.

References

1 **Hynes, R. O.**, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002. **110**: 673–687.

2 **Moser, M., Legate, K. R., Zent, R. and Fassler, R.**, The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 2009. **324**: 895–899.

3 **Bouvard, D., Pouwels, J., De Franceschi, N. and Ivaska, J.**, Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. **14**: 430–442.

4 **Kim, C., Ye, F. and Ginsberg, M. H.**, Regulation of integrin activation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011. **27**: 321–345.

5 **Calderwood, D. A., Campbell, I. D. and Critchley, D. R.**, Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. **14**: 503–517.

6 **Chang, D. D., Wong, C., Smith, H. and Liu, J.**, ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J. Cell Biol.* 1997. **138**: 1149–1157.

7 **Zhang, X. A. and Hemler, M. E.**, Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J. Biol. Chem.* 1999. **274**: 11–19.

8 **Chang, D. D., Hoang, B. Q., Liu, J. and Springer, T. A.**, Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *J. Biol. Chem.* 2002. **277**: 8140–8145.

9 **Bouvard, D., Vignoud, L., Dupe-Manet, S., Abed, N., Fournier, H. N., Vincent-Monegat, C., Retta, S. F. et al.**, Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J. Biol. Chem.* 2003. **278**: 6567–6574.

10 **Brunner, M., Millon-Fremillon, A., Chevalier, G., Nakchbandi, I. A., Mosher, D., Block, M. R., Albiges-Rizo, C. and Bouvard, D.**, Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *J. Cell. Biol.* 2011. **194**: 307–322.

11 **Fournier, H. N., Dupe-Manet, S., Bouvard, D., Luton, F., Degani, S., Block, M. R., Retta, S. F. and Albiges-Rizo, C.**, Nuclear translocation of integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 stimulates cellular proliferation. *Mol. Biol. Cell* 2005. **16**: 1859–1871.

12 **Draheim, K. M., Huet-Calderwood, C., Simon, B. and Calderwood, D. A.**, Nuclear localization of integrin cytoplasmic domain-associated protein-1

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

(ICAP1) influences beta1 integrin activation and recruits Krev/Interaction trapped-1 (KRIT1) to the nucleus. *J. Biol. Chem.*2017. **292**: 1884–1898.

13 **Su, V. L., Simon, B., Draheim, K. M. and Calderwood, D. A.**, Serine phosphorylation of the small phosphoprotein ICAP1 inhibits its nuclear accumulation. *J. Biol. Chem.* 2020. **295**: 3269–3284.

14 **Millon-Fremillon, A., Brunner, M., Abed, N., Collomb, E., Ribba, A. S., Block, M. R., Albiges-Rizo, C. and Bouvard, D.**, Calcium and calmodulin-dependent serine/threonine protein kinase type II (CaMKII)-mediated intramolecular opening of integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (ICAP-1alpha) negatively regulates beta1 integrins. *J. Biol. Chem.* 2013. **288**: 20248–20260.

15 **Zhang, J., Clatterbuck, R. E., Rigamonti, D., Chang, D. D. and Dietz, H. C.**, Interaction between krit1 and icap1alpha infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum. Mol. Genet.* 2001. **10**: 2953–2960.

16 **Liu, W., Draheim, K. M., Zhang, R., Calderwood, D. A. and Boggon, T. J.**, Mechanism for KRIT1 release of ICAP1-mediated suppression of integrin activation. *Mol. Cell* 2013. **49**: 719–729.

17 **Faurobert, E., Rome, C., Lisowska, J., Manet-Dupe, S., Boulday, G., Malbouyres, M., Balland, M. et al.**, CCM1-ICAP-1 complex controls β integrin-dependent endothelial contractility and fibronectin remodeling. *J. Cell Biol.* 2013. **202**: 545–561.

18 **Bouvard, D., Aszodi, A., Kostka, G., Block, M. R., Albiges-Rizo, C. and Fassler, R.**, Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development* 2007. **134**: 2615–2625.

19 **Martinez-Moreno, M., Leiva, M., Aguilera-Montilla, N., Sevilla-Movilla, S., Isern de Val, S., Arellano-Sanchez, N., Gutierrez, N. C. et al.**, In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by α4β1 cytoplasmic-binding proteins. *Leukemia* 2016. **30**: 861–872.

20 **Ruppert, R., Moser, M., Sperandio, M., Rognoni, E., Orban, M., Liu, W. H., Schulz, A. S. et al.**, Kindlin-3-mediated integrin adhesion is dispensable for quiescent but essential for activated hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 2015. **212**: 1415–1432.

21 **Papayannopoulou, T., Craddock, C., Nakamoto, B., Priestley, G. V. and Wolf, N. S.**, The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995. **92**: 9647–9651.

22 **Leuker, C. E., Labow, M., Müller, W. and Wagner, N.**, Neonatally induced inactivation of the vascular cell adhesion molecule 1 gene impairs B cell localization and T cell-dependent humoral immune response. *J. Exp. Med.* 2001. **193**: 755–768.

23 **Rose, D. M., Han, J. and Ginsberg, M. H.**, Alpha4 integrins and the immune response. *Immunol. Rev.* 2002. **186**: 118–124.

24 **Chen, J. Y., Miyanishi, M., Wang, S. K., Yamazaki, S., Sinha, R., Kao, K. S., Seita, J. et al.**, Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature* 2016. **530**: 223–227.

25 **Xiong, J., Armato, M. A. and Yankee, T. M.**, Immature single-positive CD8+ thymocytes represent the transition from Notch-dependent to Notch-independent T-cell development. *Int. Immunol.* 2011. **23**: 55–64.

26 **Hogquist, K. A., Xing, Y., Hsu, F. C. and Shapiro, V. S.**, T cell adolescence: maturation events beyond positive selection. *J. Immunol.* 2015. **195**: 1351–1357.

27 **Xing, Y., Wang, X., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A.**, Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF-κB and tonic type I interferon signaling. *Nat. Immunol.* 2016. **17**: 565–573.

28 **Ngo, V. N., Tang, H. L. and Cyster, J. G.**, Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J. Exp. Med.* 1998. **188**: 181–191.

29 **Ueno, T., Saito, F., Gray, D. H., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T. et al.**, CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J. Exp. Med.* 2004. **200**: 493–505.

30 **Yin, X., Ladi, E., Chan, S. W., Li, O., Killeen, N., Kappes, D. J. and Robey, E. A.**, CCR7 expression in developing thymocytes is linked to the CD4 versus CD8 lineage decision. *J. Immunol.* 2007. **179**: 7358–7364.

31 **Fu, G., Vallée, S., Rybakin, V., McGuire, M. V., Ampudia, J., Brockmeyer, C., Salek, M. et al.**, Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat. Immunol.* 2009. **10**: 848–856.

32 **Salomon, D. R., Crisa, L., Mojcik, C. F., Ishii, J. K., Klier, G. and Shevach, E. M.**, Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood* 1997. **89**: 2461–2471.

33 **Prockop, S. E., Palencia, S., Ryan, C. M., Gordon, K., Gray, D. and Petrie, H. T.**, Stromal cells provide the matrix for migration of early lymphoid progenitors through the thymic cortex. *J. Immunol.* 2002. **169**: 4354–4361.

34 **Arroyo, A. G., Yang, J. T., Rayburn, H. and Hynes, R. O.**, Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* 1996. **85**: 997–1008.

35 **Bungartz, G., Stiller, S., Bauer, M., Muller, W., Schippers, A., Wagner, N., Fassler, R. and Brakebusch, C.**, Adult murine hematopoiesis can proceed without β1 and β7 integrins. *Blood* 2006. **108**: 1857–1864.

36 **Gribi, R., Hook, L., Ure, J. and Medvinsky, A.**, The differentiation program of embryonic definitive hematopoietic stem cells is largely alpha4 integrin independent. *Blood* 2006. **108**: 501–509.

37 **Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M. J., Bae, S. C., Komori, T., Ito, Y. and Littman, D. R.**, Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 2002. **111**: 621–633.

38 **Park, J. H., Adoro, S., Guinter, T., Erman, B., Alag, A. S., Catalfamo, M., Kimura, M. Y. et al.**, Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat. Immunol.* 2010. **11**: 257–264.

39 **Egawa, T., Tillman, R. E., Naoe, Y., Taniuchi, I. and Littman, D. R.**, The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J. Exp. Med.* 2007. **204**: 1945–1957.

40 **Woolf, E., Xiao, C., Fainaru, O., Lotem, J., Rosen, D., Negreanu, V., Bernstein, Y. et al.**, Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2003. **100**: 7731–7736.

41 **Bangsow, C., Rubins, N., Glusman, G., Bernstein, Y., Negreanu, V., Goldenberg, D., Lotem, J. et al.**, The RUNX3 gene—sequence, structure and regulated expression. *Gene* 2001. **279**: 221–232.

42 **He, X., Dave, V. P., Zhang, Y., Hua, X., Nicolas, E., Xu, W., Roe, B. A. and Kappes, D. J.**, The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature* 2005. **433**: 826–833.

43 **Singer, A., Adoro, S. and Park, J. H.**, Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat. Rev. Immunol.* 2008. **8**: 788–801.

44 **Luckey, M. A., Kimura, M. Y., Waickman, A. T., Feigenbaum, L., Singer, A. and Park, J. H.**, The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4(+) lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling. *Nat. Immunol.* 2014. **15**: 638–645.

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

45 **Hough, M. R., Takei, F., Humphries, R. K. and Kay, R.**, Defective development of thymocytes overexpressing the costimulatory molecule, heat-stable antigen. *J. Exp. Med.* 1994. **179**: 177–184.

46 **Pillai, S. and Cariappa, A.**, The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 2009. **9**: 767–777.

47 **Arnon, T. I., Horton, R. M., Grigorova, I. L. and Cyster, J. G.**, Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature* 2013. **493**: 684–688.

48 **Lenter, M., Uhlig, H., Hamann, A., Jeno, P., Imhof, B. and Vestweber, D.**, A monoclonal antibody against an activation epitope on mouse integrin chain beta 1 blocks adhesion of lymphocytes to the endothelial integrin alpha 6 beta 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1993. **90**: 9051–9055.

49 **Shah, D. K. and Zuniga-Pflucker, J. C.**, An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J. Immunol.* 2014. **192**: 4017–4023.

50 **Gascoigne, N. R., Rybakin, V., Acuto, O. and Brzostek, J.**, TCR signal strength and T cell development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2016. **32**: 327–348.

51 **Levanon, D. and Groner, Y.**, Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* 2004. **23**: 4211–4219.

52 **Surh, C. D., Ernst, B. and Sprent, J.**, Growth of epithelial cells in the thymic medulla is under the control of mature T cells. *J. Exp. Med.* 1992. **176**: 611–616.

53 **Gray, D. H., Seach, N., Ueno, T., Milton, M. K., Liston, A., Lew, A. M., Goodnow, C. C. and Boyd, R. L.**, Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* 2006. **108**: 3777–3785.

54 **Saini, M., Sinclair, C., Marshall, D., Tolaini, M., Sakaguchi, S. and Seddon, B.**, Regulation of Zap70 expression during thymocyte development enables temporal separation of CD4 and CD8 repertoire selection at different signaling thresholds. *Sci. Signal* 2010. **3**: ra23.

55 **Lu, T. T. and Cyster, J. G.**, Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science* 2002. **297**: 409–412.

56 **Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T. et al.**, Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 2003. **18**: 675–685.

57 **Tanigaki, K., Han, H., Yamamoto, N., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kuroda, K., Suzuki, A. et al.**, Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat. Immunol.* 2002. **3**: 443–450.

58 **Kaisho, T., Takeda, K., Tsujimura, T., Kawai, T., Nomura, F., Terada, N. and Akira, S.**, IkappaB kinase alpha is essential for mature B cell development and function. *J. Exp. Med.* 2001. **193**: 417–426.

59 **Cariappa, A., Liou, H. C., Horwitz, B. H. and Pillai, S.**, Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 2000. **192**: 1175–1182.

60 **Montero-Herradón, S., García-Ceca, J. and Zapata, A. G.**, Altered maturation of medullary TEC in EphB-deficient thymi is recovered by RANK signaling stimulation. *Front Immunol.* 2018. **9**: 1020.

61 **Garcia-Bernal, D., Sotillo-Mallo, E., Nombela-Arrieta, C., Samaniego, R., Fukui, Y., Stein, J. V. and Teixido, J.**, DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin alpha4beta1. *J. Immunol.* 2006. **177**: 5215–5225.

62 **Sevilla-Movilla, S., Arellano-Sánchez, N., Martínez-Moreno, M., Gajate, C., Sánchez-Vencells, A., Valcárcel, L. V., Agirre, X. et al.**, Upregulated expression and function of the $\alpha4\beta1$ integrin in multiple myeloma cells resistant to bortezomib. *J. Pathol.* 2020. **252**: 29–40.

63 **Barrio, L., Román-García, S., Díaz-Mora, E., Risco, A., Jiménez-Saiz, R., Carrasco, Y. R. and Cuenda, A.**, B cell development and T-dependent antibody response are regulated by p38γ and p38δ. *Front Cell Dev. Biol.* 2020. **8**: 189.

Abbreviations: **CS-1/FN**: connecting segment 1/fibronectin · **CTV**: CellTracer Violet · **DN**: double negative · **DP**: double positive · **FO**: follicular · **HSPC**: hematopoietic stem and progenitor cell · **ISP**: immature single positive · **MZ**: marginal zone · **PLL**: poly-L-lysine · **SP**: single positive · **TEC**: thymic epithelial cell

Full correspondence: Joaquin Teixidó. Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Department of Molecular Biomedicine. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.
e-mail: joaquint@cib.csic.es

Received: 2/8/2021
Revised: 15/3/2022
Accepted: 29/4/2022
Accepted article online: 2/5/2022

© 2022 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH.

ANEXO IV

cancers

MDPI

Review

The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression

Almudena García-Ortiz [1,†], Yaiza Rodríguez-García [2,†], Jessica Encinas [1], Elena Maroto-Martín [1], Eva Castellano [1], Joaquín Teixidó [2,‡] and Joaquín Martínez-López [3,*,‡]

[1] Hematology Department, Hospital 12 de Octubre, i+12, CNIO, CIBERONC, ES 28041 Madrid, Spain; a.garcia.imas12@h12o.es (A.G.-O.); jessienc@ucm.es (J.E.); elemarot@ucm.es (E.M.-M.); ecaste03@ucm.es (E.C.)
[2] Department of Molecular Biomedicine, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, ES 28040 Madrid, Spain; yaiza.rodriguez@cib.csic.es (Y.R.-G.); joaquint@cib.csic.es (J.T.)
[3] Hematology Department, Hospital 12 de Octubre, i+12, Complutense University, CNIO, CIBERONC, ES 28041 Madrid, Spain
* Correspondence: jmarti01@ucm.es
† These authors contributed equally to this work.
‡ These authors contributed equally to this work.

Simple Summary: Multiple Myeloma (MM) is a hematologic malignancy caused by aberrant plasma cell proliferation in the bone marrow (BM) and constitutes the second most common hematological disease after non-Hodgkin lymphoma. The disease progression is drastically regulated by the immunosuppressive tumor microenvironment (TME) generated by soluble factors and different cells that naturally reside in the BM. This microenvironment does not remain unchanged and alterations favor cancer dissemination. Despite therapeutic advances over the past 15 years, MM remains incurable and therefore understanding the elements that control the TME in MM would allow better-targeted therapies to cure this disease. In this review, we discuss the main events and changes that occur in the BM milieu during MM development.

Abstract: Multiple myeloma (MM) is a hematologic cancer characterized by clonal proliferation of plasma cells in the bone marrow (BM). The progression, from the early stages of the disease as monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM) to MM and occasionally extramedullary disease, is drastically affected by the tumor microenvironment (TME). Soluble factors and direct cell–cell interactions regulate MM plasma cell trafficking and homing to the BM niche. Mesenchymal stromal cells, osteoclasts, osteoblasts, myeloid and lymphoid cells present in the BM create a unique milieu that favors MM plasma cell immune evasion and promotes disease progression. Moreover, TME is implicated in malignant cell protection against anti-tumor therapy. This review describes the main cellular and non-cellular components located in the BM, which condition the immunosuppressive environment and lead the MM establishment and progression.

Keywords: multiple myeloma; tumor microenvironment; immunosuppression; adhesion molecules; migration; bone marrow niche

check for updates

Citation: García-Ortiz, A.; Rodríguez-García, Y.; Encinas, J.; Maroto-Martín, E.; Castellano, E.; Teixidó, J.; Martínez-López, J. The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. *Cancers* **2021**, *13*, 217. https://doi.org/10.3390/cancers13020217

Received: 30 November 2020
Accepted: 6 January 2021
Published: 9 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Multiple Myeloma (MM) is a hematologic malignancy characterized by clonal proliferation of plasma cells in the bone marrow (BM) and constitutes the second most common hematological disease after non-Hodgkin lymphoma [1]. This illness normally evolves from premalignant states called monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), with or without intermediate stages as smoldering multiple myeloma (SMM) or solitary plasmacytoma, and eventually progresses to plasma cell leukemia or extramedullary

myeloma [2]. The transition among the stages of the disease and its resistance to treatment are regulated by the BM microenvironment. Cellular and non-cellular components of MM BM niche contribute to the generation of an immunosuppressive tumor microenvironment (TME), which supports MM cell growth and survival. In this review, we update the mechanisms of myeloma cell trafficking and the involvement of BM mesenchymal stromal cells and the immune compartment in the establishment and exacerbation of the disease.

2. Myeloma Cell Trafficking

Different trafficking events of MM cells allow them to reach and colonize distinct BM niches, eventually recirculate, and finally egress from the BM during the extramedullary stages of the disease (Figure 1) [3,4]. Although it has not been completely elucidated, it is likely that normal plasma cells and MM cells use the BM sinusoids as an entry route into the BM, similarly to the hematopoietic stem cells (HSC) entry gates [5–8]. A main molecule mediating homing, lodging, and retention of both normal and malignant plasma cells into the BM is the chemokine receptor CXCR4, which interacts with CXCL12, a chemokine highly expressed in the BM microenvironment [3–5,8–12]. Notably, blocking CXCL12–CXCR4 interaction with the CXCR4 inhibitor plerixafor (AMD3100) disrupts MM cell contacts with the BM microenvironment [13], leading to MM cell mobilization into the circulation [14]. Among other signaling responses, the interaction of CXCL12 with CXCR4 on the surface of MM cells upregulates the activity of the α4β1 integrin, allowing high binding to its ligand VCAM-1 expressed on the BM microvasculature [15–17]. This adhesive event represents a key step in MM cell trafficking into the BM milieu and likely plays key roles during MM cell recirculation.

Two other important adhesion molecules mediating MM cell homing into the BM are the α4β7 integrin, a receptor for MAdCAM-1 and fibronectin, and CD44 [18–20]. In addition, MM cell attachment to the BM microvasculature is also contributed by P- and E-selectin and their ligands. Thus, the P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is expressed on the surface of MM cells [21,22], playing key roles in the very initial interactions of MM cells with BM endothelial cells [22], by facilitating malignant plasma cell rolling on P-selectin expressed by the microvasculature [16]. The involvement of E-selectin during MM cell homing to the BM has been demonstrated using inhibitors of sialyltransferase ST3Gal-6, an enzyme required for the generation of E-selectin ligands [23,24], and by E-selectin-blocking antibodies [16].

Once inside the BM milieu, the α4β1 integrin is also important for anchoring the MM cells to BM niches, and for retaining them in the BM TME [16,25–28]. α4β1-dependent MM cell attachment was early shown to contribute to MM progression in in vivo models [29,30]. Its interaction with both VCAM-1 and fibronectin present in the BM triggers MM cell signaling leading to stimulation of their growth involving interleukin-6 (IL-6) [25,31,32], and promoting cell adhesion-mediated drug resistance [33,34]. At this stage, MM cell attachment to the BM microenvironment is also facilitated by α4β7- and by CD44-dependent adhesion, overall contributing to the retention of MM cells in the BM [18–20,25,35].

The final phases in MM involve egress of myeloma cells from the BM to the bloodstream to colonize different organs, once they become independent from growth signals provided by the BM milieu, a condition named extramedullary disease [4]. Decreased CXCR4 expression and function represents a possible candidate event inducing a reduction in MM cell retention associated with egress from the BM. In line with this model, treatment of MM cells with the proteasome inhibitor bortezomib decreases CXCR4 expression, which might contribute to MM cell migration from the BM and promote extramedullary disease [36], an unwanted clinical response. Furthermore, macrophage migration inhibitory factor (MIF) is also capable of binding CXCR4 [37], and its silencing causes downregulation of MM cell adhesion to BM stroma and leads to extramedullary disease [38]. The chemokine receptor CCR1 is also expressed on MM cells [12,39], and its expression is associated with increased circulating MM cells [40]. Interestingly, its ligand CCL3 inhibited MM cell migration towards CXCL12 [40], raising the possibility that the CCL3–CCR1 axis might actively

promote MM cell exit from the BM, possibly by competition with retention signals from the CXCR4–α4β1 interaction.

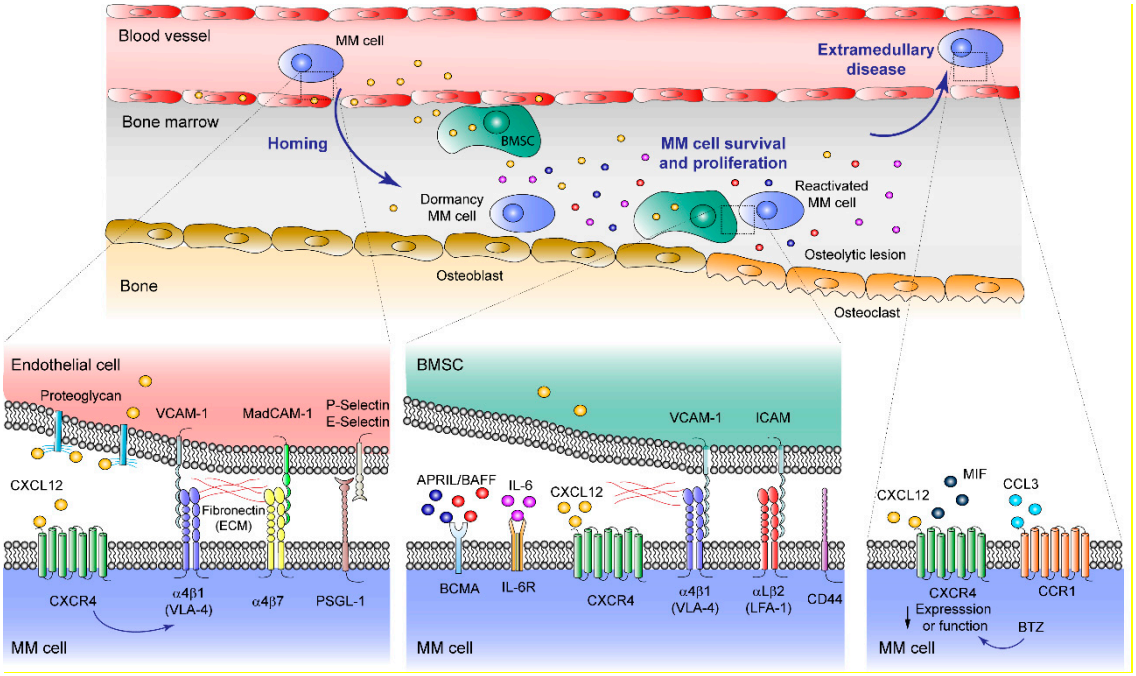


Figure 1. Malignant plasma cell trafficking events in multiple myeloma (MM) development. MM plasma cells reach the bone marrow (BM) niche through sinusoids, proliferate favored by the tumor microenvironment (TME) and, occasionally, egress to the circulation causing extramedullary disease. Homing: The interaction of the CXCL12 chemokine with its CXCR4 receptor, mediates homing, lodging and retention of both normal and malignant plasma cells into the BM. CXCL12–CXCR4 interaction upregulates the activity of the α4β1 integrin, allowing high binding to its ligand VCAM-1 expressed on the BM microvasculature. Other important adhesion molecules mediating MM cell homing into the BM are the α4β7 integrin, a receptor for MAdCAM-1 and fibronectin, and PSGL-1 which interacts with P- and E-selectin expressed on the endothelial cell surface. MM cell survival and proliferation: Inside the BM milieu, BM mesenchymal stromal cells (BMSC) secrete high levels of CXCL12 that, along with α4β1, α4β7, and αLβ2 integrins, as well as CD44, are important for anchoring and retention of MM cells into BM niches. During this stage, survival and proliferation of malignant plasma cells is contributed by two main soluble mediators, a proliferation-inducing ligand (APRIL) and B-cell activating factor (BAFF), which bind B-cell maturation antigen (BCMA) in the cancer cell surface, and IL-6, whose receptor is also expressed on MM cells. In MM patients there is a pathological osteolineage imbalance with reduced osteoblasts in favor of osteoclasts which produce lytic lesions. BM osteoblastic niche facilitates the dormancy of MM cells, while osteoclasts induce MM cell reactivation. Extramedullary disease: In this context, cancer cells become independent from the TME, and CXCR4 function or expression is downregulated, an event that also occurs after bortezomib (BTZ) treatment. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) can also bind to CXCR4, inducing the expression of adhesion molecules. Expression of CCR1 chemokine receptor is linked to MM plasma cell circulation.

3. Bone Marrow Niche

3.1. Bone Marrow Niche and Stromal Cells

The BM harbors hematopoietic and non-hematopoietic cells, as well as non-cellular components such as extracellular matrix (ECM) proteins and soluble factors, which work together to maintain the HSC pool and its descendants, the lineage-committed hematopoietic progenitor cells (HPCs) [41–43]. The non-hematopoietic cell pool includes mesenchymal stem cells (MSC) and their descendant stromal cells, as well as endothelial cells and pericytes, adipocytes, osteolineage cells and osteoclasts, and sympathetic neurons with their associated Schwann cells. Two HSC niches supporting normal hematopoiesis, the vascular and the endosteal niches, contain different cellular types, express distinct soluble factors required for HSC maintenance, retention, and proliferation, and also include HPCs

which can also regulate the HSC compartment [41–43]. Yet, as the endosteal region of the BM is highly vascularized, it is likely that some cell type overlap exists between the endosteal and vascular HSC niches. A large portion of HSC resides perivascularly mainly surrounding fenestrated sinusoidal blood vessels, which represent important sites of migration between blood and BM [42,44]. Several perivascularly-located BM mesenchymal stromal cell types have been identified, including CXCL12-abundant reticular (CAR) cells, leptin-receptor (LPR^+) expressing cells, *Nes*-Cre^{ER}, and *NG2*-Cre^{ER} cells [45]. These cells provide key factors for HSC retention, maintenance and proliferation in defined niches, such as CXCL12 and SCF (also named c-kit ligand), both expressed by LPR^+ perivascular stroma and by endothelial cells [41,42,45]. Furthermore, these mesenchymal stromal cells express adhesive molecular anchors for HSC, including α4β1 [46–48] and α5β1 integrin ligands [48–50], CD44 [48,51] and E-selectin [52,53]. Other soluble factors modulating but likely not required for HSC maintenance are bone morphogenetic proteins (BMP), IL-6, fibroblast growth factor (FGF) and Notch ligands [54–59], whereas transforming growth factor-β (TGF-β) induces HSC quiescence and self-renewal [60].

Other cell populations influencing the HSC niche include HSC descendants such as osteolineage cells, macrophages and megakaryocytes [41,42,45]. Moreover, BM skeletal stem cells (SSC) capable of generating colony-forming units-fibroblast (CFU-Fs) secrete HSC niche factors including angiopoietin 1, and $Nestin^+$ BM stromal cells or those expressing SCF or CXCL12 are enriched for CFU-Fs and regulate the formation of HSC niches [61–64]. Macrophages control CXCL12 expression in the BM environment and induce HSC mobilization [65,66], whereas megakaryocytes have been shown to associate with HSC at sinusoids [67–69]. Whether HSC and their progeny occupy identical, distinct, or overlapping spatial locations in the BM is actively being investigated. As macrophages and megakaryocytes represent HSC niche constituents, it could be proposed that HSC and their descendants take up overlapping spaces and share key soluble factors for differentiation [43].

Two other elements controlling HSC function are the oxygen tension and the sympathetic nerves [41–43]. The HSC niche is highly hypoxic, causing stabilization of the hypoxia-inducible factor 1-α (HIF-1α), which transcriptionally activates the expression of CXCL12 and CXCR4, therefore indirectly contributing to HSC retention [70–73]. Besides being vascularized, the BM is highly innervated, especially next to arterioles [74]. Nerve fibers and non-myelinating associated Schwann cells are required for regeneration of hematopoiesis after chemotherapy [60,75], and are needed for regulation of the circadian clock that controls the daily mobilization of HSC into blood, likely by modulating CXCL12 supply from the niche BM mesenchymal stromal cells [76].

3.2. Bone Marrow Niches for Normal Plasma Cells

Plasma cells require extrinsic factors for their migration to and survival in the BM [5,8,77,78]. As mentioned above, BM mesenchymal stromal cells secrete high levels of CXCL12 [79–81], which is a critical factor for attracting and lodging $CXCR4^+$ normal plasma cells in the BM [8,9,82]. Thus, plasma cells from chimeric mice reconstituted with CXCR4-deficient fetal liver cells failed to accumulate in the BM [9], and specific deletion of CXCR4 in mature B cells led to a severe reduction in plasma cells in the BM [10]. Notably, using CXCL12-GFP knock-in mice, Tokoyoda et al. demonstrated that plasma cells are in contact with processes extended from CAR cells [10], suggesting that these cells constitute a favorable niche for normal plasma cells. Whether other stromal cell types also expressing CXCL12 such as LPR^+ cells, *Nes*-Cre^{ER} or *NG2*-Cre^{ER} cells represent lodging niches for plasma cells remains to be investigated.

Adhesion receptors provide plasma cell attachment to the BM microvasculature, as well as retention at appropriate niches. The Shp phosphatase activates the α4β1 integrin on plasma cells, stimulating their homing to the BM via cell attachment to VCAM-1 [83]. Blockade of the integrins α4β1 and αLβ2 (also called LFA-1) leads to a depletion of long-lived plasma cells from their BM niches [84,85]. The BM stromal cells that mediate

the lodging of plasma cells via α4β1 are positive for the expression of VCAM-1 [10,86]. Fibronectin harbors a α4β1 binding motif called CS-1 [87], and it has also been shown to provide plasma cell attachment and survival in BM niches [88]. The αLβ2 ligands on the stromal cells which could facilitate plasma cell lodging are currently unknown.

Several soluble mediators are needed for plasma cell survival and proliferation at suitable BM niches, including IL-6, as well as the B-cell maturation antigen (BCMA) ligands: a proliferation-inducing ligand (APRIL) and B-cell activating factor (BAFF) [5,8,78]. Different cell types supply these factors to the plasma cells. Recently, IL-6 was found to be mainly produced by perivascular cells in the BM [89], but other mesenchymal stromal cells might also contribute to IL-6 expression, especially upon contact with plasma cells [84,90]. Both IL-6 and APRIL are also produced by eosinophils [91], which was suggested to be required for the maintenance of plasma cells in the BM niche. Yet, two other reports concluded that eosinophils were not needed for plasma cell survival in the BM [92,93]. Megakaryocytes are also a source of IL-6 and APRIL in the BM, and notably, megakaryocyte-deficient c-mpl mice display a reduction in plasma cell numbers [94], indicating that megakaryocytes are critical components of the plasma cell BM niche. The involvement of the BAFF–BCMA-dependent signaling on plasma cell survival has been suggested [95], but it remains to be formally demonstrated.

3.3. Bone Marrow Niches for Myeloma Cells

3.3.1. The Premetastatic Niche

The BM microenvironment not only regulates HSC and HPC homeostasis but can also promote the expansion of hematologic tumor cells [6,7]. The BM stromal cells and ECM components are essential for the establishment of premetastatic niches, which attract and maintain incoming tumor cells. Upon lodging, the malignant cells locally transform the BM niche phenotype through altered release of cytokines and growth factors, and by remodeling adhesion receptor-mediated cell–cell contacts, ultimately educating their own growth and survival at the expense of the rest of the cell community of the microenvironment [6,41].

The presence of genetic mutations in BM stromal cells has been proposed to generate a local BM region with selective growth pressure in favor of tumor cells, as was demonstrated during BM transplantation [41]. As an example, transplant studies in RARγ$^{-/-}$ mice displaying myeloproliferative syndromes revealed that this disease was non-hematopoietic cell-intrinsic instead of being hematopoietic cell-autonomous [96], which involved a TNF-α-triggered pro-inflammatory environment, and therefore suggesting the participation of the BM microenvironment in hematopoietic disorders. Another example is represented by activating mutations in *PTPN11* in BM MSCs, which promote the development and progression of myelomonocytic leukemia [97]. In this case, secretion by BM MSCs of the chemokine CCL3 stimulated the recruitment of inflammatory monocytes, causing an increase in inflammation based on IL-1β activity, which favored the expansion of BM MSCs, osteoblasts, and fibroblasts [97]. Together, these data reveal that the induction by BM stromal cells of an inflammatory microenvironment contributes to malignant cell growth [6,7]. Whether premetastatic niches harboring MSCs with genetic alterations previous to MM cell lodging could predispose to the survival and expansion of MM cells remains an interesting possibility to be addressed.

Exosomes are intraluminal vesicles of the multivesicular bodies, which are formed by invagination and budding of the late endosomal membrane. They are released after the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane and differ from other extracellular vesicles by their small size (30–150 nm) [98,99]. Exosomes represent a source of local and long-distance transfer of molecular information that can reach cell components of the BM microenvironment, and which might alter their phenotype to foster a suitable premetastatic niche for expansion and drug resistance of arriving tumor cells [98,99]. These vesicles are released by all types of cells in the body, including MSCs, stromal, and endothelial cells, fibroblasts, osteoclasts, osteoblasts and immune cells [98,100]. Exosome cargo includes DNA, mRNAs and miRNAs, integrins, growth factors, signal transduction

molecules, and metabolic enzymes [100]. Vascular disruption and leakiness, angiogenesis, suppression of immune responses, and alterations in the composition of the ECM represent common responses promoted by exosomes in the premetastatic niche [98]. In MM, it has been shown that MM cells alter BM-derived cells to secrete exosomes that generate a welcome and growth-supporting environment that stimulate the dissemination of the malignant plasma cells [101,102]. Furthermore, exosomes influence the migration of pre-osteoclasts as well as osteoclast differentiation, involving activation of CXCR4-dependent signaling that leads to upregulation of osteoclast markers [103]. As pointed out above, exosomes carry and deliver miRNAs to target cells. Roccaro et al. showed that the miRNA content in exosomes from MM-MSCs was different from that of normal MSCs, with a higher content of oncogenic proteins, cytokines, and adhesion molecules [101]. Moreover, they showed a reduction in miR-15a in MM-MSC exosomes compared to normal counterparts. In addition, it has been reported that exosomal miR-135b shed from hypoxic MM cells stimulates angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1 [104].

3.3.2. Finding the Right Niches

After the adhesive and migratory events controlling MM cell entrance into the BM microenvironment and trafficking inside the BM [16], malignant cells must find suitable niches, including premetastatic ones, for their survival, proliferation, and resistance to chemotherapy. Experimental evidence suggests that tumor cells compete with normal hematopoietic cells for niche occupancy [105–107], though they seem to become independent from niche control during disease progression. MM cells probably use identical cellular and extracellular components in the BM microenvironment as their normal plasma cell counterparts to look for and develop a favorable niche. A CXCL12-rich environment is a likely niche for attraction and retention of $CXCR4^{+}$ MM cells. Notably, blockade of the CXCL12–CXCR4 interaction causes MM cell release to circulation [13,14]. Therefore, CXCL12-expressing mesenchymal stromal cells including CAR cells should be considered constituents of MM cell niches. In addition, similar to normal plasma cells, MM cells become anchored to BM niches where ligands for the α4β1 and α5β1 integrins, as well for CD44, are expressed [31,32].

Patients with MM have a pathological imbalance with depletion of osteoblasts in favor of proliferation and activation of bone-resorbing osteoclasts [31,108–110]. Like solid tumors displaying BM tropism [111], it has been proposed that the BM osteoblastic niche might facilitate the dormancy of MM cells, whereas the vascular niche could promote tumor cell proliferation in the BM [112]. Thus, it was recently shown that MM cells colonize and reside in the bone niche, in close proximity with osteoblasts [112]. This osteoblastic niche stimulates the survival of MM cells by triggering a dormant or quiescence state, which is turned off upon remodeling of the endosteal niche by osteoclasts, leading to reactivation of MM cells and their displacement from the niche [113,114]. Therefore, extrinsic factors remodeling the niche contribute to the release of these cells from dormancy and MM cell expansion.

Likely contributions to the suppression of osteoblastic activity in BM niches and to the induction of lytic bone lesions in MM patients include the deregulation of the Wnt and Notch signaling pathways, and the blockade of Runx2-dependent functions [115]. For instance, DKK1, an MSC-secreted Wnt pathway inhibitor and whose expression is elevated in BM from MM patients, binds to the LRP5/6 receptor, thus preventing Wnt signaling, and leading to β-catenin translocation to the nucleus and ultimately causing bone lesions [116–118]. Furthermore, Wnt5, an abundant growth factor in the BM of MM patients, binds to its receptor ROR2 and mediates MM cell interactions with BM stromal cells [119], and notably, ROR2 depletion leads to detachment of MM cells from their BM niche [120]. Interestingly, inhibition of Notch signaling leads to a reduction in CXCR4-dependent MM cell homing to and infiltration in the BM [121], and Dll1- and Jagged1-induced Notch activation accelerates MM disease by promoting MM cell proliferation [122,123]. With regard to Runx2, its osteoblastogenic activity is suppressed

by MM cells, causing osteolysis [109,124]. This suppression is in part mediated by MM cell–osteoblast contacts dependent on α4β1–VCAM-1 interaction [29,124], and also by IL-7 [124].

3.3.3. Educating the BM Niche

Upon stabilization of the MM niche, malignant plasma cells reprogram the local BM microenvironment, either by direct contact with stromal, endothelial or osteolineage cells, or involving the stimulation of supportive cytokines for MM cells, and by facilitating immune evasion [6,7]. These responses provide further expansion signals for MM cells, which become gradually independent from initial normal niche support, leading to the generation of a favorable TME. Notably, MM-MSCs display distinct gene profiles from normal MSC counterparts [125,126]. Furthermore, as mentioned above, MM cells can now act at a distance to prepare further premetastatic niches for tumor dissemination in other bone regions, by releasing cytokines, growth factors, and exosomes that remodel the ECM at these new sites [32,98,101,127].

The direct contacts between MM cells and the surrounding stroma stimulate several signaling pathways such as PI3K/Akt, MAPK, Wnt and Notch, and the induction of NF-κB signaling, leading to upregulation of IL-6, VEGF, IGF-1 and GDF15 expression, as well as increased expression of anti-apoptotic proteins [25,31,32,108,128,129]. In addition to the non-hematopoietic cell components, the TME encompasses hematopoietic cells which might have anti-tumor functions such as T cells and NK cells, or tumor-promoting activity including macrophages, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and regulatory T cells (Tregs) [32,127,130–132]. The complex relationships between MM cells and the cellular components, exosomes, ECM and soluble factors of the TME, overall generate a permissive microenvironment favoring MM cell growth and disease progression. Excellent reviews specifically describing the role of non-hematopoietic cells in MM development and progression have been recently presented [32,127,133,134], and thus we are not discussing it in the present review.

4. Myeloid Cells Involved in MM Progression

4.1. Macrophages

Macrophages are one of the main components of the tumor microenvironment in MM [135]. They are terminally differentiated myeloid cells derived from monocytic precursors and can be typically divided into two subgroups according to their functional role. The "classically activated" or M1 macrophages act as antitumoral agents by secreting pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species and nitric oxide while expressing high levels of MHC Class II. On the contrary, "alternatively activated" or M2 macrophages, in which tumor-associated macrophages (TAMs) are included, play an immunosuppressive role that facilitates tumor progression and are characterized by high expression levels of scavenging (CD163) and mannose (CD206) receptors, arginase and the production of IL-10, VEGF and matrix metalloproteinases (MMP). The M1/M2 polarization depends on the activation signaling present in the environment: Th1-derived cytokines such as interferon-γ (IFN-γ) and bacterial products, including bacterial lipopolysaccharides (LPS), promote M1 differentiation, whereas Th2-derived cytokines like IL-10 and glucocorticoid hormones drive the differentiation of macrophages towards an M2 phenotype [136,137]. In MM, it has been reported that both tumor cells and BM mesenchymal stromal cells produce chemokines such as CXCL12, CCL2, CCL3, and CCL14 that promote macrophage migration to the tumor niche and polarize macrophages towards an M2-like phenotype in vitro (Figure 2) [138–140]. Moreover, inhibition of the Jak1/2 pathway by Ruxolitinib or blockade of the colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) seems to inhibit the differentiation of these pro-tumoral macrophages [139,141,142].

Several clinical studies associate high infiltration of M2 macrophages in BM from MM patients with poor prognosis and worse response to chemotherapy and autologous stem cell transplantation (ASCT), whereas patients with high infiltration of M1 macrophages

showed better outcomes [139,143,144]. In fact, although M2 macrophages can be detected in BM from MM independently of the stage disease, the grade of infiltration and its correlation with poor prognosis is notable within relapsed MM patients compared to patients with MGUS or SMM [138,145]. In line with these data, some serum receptors such as soluble CD206 and CD163, as well as chemokines like CCL2 and MIF have been proposed as biomarkers for disease progression, prognosis and treatment response [38,146–148].

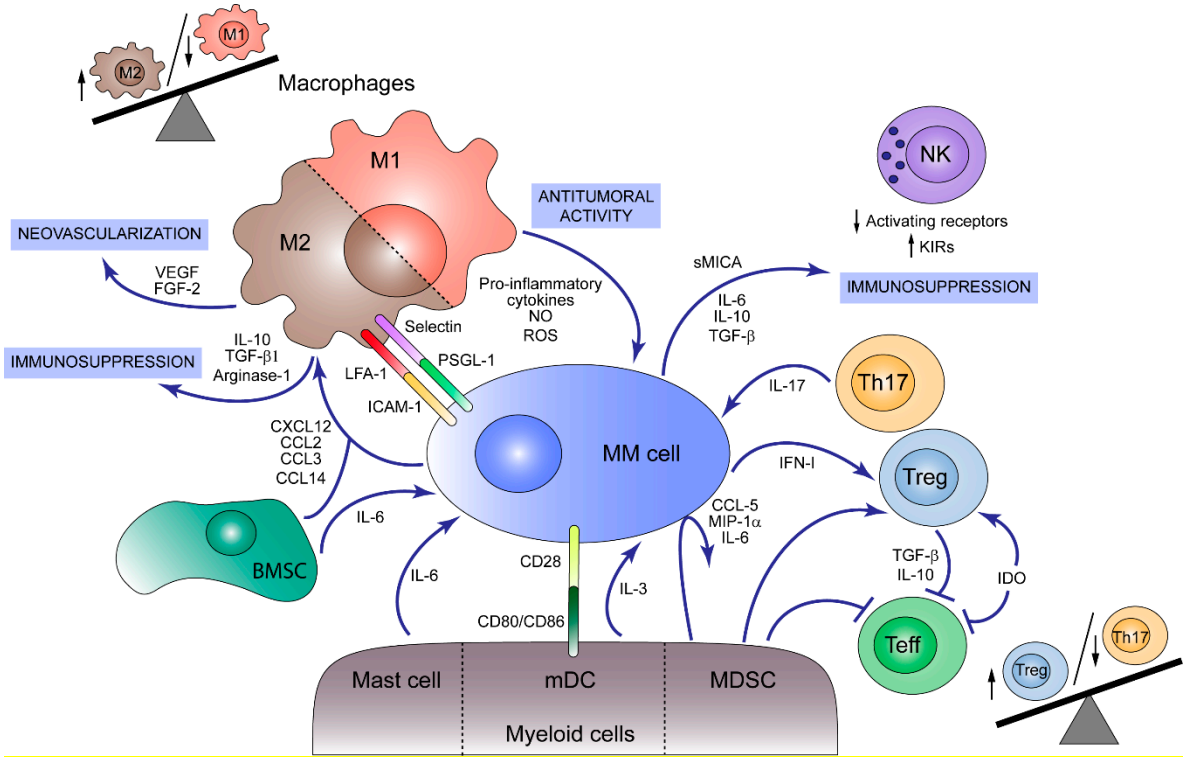


Figure 2. Immunosuppressive tumor microenvironment (TME) in multiple myeloma (MM). Both myeloid and lymphoid cells present in bone marrow (BM) participate in MM development. M1 macrophages act as antitumoral agents producing pro-inflammatory cytokines, nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) and acting as antigen-presenting cells (APC) that activate immune response against MM cells. MM cells and BM mesenchymal stromal cells (BMSCs) produce the chemokines CXCL12, CCL2, CCL3, and CCL14, which promote macrophage M2 polarization and migration to the tumor niche, unbalancing M1/M2 ratio towards the M2 population. M2 macrophages play a pro-tumoral role secreting immunosuppressive agents such as IL-10, TGF-β1 and Arginase-1 and neovascularization factors like VEGF and FGF-2. M2 macrophages act as MM cell protectors through the expression of selectins and LFA-1 in the macrophage surface, which binds to PSGL-1 and ICAM-1 in the plasma cell, respectively. Mast cells, although contributing to an initial tumoricidal host response, secrete IL-6 which promotes MM cell growth. Myeloid dendritic cells (mDCs) foster MM cell proliferation and survival by cell–cell interactions with tumor cells via CD80/CD86-CD28 and secretion of IL-3. Additionally, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) induce the secretion of cytokines such as CCL5, MIP-1α and IL-6 by MM cells and modulate the cytotoxic T cell responses inhibiting effector T cell functions and activating regulatory T cells (Treg). Other signals that promote Treg cell expansion are IFN-I, produced by MM cells, and indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) activity which at the same time inhibits effector T cells. Cytokines produced by Tregs, such as IL-10 and TGF-β, together with other MM cell-derived signals attenuate effector T cell function. Th17 lymphocytes are also present in BM from MM patients and foster tumor growth through IL-17 secretion. NK cell cytotoxic activity is modulated during disease progression by cytokines and soluble factors (e.g., sMICA) secreted by MM cells that induce a reduction in activating receptors and an increase in inhibitory receptors (KIRs).

M2 macrophages play key roles in myeloma progression, and they are involved in the emergence of drug-resistant tumor cells. In vitro studies have shown that TAMs induce myeloma cell proliferation and protect them from chemotherapy-induced apoptosis [135,138,141,149,150]. Despite the positive outcomes obtained in MM patients

with bortezomib treatment, results showed that this proteasome inhibitor also promotes the accumulation of pro-inflammatory macrophages and fosters MM cell survival and aggressiveness linked to MM disease progression, which could represent one of the mechanisms associated with MM resistance to bortezomib [151]. Moreover, depletion of macrophages or blockade of M2-polarization in murine MM models inhibits tumor growth and disease progression in vivo, and enhances survival after stem cell transplantation, providing strong evidence that macrophages are important for myeloma progression and a promising therapeutic target [142,152,153].

Understanding the mechanisms by which macrophages protect myeloma cells and support their survival will provide new targets for anti-MM therapies. The inhibition of the interaction between myeloma cells and macrophages via PSGL-1/selectins and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)/LFA-1 compromised macrophage-mediated protection in vitro, suggesting that cell–cell contact between surface proteins in MM cells and macrophages is important for macrophage-mediated protection of myeloma cells from chemotherapy-induced apoptosis [22,135,150]. Macrophages are also involved in neovascularization through vasculogenic mimicry [154]. VEGF and FGF-2 along with other pro-angiogenic factors promote macrophage recruitment and activation to mimic MM endothelial cells and collaborate with them in vessel formation [155,156]. Furthermore, it was shown that macrophages play a direct role in MM tumor cell homing and migration in vitro [153], while they inhibit T cell proliferation by generating an immunosuppressive environment that favors tumor development [138].

Nevertheless, macrophages can play an opposite role as tumoricidal agents. Infiltrating macrophages can act as antigen-presenting cells (APC) exposing myeloma antigens that activate Th1 $CD4^+$ lymphocytes [142,157,158], which reciprocally induce macrophage differentiation to an M1-phenotype by an IFN-γ-dependent mechanism. These M1 macrophages induce myeloma tumor cell death by activation of the intrinsic apoptotic pathway [159], and secrete CXCL9 and CXCL10, two angiostatic chemokines that contribute to the control of tumor development [160]. However, some myeloma cells are able to modulate antigen secretion, leading to the escape from this immunosurveillance mechanism [161,162]. In this sense, macrophage reprogramming by granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), added to the blockade of MIF could have a potential anti-myeloma therapeutic effect [163].

4.2. Myeloid-Derived Suppressor Cells

Apart from macrophages, some myeloid lineages present in the BM microenvironment play a key role in MM progression. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), a heterogeneous group of immature cells and their precursors, which can be divided into granulocytic (G-MDSC) and monocytic (M-MDSC), are well-described in the niche of this tumor. Several groups have reported a significant increase in MDSCs in BM from MM patients compared to those from MGUS and healthy donors (HD) [164–169]. Likewise, the frequency of M-MDSCs correlates with the amount of M protein detected in serum, and a failure to achieve, at least, a very good partial response (VGPR) after treatment with lenalidomide [164]. By contrast, the use of this common drug in MM has other contradictory actions regarding MDSCs, such as the notable repression of MDSC induction from peripheral blood cells (PBMCs) [170], and the downregulation of programmed death-ligand1 (PD-L1) expression on this myeloid subtype [171]. MDSCs mightily take part in MM progression, as they can induce Treg differentiation [169,170], decrease in T cell proliferation [172], promote MM proliferation [173] and angiogenesis, and even differentiate themselves into functional osteoclasts [165,170]. All these actions could be caused by the MDSCs' ability to take up MM exosomes through membrane fusion. These vesicles promote MDSC survival by activating STAT-3 and STAT-1 pathways, and by increasing the levels of anti-apoptotic proteins Bcl-xL and Mcl-1 [174,175]. Furthermore, some studies have revealed that MM cells secrete cytokines such as CCL5, MIP-1α [170] and large amounts of IL-6 when MDSCs are present [167,170,173], suggesting that not only do MDSCs contribute to MM progres-

sion by direct cell–cell contact or exosome intercellular communication, but also through cytokine secretion.

4.3. Other Myeloid Cells

Other myeloid cells such as dendritic cells (DCs), neutrophils, eosinophils, mast cells and platelets are involved in MM development in different ways.

Some studies have demonstrated that both myeloid DCs (mDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs) accumulate in BM during the progression from MGUS to MM [176,177], but their functionality is impaired. pDCs from MM BM are incapable of triggering T-cell proliferation compared to pDCs from HD [177,178] and they can promote osteolysis through IL-3 secretion. This cytokine also stimulates pDCs survival and MM cell growth [177]. Migration and secretion of the cytokines IL12p70 and IFN-γ are significantly reduced in vitro in monocyte-derived DCs generated from MM patients. This impaired functionality could be caused by autocrine secretion of IL-6 and activation of the p38 MAPK pathway, both affecting CCR7-dependent migration [179]. Additionally, mDCs support MM proliferation and survival via engagement of CD80/CD86 receptors with their ligand CD28 expressed on MM cells [176].

Neutrophils have also been described to play a role in MM progression. High-density neutrophils (HDNs) present in MM BM exhibit different morphology and phenotype compared to those from HD [180,181]. Five genes (CSK, GSA, MEGF, PGM1, and PROK2), which are especially associated with MGUS-to-MM progression, have been reported to be up-regulated in HDNs from MM patients. Furthermore, these neutrophils show an impaired phagocytosis and oxidative burst in MM [180] while they are able to decrease T cell proliferation, suggesting an immunosuppressive effect of HDNs in the MM microenvironment. Surprisingly, only mature neutrophils, and not any other granulocytic subset, have a significant impact on progression-free survival (PFS) of MM patients [182].

The role of eosinophils in MM progression remains controversial. Although eosinophils have been found in close proximity to plasma cells within the BM [183] and they are known to secrete the soluble factors APRIL and IL-6 [91,92], which somehow could be involved in MM cell proliferation, it remains unclear whether their activity is relevant to BM plasma cells maintenance [91] or not [93,184].

Mast cells and platelets have been also described to have an impact on MM progression. Although mast cells accumulate in the BM to display tumoricidal activity as a host response, they also secrete other factors inducing MM growth, such as IL-6, promoting angiogenesis and participating, mainly indirectly, in MM bone disease [185]. Similarly, platelets are highly activated during MM progression, and their activation status correlates with disease progression from MGUS to SMM and MM [186].

5. Lymphoid Cells and Bone Marrow Niche for MM Exacerbation

In addition to the previously discussed subtypes of immune cells, T cell populations are altered in MM patients and switch along with the disease progression. A higher number of Th17 cells has been detected in peripheral blood (PB) and BM from MM patients, and although secreted IL-17 fosters tumor growth [187], an increased population of Th17 cells has been also described in Long-Term Survival (LTS)-MM patients [188]. In this study, Bryant et al. showed that the Treg/Th17 ratio increased in MM patients, but it was lower in LTS-MM subjects. Treg cells produce TGF-β and IL-10, cytokines essential to maintain self-tolerance as they repress effector T cell proliferation. However, an anomalous Treg proliferation or activity could result in immune dysfunction. The role of Tregs in MM has remained controversial and some authors assigned an important but not major role to Treg cells in the progression from MGUS to MM [189]. Nevertheless, analysis of BM-infiltrated T cell populations has detected a higher frequency of activated Tregs in untreated MM patients compared to HD, which was associated with a shorter PFS [190–192]. Myeloma-cell-secreted type 1 IFN has been suggested as a mediator of Treg activation and expansion in a syngeneic transplantable murine myeloma model, in which treatment with a blocking

IFNAR1 antibody inhibited myeloma progression [193]. Moreover, APRIL, mainly secreted by myeloid cells and osteoclasts, induces proliferation and survival of Tregs in MM [167], and the increased activity found in MM patients of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), an inducible enzyme that catalyzes tryptophan to kynurenine, led to inhibition of effector T cell function and induction of Treg differentiation [194]. A recently reported subpopulation of Treg $CD38^+$ was found to be more immunosuppressive than Tregs $CD38^-$ and were decreased in patients treated with daratumumab suggesting an additional mechanism of action for this anti-CD38 antibody used to treat MM patients. [195].

Immune checkpoints have been described as tumor escape mechanisms in different types of cancer. PD-1 and PD-L1 are highly expressed in T cells and plasma cells of MM patients, respectively [196,197]. Furthermore, the expression levels of PD-L1 have been proposed as a prognosis predictor in newly diagnosed MM patients [198]. However, anti-PD-1 blockade therapy has shown limited clinical benefits in MM patients and serious adverse events have been reported in combination with immunomodulatory drugs (IMiDs) therapies [199,200]. The presence of expanded $CD8^+$ T cell clones has been associated with good prognosis in MM. Suen et al. described that these lymphocytes express low levels of anergic or exhausted markers (LAG-3, Tim-3, PD-1, and CTLA-4) while displaying a senescent profile (KLRG-1^+, $CD57^+$, $CD160^+$, and $CD28^-$) [201]. In addition, high-dimensional single-cell RNA-sequencing (scRNA-Seq) and mass cytometry analysis unveiled that T cells in MGUS are enriched in stem-like memory profile whilst MM patients show higher lytic genes (e.g., Granzyme A) and senescence marker expression [202]. Notably, these results contrast with a study from Zelle-Rieser et al. describing both exhaustion and senescence T cell profiles in MM [203]. Additionally, other molecules such as carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-6 (CEACAM-6) expressed in MM plasma cells inhibit T cell activation and their cytotoxic response against MM cells [204].

One additional role has been described for T cells in the development of MM lytic bone lesion. Osteoclast differentiation and activation are induced by binding of the receptor activator of nuclear factor-κB (RANK) to its ligand (RANKL) expressed in stromal/osteoblastic cells and activated T lymphocytes. RANKL over-expression in T cells is induced by MM cells [205]. Cytokines such as IL-3 and IL-17 have also been associated with lytic bone lesions in MM [124,206]. In addition, $CD4^+$ T cells from MM patients but not from MGUS subjects produce IL-3 [207], a cytokine with both osteoclastogenic and antiosteoblastic effects, and it was shown that IL-17 BM plasma levels correlate with the grade of bone disease [208].

Natural Killer (NK) cells play an important role in immune surveillance against viral infections and cancer. The NK response or tolerance against target cells depends on the balance between stimulatory and suppressive signals through their activating and inhibitory receptors. The reported proportion of NK cells in MM is controversial. Some data revealed a decreased population of NK cells in MM patients [209]. By contrast, other studies showed an increased number of NK cells in BM and PB of MM patient samples [210], although the NK cell cytotoxic activity is reduced and further decreases in advanced stages of this disease [211,212]. Reduction in activating receptors (NKG2D, DNAM-1, CD161) and increased expression of CD158a inhibitory Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR) has been described in NK cells from MM patients [213–216]. In addition, tumor growth in a murine model of MM induces dysregulation of CXCR3 and CXCR4/ligand expression, which results in a reduction in more functional KLRG1^- NK cell subsets in bone marrow [217]. Moreover, NKT cells, an immune population that expresses both T cell and NK cell receptors, also present limited cytotoxic capacity in MM patients [218].

Apart from the aforementioned cytokines and chemokines that regulate MM disease, additional soluble components present in the BM milieu may also be involved in MM exacerbation. Extracellular adenosine (ADO) is an immunosuppressive metabolite whose levels in BM plasma correlate with disease progression in MM [219]. ADO hampers antitumoral immune response through the reduction in $CD8^+$ and NK cell cytotoxic function and Th1 $CD4^+$ T-cell response, while increasing the proportion of Treg cells [220–223]. Adenosine

triphosphate (ATP), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) can be metabolized by ectoenzymatic pathways to generate ADO. The canonical pathway starts from extracellular ATP and involves the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase CD39 and the 5′-nucleotidase CD73 [224]. Furthermore, an alternative route entailing the NAD^+-glycohydrolase CD38, the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase CD203a and CD73 has also been described [225]. CD39 is localized on the plasma membrane of regulatory T and B cells, and recent studies have also shown its expression in malignant plasma cells from MM patients [226]. Meanwhile, CD38 is expressed in T, B, NK and myeloid cells, and at higher levels in MM cells. Although the ectoenzymes from canonical and non-canonical pathways are present in the MM BM niche, some authors suggested that the hypoxic acidic environment might hinder CD39 enzymatic activity [224], and thus the implication of each pathway for ADO generation in MM has yet to be defined.

Another important factor is the soluble major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA), liberated by shedding from the MM cell surface, which downregulates Natural Killer receptor group 2 member (NKG2D) expression in NK and T cells and is a prognostic factor for the overall survival (OS) and PFS of MM patients [227,228].

6. Conclusions

The BM microenvironment is essential for MM disease establishment and progression. MM plasma cell trafficking and homing to the BM are regulated by soluble factors, mainly chemokines such as CXCL12, as well as by direct cell–cell interactions through adhesion molecules expressed by plasma and bone marrow-resident cells. Once inside the BM niche, MM plasma cells transform the microenvironment through the secretion of cytokines and growth factors, which along with BM stromal cell activity induce additional mechanisms implicated in MM plasma cell retention, proliferation and drug resistance. Some patients develop extramedullary disease, caused by changes in chemokine receptor expression or function in plasma cells, and also by the MM plasma cell independency of survival factors from BM niche.

The immunosuppressive TME generated by deficient antigen presentation, effector cell dysfunction, proliferation of immunosuppressive cell populations, and high levels of immunosuppressive soluble factors allows the MM cell to escape from the immunosurveillance mechanisms. Targeting the molecular links between MM plasma cells and the bone marrow niche and restoring the homeostasis of the immune system should be crucial steps to cure myeloma disease.

Author Contributions: A.G.-O. and Y.R.-G. organized the content of manuscript, literature collection and writing; J.E., E.M.-M. and E.C. were involved in the literature collection and writing; J.T. and J.M.-L. were involved in the organization and proofreading of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Research Institute Hospital 12 de Octubre (i+12) and grants PI18/01519 from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and from the CRIS foundation to J.M.-L.; and grant SAF2017-85146-R from Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities to J.T. A.G.-O. is supported by a Fellowship from the Spanish Society of Hematology and Hemotherapy. J.E. is supported by a Fellowship from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (IFI18/00034). E.M.-M. is supported by a Fellowship from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI18/01519). E.C. is supported by a Fellowship from Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (FPU18/02963).

Conflicts of Interest: The authors declare no potential conflict of interest.

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA A Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 7–34. [CrossRef] [PubMed]
2. Kumar, S.K.; Rajkumar, V.; Kyle, R.A.; van Duin, M.; Sonneveld, P.; Mateos, M.V.; Gay, F.; Anderson, K.C. Multiple myeloma. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17046. [CrossRef] [PubMed]
3. Redondo-Munoz, J.; Garcia-Pardo, A.; Teixido, J. Molecular Players in Hematologic Tumor Cell Trafficking. *Front Immunol.* **2019**, *10*, 156. [CrossRef] [PubMed]

4. Ghobrial, I.M. Myeloma as a model for the process of metastasis: Implications for therapy. *Blood* **2012**, *120*, 20–30. [CrossRef]
5. Chu, V.T.; Berek, C. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol. Rev.* **2013**, *251*, 177–188. [CrossRef]
6. Méndez-Ferrer, S.; Bonnet, D.; Steensma, D.P.; Hasserjian, R.P.; Ghobrial, I.M.; Gribben, J.G.; Andreeff, M.; Krause, D.S. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*, 285–298. [CrossRef]
7. Ghobrial, I.M.; Detappe, A.; Anderson, K.C.; Steensma, D.P. The bone-marrow niche in MDS and MGUS: Implications for AML and MM. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, *15*, 219–233. [CrossRef]
8. Lindquist, R.L.; Niesner, R.A.; Hauser, A.E. In the Right Place, at the Right Time: Spatiotemporal Conditions Determining Plasma Cell Survival and Function. *Front Immunol.* **2019**, *10*, 788. [CrossRef]
9. Hargreaves, D.C.; Hyman, P.L.; Lu, T.T.; Ngo, V.N.; Bidgol, A.; Suzuki, G.; Zou, Y.R.; Littman, D.R.; Cyster, J.G. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* **2001**, *194*, 45–56. [CrossRef]
10. Tokoyoda, K.; Egawa, T.; Sugiyama, T.; Choi, B.I.; Nagasawa, T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* **2004**, *20*, 707–718. [CrossRef]
11. Nie, Y.; Waite, J.; Brewer, F.; Sunshine, M.J.; Littman, D.R.; Zou, Y.R. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J. Exp. Med.* **2004**, *200*, 1145–1156. [CrossRef] [PubMed]
12. Moller, C.; Stromberg, T.; Juremalm, M.; Nilsson, K.; Nilsson, G. Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma. *Leukemia* **2003**, *17*, 203–210. [CrossRef] [PubMed]
13. Alsayed, Y.; Ngo, H.; Runnels, J.; Leleu, X.; Singha, U.K.; Pitsillides, C.M.; Spencer, J.A.; Kimlinger, T.; Ghobrial, J.M.; Jia, X.; et al. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood* **2007**, *109*, 2708–2717. [CrossRef] [PubMed]
14. Azab, A.K.; Runnels, J.M.; Pitsillides, C.; Moreau, A.S.; Azab, F.; Leleu, X.; Jia, X.; Wright, R.; Ospina, B.; Carlson, A.L.; et al. CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. *Blood* **2009**, *113*, 4341–4351. [CrossRef]
15. Sanz-Rodriguez, F.; Hidalgo, A.; Teixido, J. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* **2001**, *97*, 346–351. [CrossRef]
16. Martinez-Moreno, M.; Leiva, M.; Aguilera-Montilla, N.; Sevilla-Movilla, S.; Isern de Val, S.; Arellano-Sanchez, N.; Gutierrez, N.C.; Maldonado, R.; Martinez-Lopez, J.; Buno, I.; et al. In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by alpha4beta1 cytoplasmic-binding proteins. *Leukemia* **2016**, *30*, 861–872. [CrossRef]
17. Wright, N.; de Lera, T.L.; Garcia-Moruja, C.; Lillo, R.; Garcia-Sanchez, F.; Caruz, A.; Teixido, J. Transforming growth factor-beta1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: Functional consequences in cell migration and adhesion. *Blood* **2003**, *102*, 1978–1984. [CrossRef]
18. Neri, P.; Ren, L.; Azab, A.K.; Brentnall, M.; Gratton, K.; Klimowicz, A.C.; Lin, C.; Duggan, P.; Tassone, P.; Mansoor, A.; et al. Integrin β7-mediated regulation of multiple myeloma cell adhesion, migration, and invasion. *Blood* **2011**, *117*, 6202–6213. [CrossRef]
19. Hurt, E.M.; Wiestner, A.; Rosenwald, A.; Shaffer, A.L.; Campo, E.; Grogan, T.; Bergsagel, P.L.; Kuehl, W.M.; Staudt, L.M. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* **2004**, *5*, 191–199. [CrossRef]
20. Asosingh, K.; Gunthert, U.; De Raeve, H.; Van Riet, I.; Van Camp, B.; Vanderkerken, K. A unique pathway in the homing of murine multiple myeloma cells: CD44v10 mediates binding to bone marrow endothelium. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 2862–2865.
21. Snapp, K.R.; Ding, H.; Atkins, K.; Warnke, R.; Luscinskas, F.W.; Kansas, G.S. A novel P-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody recognizes an epitope within the tyrosine sulfate motif of human PSGL-1 and blocks recognition of both P- and L-selectin. *Blood* **1998**, *91*, 154–164. [CrossRef] [PubMed]
22. Azab, A.K.; Quang, P.; Azab, F.; Pitsillides, C.; Thompson, B.; Chonghaile, T.; Patton, J.T.; Maiso, P.; Monrose, V.; Sacco, A.; et al. P-selectin glycoprotein ligand regulates the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment. *Blood* **2012**, *119*, 1468–1478. [CrossRef] [PubMed]
23. Glavey, S.V.; Manier, S.; Natoni, A.; Sacco, A.; Moschetta, M.; Reagan, M.R.; Murillo, L.S.; Sahin, I.; Wu, P.; Mishima, Y.; et al. The sialyltransferase ST3GAL6 influences homing and survival in multiple myeloma. *Blood* **2014**, *124*, 1765–1776. [CrossRef]
24. Natoni, A.; Farrell, M.L.; Harris, S.; Falank, C.; Kirkham-McCarthy, L.; Macauley, M.S.; Reagan, M.R.; O'Dwyer, M. Sialyltransferase inhibition leads to inhibition of tumor cell interactions with E-selectin, VCAM1, and MADCAM1, and improves survival in a human multiple myeloma mouse model. *Haematologica* **2020**, *105*, 457–467. [CrossRef] [PubMed]
25. Lokhorst, H.M.; Lamme, T.; de Smet, M.; Klein, S.; de Weger, R.A.; van Oers, R.; Bloem, A.C. Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood* **1994**, *84*, 2269–2277. [CrossRef] [PubMed]
26. Sanz-Rodriguez, F.; Ruiz-Velasco, N.; Pascual-Salcedo, D.; Teixido, J. Characterization of VLA-4-dependent myeloma cell adhesion to fibronectin and VCAM-1. *Br. J. Haematol.* **1999**, *107*, 825–834. [CrossRef] [PubMed]
27. Michigami, T.; Shimizu, N.; Williams, P.J.; Niewolna, M.; Dallas, S.L.; Mundy, G.R.; Yoneda, T. Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and alpha(4)beta(1)-integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood* **2000**, *96*, 1953–1960. [CrossRef]

28. Podar, K.; Zimmerhackl, A.; Fulciniti, M.; Tonon, G.; Hainz, U.; Tai, Y.T.; Vallet, S.; Halama, N.; Jager, D.; Olson, D.L.; et al. The selective adhesion molecule inhibitor Natalizumab decreases multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment: Therapeutic implications. *Br. J. Haematol.* **2011**, *155*, 438–448. [CrossRef]
29. Mori, Y.; Shimizu, N.; Dallas, M.; Niewolna, M.; Story, B.; Williams, P.J.; Mundy, G.R.; Yoneda, T. Anti-alpha4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood* **2004**, *104*, 2149–2154. [CrossRef]
30. Olson, D.L.; Burkly, L.C.; Leone, D.R.; Dolinski, B.M.; Lobb, R.R. Anti-alpha4 integrin monoclonal antibody inhibits multiple myeloma growth in a murine model. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 91–99.
31. Anderson, K.C.; Carrasco, R.D. Pathogenesis of myeloma. *Annu. Rev. Pathol.* **2011**, *6*, 249–274. [CrossRef] [PubMed]
32. Bianchi, G.; Munshi, N.C. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood* **2015**, *125*, 3049–3058. [CrossRef] [PubMed]
33. Damiano, J.S.; Cress, A.E.; Hazlehurst, L.A.; Shtil, A.A.; Dalton, W.S. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): Role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* **1999**, *93*, 1658–1667. [CrossRef] [PubMed]
34. Noborio-Hatano, K.; Kikuchi, J.; Takatoku, M.; Shimizu, R.; Wada, T.; Ueda, M.; Nobuyoshi, M.; Oh, I.; Sato, K.; Suzuki, T.; et al. Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene* **2009**, *28*, 231–242. [CrossRef] [PubMed]
35. Garcés, J.J.; Simicek, M.; Vicari, M.; Brozova, L.; Burgos, L.; Bezdekova, R.; Alignani, D.; Calasanz, M.J.; Growkova, K.; Goicoechea, I.; et al. Transcriptional profiling of circulating tumor cells in multiple myeloma: A new model to understand disease dissemination. *Leukemia* **2020**, *34*, 589–603. [CrossRef] [PubMed]
36. Stessman, H.A.; Mansoor, A.; Zhan, F.; Janz, S.; Linden, M.A.; Baughn, L.B.; Van Ness, B. Reduced CXCR4 expression is associated with extramedullary disease in a mouse model of myeloma and predicts poor survival in multiple myeloma patients treated with bortezomib. *Leukemia* **2013**, *27*, 2075–2077. [CrossRef]
37. Tarnowski, M.; Grymula, K.; Liu, R.; Tarnowska, J.; Drukala, J.; Ratajczak, J.; Mitchell, R.A.; Ratajczak, M.Z.; Kucia, M. Macrophage migration inhibitory factor is secreted by rhabdomyosarcoma cells, modulates tumor metastasis by binding to CXCR4 and CXCR7 receptors and inhibits recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 1328–1343. [CrossRef]
38. Zheng, Y.; Wang, Q.; Li, T.; Qian, J.; Lu, Y.; Li, Y.; Bi, E.; Reu, F.; Qin, Y.; Drazba, J.; et al. Role of Myeloma-Derived MIF in Myeloma Cell Adhesion to Bone Marrow and Chemotherapy Response. *J. Natl. Cancer Inst.* **2016**, *108*. [CrossRef]
39. Vande Broek, I.; Leleu, X.; Schots, R.; Facon, T.; Vanderkerken, K.; Van Camp, B.; Van Riet, I. Clinical significance of chemokine receptor (CCR1, CCR2 and CXCR4) expression in human myeloma cells: The association with disease activity and survival. *Haematologica* **2006**, *91*, 200–206.
40. Vandyke, K.; Zeissig, M.N.; Hewett, D.R.; Martin, S.K.; Mrozik, K.M.; Cheong, C.M.; Diamond, P.; To, L.B.; Gronthos, S.; Peet, D.J.; et al. HIF-2alpha Promotes Dissemination of Plasma Cells in Multiple Myeloma by Regulating CXCL12/CXCR4 and CCR1. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 5452–5463. [CrossRef]
41. Hoggatt, J.; Kfoury, Y.; Scadden, D.T. Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease. *Annu. Rev. Pathol.* **2016**, *11*, 555–581. [CrossRef] [PubMed]
42. Crane, G.M.; Jeffery, E.; Morrison, S.J. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 573–590. [CrossRef] [PubMed]
43. Wei, Q.; Frenette, P.S. Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity* **2018**, *48*, 632–648. [CrossRef] [PubMed]
44. Kiel, M.J.; Yilmaz, O.H.; Iwashita, T.; Terhorst, C.; Morrison, S.J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **2005**, *121*, 1109–1121. [CrossRef] [PubMed]
45. Pinho, S.; Frenette, P.S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2019**, *20*, 303–320. [CrossRef]
46. Teixidó, J.; Hemler, M.E.; Greenberger, J.S.; Anklesaria, P. Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J. Clin. Investig.* **1992**, *90*, 358–367. [CrossRef]
47. Simmons, P.J.; Masinovsky, B.; Longenecker, B.M.; Berenson, R.; Torok-Storb, B.; Gallatin, W.M. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood* **1992**, *80*, 388–395. [CrossRef]
48. Vermeulen, M.; Le Pesteur, F.; Gagnerault, M.C.; Mary, J.Y.; Sainteny, F.; Lepault, F. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **1998**, *92*, 894–900. [CrossRef]
49. Lévesque, J.P.; Leavesley, D.I.; Niutta, S.; Vadas, M.; Simmons, P.J. Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J. Exp. Med.* **1995**, *181*, 1805–1815. [CrossRef]
50. Peled, A.; Kollet, O.; Ponomaryov, T.; Petit, I.; Franitza, S.; Grabovsky, V.; Slav, M.M.; Nagler, A.; Lider, O.; Alon, R.; et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: Role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* **2000**, *95*, 3289–3296. [CrossRef]
51. Schmits, R.; Filmus, J.; Gerwin, N.; Senaldi, G.; Kiefer, F.; Kundig, T.; Wakeham, A.; Shahinian, A.; Catzavelos, C.; Rak, J.; et al. CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* **1997**, *90*, 2217–2233. [CrossRef] [PubMed]
52. Frenette, P.S.; Subbarao, S.; Mazo, I.B.; von Andrian, U.H.; Wagner, D.D. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 14423–14428. [CrossRef] [PubMed]

53. Katayama, Y.; Hidalgo, A.; Furie, B.C.; Vestweber, D.; Furie, B.; Frenette, P.S. PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: Evidence for cooperation between E-selectin ligands and alpha4 integrin. *Blood* **2003**, *102*, 2060–2067. [CrossRef] [PubMed]
54. Singbrant, S.; Karlsson, G.; Ehinger, M.; Olsson, K.; Jaako, P.; Miharada, K.; Stadtfeld, M.; Graf, T.; Karlsson, S. Canonical BMP signaling is dispensable for hematopoietic stem cell function in both adult and fetal liver hematopoiesis, but essential to preserve colon architecture. *Blood* **2010**, *115*, 4689–4698. [CrossRef] [PubMed]
55. Bernad, A.; Kopf, M.; Kulbacki, R.; Weich, N.; Koehler, G.; Gutierrez-Ramos, J.C. Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity* **1994**, *1*, 725–731. [CrossRef]
56. Zhao, M.; Ross, J.T.; Itkin, T.; Perry, J.M.; Venkatraman, A.; Haug, J.S.; Hembree, M.J.; Deng, C.X.; Lapidot, T.; He, X.C.; et al. FGF signaling facilitates postinjury recovery of mouse hematopoietic system. *Blood* **2012**, *120*, 1831–1842. [CrossRef]
57. Karanu, F.N.; Murdoch, B.; Gallacher, L.; Wu, D.M.; Koremoto, M.; Sakano, S.; Bhatia, M. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1365–1372. [CrossRef] [PubMed]
58. Stier, S.; Cheng, T.; Dombkowski, D.; Carlesso, N.; Scadden, D.T. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* **2002**, *99*, 2369–2378. [CrossRef]
59. Maillard, I.; Koch, U.; Dumortier, A.; Shestova, O.; Xu, L.; Sai, H.; Pross, S.E.; Aster, J.C.; Bhandoola, A.; Radtke, F.; et al. Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem. Cell* **2008**, *2*, 356–366. [CrossRef]
60. Yamazaki, S.; Ema, H.; Karlsson, G.; Yamaguchi, T.; Miyoshi, H.; Shioda, S.; Taketo, M.M.; Karlsson, S.; Iwama, A.; Nakauchi, H. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* **2011**, *147*, 1146–1158. [CrossRef]
61. Sacchetti, B.; Funari, A.; Michienzi, S.; Di Cesare, S.; Piersanti, S.; Saggio, I.; Tagliafico, E.; Ferrari, S.; Robey, P.G.; Riminucci, M.; et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **2007**, *131*, 324–336. [CrossRef] [PubMed]
62. Chan, C.K.; Chen, C.C.; Luppen, C.A.; Kim, J.B.; DeBoer, A.T.; Wei, K.; Helms, J.A.; Kuo, C.J.; Kraft, D.L.; Weissman, I.L. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature* **2009**, *457*, 490–494. [CrossRef] [PubMed]
63. Mendez-Ferrer, S.; Michurina, T.V.; Ferraro, F.; Mazloom, A.R.; Macarthur, B.D.; Lira, S.A.; Scadden, D.T.; Ma'ayan, A.; Enikolopov, G.N.; Frenette, P.S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **2010**, *466*, 829–834. [CrossRef] [PubMed]
64. Omatsu, Y.; Sugiyama, T.; Kohara, H.; Kondoh, G.; Fujii, N.; Kohno, K.; Nagasawa, T. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* **2010**, *33*, 387–399. [CrossRef] [PubMed]
65. Chow, A.; Lucas, D.; Hidalgo, A.; Mendez-Ferrer, S.; Hashimoto, D.; Scheiermann, C.; Battista, M.; Leboeuf, M.; Prophete, C.; van Rooijen, N.; et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 261–271. [CrossRef]
66. Winkler, I.G.; Sims, N.A.; Pettit, A.R.; Barbier, V.; Nowlan, B.; Helwani, F.; Poulton, I.J.; van Rooijen, N.; Alexander, K.A.; Raggatt, L.J.; et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* **2010**, *116*, 4815–4828. [CrossRef]
67. Bruns, I.; Lucas, D.; Pinho, S.; Ahmed, J.; Lambert, M.P.; Kunisaki, Y.; Scheiermann, C.; Schiff, L.; Poncz, M.; Bergman, A.; et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1315–1320. [CrossRef]
68. Zhao, M.; Perry, J.M.; Marshall, H.; Venkatraman, A.; Qian, P.; He, X.C.; Ahamed, J.; Li, L. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1321–1326. [CrossRef]
69. Olson, T.S.; Caselli, A.; Otsuru, S.; Hofmann, T.J.; Williams, R.; Paolucci, P.; Dominici, M.; Horwitz, E.M. Megakaryocytes promote murine osteoblastic HSC niche expansion and stem cell engraftment after radioablative conditioning. *Blood* **2013**, *121*, 5238–5249. [CrossRef]
70. Staller, P.; Sulitkova, J.; Lisztwan, J.; Moch, H.; Oakeley, E.J.; Krek, W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* **2003**, *425*, 307–311. [CrossRef]
71. Danet, G.H.; Pan, Y.; Luongo, J.L.; Bonnet, D.A.; Simon, M.C. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J. Clin. Investig.* **2003**, *112*, 126–135. [CrossRef] [PubMed]
72. Ceradini, D.J.; Kulkarni, A.R.; Callaghan, M.J.; Tepper, O.M.; Bastidas, N.; Kleinman, M.E.; Capla, J.M.; Galiano, R.D.; Levine, J.P.; Gurtner, G.C. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 858–864. [CrossRef] [PubMed]
73. Takubo, K.; Goda, N.; Yamada, W.; Iriuchishima, H.; Ikeda, E.; Kubota, Y.; Shima, H.; Johnson, R.S.; Hirao, A.; Suematsu, M.; et al. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem. Cell* **2010**, *7*, 391–402. [CrossRef] [PubMed]
74. Kunisaki, Y.; Bruns, I.; Scheiermann, C.; Ahmed, J.; Pinho, S.; Zhang, D.; Mizoguchi, T.; Wei, Q.; Lucas, D.; Ito, K.; et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* **2013**, *502*, 637–643. [CrossRef]
75. Lucas, D.; Scheiermann, C.; Chow, A.; Kunisaki, Y.; Bruns, I.; Barrick, C.; Tessarollo, L.; Frenette, P.S. Chemotherapy-induced bone marrow nerve injury impairs hematopoietic regeneration. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 695–703. [CrossRef]
76. Mendez-Ferrer, S.; Lucas, D.; Battista, M.; Frenette, P.S. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* **2008**, *452*, 442–447. [CrossRef]
77. Cyster, J.G. Homing of antibody secreting cells. *Immunol Rev.* **2003**, *194*, 48–60. [CrossRef]

78. Nutt, S.L.; Hodgkin, P.D.; Tarlinton, D.M.; Corcoran, L.M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 160–171. [CrossRef]
79. Tashiro, K.; Tada, H.; Heilker, R.; Shirozu, M.; Nakano, T.; Honjo, T. Signal sequence trap: A cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* **1993**, *261*, 600–603. [CrossRef]
80. Nagasawa, T.; Kikutani, H.; Kishimoto, T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2305–2309. [CrossRef]
81. Bleul, C.C.; Fuhlbrigge, R.C.; Casasnovas, J.M.; Aiuti, A.; Springer, T.A. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* **1996**, *184*, 1101–1109. [CrossRef] [PubMed]
82. Hauser, A.E.; Debes, G.F.; Arce, S.; Cassese, G.; Hamann, A.; Radbruch, A.; Manz, R.A. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 1277–1282. [CrossRef] [PubMed]
83. Li, Y.F.; Xu, S.; Ou, X.; Lam, K.P. Shp1 signalling is required to establish the long-lived bone marrow plasma cell pool. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4273. [CrossRef] [PubMed]
84. Minges Wols, H.A.; Underhill, G.H.; Kansas, G.S.; Witte, P.L. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 4213–4221. [CrossRef]
85. DiLillo, D.J.; Hamaguchi, Y.; Ueda, Y.; Yang, K.; Uchida, J.; Haas, K.M.; Kelsoe, G.; Tedder, T.F. Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 361–371. [CrossRef]
86. Zehentmeier, S.; Roth, K.; Cseresnyes, Z.; Sercan, Ö.; Horn, K.; Niesner, R.A.; Chang, H.D.; Radbruch, A.; Hauser, A.E. Static and dynamic components synergize to form a stable survival niche for bone marrow plasma cells. *Eur. J. Immunol.* **2014**, *44*, 2306–2317. [CrossRef]
87. Pulido, R.; Elices, M.J.; Campanero, M.R.; Osborn, L.; Schiffer, S.; García-Pardo, A.; Lobb, R.; Hemler, M.E.; Sánchez-Madrid, F. Functional evidence for three distinct and independently inhibitable adhesion activities mediated by the human integrin VLA-4. Correlation with distinct alpha 4 epitopes. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 10241–10245. [CrossRef]
88. Nguyen, D.C.; Garimalla, S.; Xiao, H.; Kyu, S.; Albizua, I.; Galipeau, J.; Chiang, K.Y.; Waller, E.K.; Wu, R.; Gibson, G.; et al. Factors of the bone marrow microniche that support human plasma cell survival and immunoglobulin secretion. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3698. [CrossRef]
89. Baryawno, N.; Przybylski, D.; Kowalczyk, M.S.; Kfoury, Y.; Severe, N.; Gustafsson, K.; Kokkaliaris, K.D.; Mercier, F.; Tabaka, M.; Hofree, M.; et al. A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell* **2019**, *177*, 1915–1932.e16. [CrossRef]
90. Kawano, M.M.; Mihara, K.; Huang, N.; Tsujimoto, T.; Kuramoto, A. Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis. *Blood* **1995**, *85*, 487–494. [CrossRef]
91. Chu, V.T.; Fröhlich, A.; Steinhauser, G.; Scheel, T.; Roch, T.; Fillatreau, S.; Lee, J.J.; Löhning, M.; Berek, C. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 151–159. [CrossRef] [PubMed]
92. Haberland, K.; Ackermann, J.A.; Ipseiz, N.; Culemann, S.; Pracht, K.; Englbrecht, M.; Jäck, H.M.; Schett, G.; Schuh, W.; Krönke, G. Eosinophils are not essential for maintenance of murine plasma cells in the bone marrow. *Eur. J. Immunol.* **2018**, *48*, 822–828. [CrossRef] [PubMed]
93. Bortnick, A.; Chernova, I.; Spencer, S.P.; Allman, D. No strict requirement for eosinophils for bone marrow plasma cell survival. *Eur. J. Immunol.* **2018**, *48*, 815–821. [CrossRef] [PubMed]
94. Winter, O.; Moser, K.; Mohr, E.; Zotos, D.; Kaminski, H.; Szyska, M.; Roth, K.; Wong, D.M.; Dame, C.; Tarlinton, D.M.; et al. Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood* **2010**, *116*, 1867–1875. [CrossRef] [PubMed]
95. Benson, M.J.; Dillon, S.R.; Castigli, E.; Geha, R.S.; Xu, S.; Lam, K.P.; Noelle, R.J. Cutting edge: The dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 3655–3659. [CrossRef]
96. Walkley, C.R.; Olsen, G.H.; Dworkin, S.; Fabb, S.A.; Swann, J.; McArthur, G.A.; Westmoreland, S.V.; Chambon, P.; Scadden, D.T.; Purton, L.E. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell* **2007**, *129*, 1097–1110. [CrossRef] [PubMed]
97. Dong, L.; Yu, W.M.; Zheng, H.; Loh, M.L.; Bunting, S.T.; Pauly, M.; Huang, G.; Zhou, M.; Broxmeyer, H.E.; Scadden, D.T.; et al. Leukaemogenic effects of Ptpn11 activating mutations in the stem cell microenvironment. *Nature* **2016**, *539*, 304–308. [CrossRef]
98. Wortzel, I.; Dror, S.; Kenific, C.M.; Lyden, D. Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance. *Dev. Cell* **2019**, *49*, 347–360. [CrossRef]
99. Théry, C.; Zitvogel, L.; Amigorena, S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 569–579. [CrossRef]
100. Mathieu, M.; Martin-Jaular, L.; Lavieu, G.; Théry, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 9–17. [CrossRef]
101. Roccaro, A.M.; Sacco, A.; Maiso, P.; Azab, A.K.; Tai, Y.T.; Reagan, M.; Azab, F.; Flores, L.M.; Campigotto, F.; Weller, E.; et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 1542–1555. [CrossRef] [PubMed]

102. Wang, J.; Hendrix, A.; Hernot, S.; Lemaire, M.; De Bruyne, E.; Van Valckenborgh, E.; Lahoutte, T.; De Wever, O.; Vanderkerken, K.; Menu, E. Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood* **2014**, *124*, 555–566. [CrossRef] [PubMed]
103. Raimondi, L.; De Luca, A.; Amodio, N.; Manno, M.; Raccosta, S.; Taverna, S.; Bellavia, D.; Naselli, F.; Fontana, S.; Schillaci, O.; et al. Involvement of multiple myeloma cell-derived exosomes in osteoclast differentiation. *Oncotarget* **2015**, *6*, 13772–13789. [CrossRef] [PubMed]
104. Umezu, T.; Tadokoro, H.; Azuma, K.; Yoshizawa, S.; Ohyashiki, K.; Ohyashiki, J.H. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood* **2014**, *124*, 3748–3757. [CrossRef] [PubMed]
105. Colmone, A.; Amorim, M.; Pontier, A.L.; Wang, S.; Jablonski, E.; Sipkins, D.A. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* **2008**, *322*, 1861–1865. [CrossRef] [PubMed]
106. Boyd, A.L.; Campbell, C.J.; Hopkins, C.I.; Fiebig-Comyn, A.; Russell, J.; Ulemek, J.; Foley, R.; Leber, B.; Xenocostas, A.; Collins, T.J.; et al. Niche displacement of human leukemic stem cells uniquely allows their competitive replacement with healthy HSPCs. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 1925–1935. [CrossRef]
107. Akinduro, O.; Weber, T.S.; Ang, H.; Haltalli, M.L.R.; Ruivo, N.; Duarte, D.; Rashidi, N.M.; Hawkins, E.D.; Duffy, K.R.; Lo Celso, C. Proliferation dynamics of acute myeloid leukaemia and haematopoietic progenitors competing for bone marrow space. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 519. [CrossRef]
108. Kuehl, W.M.; Bergsagel, P.L. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 3456–3463. [CrossRef]
109. Giuliani, N.; Rizzoli, V.; Roodman, G.D. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood* **2006**, *108*, 3992–3996. [CrossRef]
110. Raje, N.; Roodman, G.D. Advances in the biology and treatment of bone disease in multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 1278–1286. [CrossRef]
111. Ghajar, C.M. Metastasis prevention by targeting the dormant niche. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 238–247. [CrossRef] [PubMed]
112. Chen, Z.; Orlowski, R.Z.; Wang, M.; Kwak, L.; McCarty, N. Osteoblastic niche supports the growth of quiescent multiple myeloma cells. *Blood* **2014**, *123*, 2204–2208. [CrossRef] [PubMed]
113. Khoo, W.H.; Ledergor, G.; Weiner, A.; Roden, D.L.; Terry, R.L.; McDonald, M.M.; Chai, R.C.; De Veirman, K.; Owen, K.L.; Opperman, K.S.; et al. A niche-dependent myeloid transcriptome signature defines dormant myeloma cells. *Blood* **2019**, *134*, 30–43. [CrossRef] [PubMed]
114. Lawson, M.A.; McDonald, M.M.; Kovacic, N.; Hua Khoo, W.; Terry, R.L.; Down, J.; Kaplan, W.; Paton-Hough, J.; Fellows, C.; Pettitt, J.A.; et al. Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8983. [CrossRef] [PubMed]
115. Roodman, G.D. Osteoblast function in myeloma. *Bone* **2011**, *48*, 135–140. [CrossRef]
116. Tian, E.; Zhan, F.; Walker, R.; Rasmussen, E.; Ma, Y.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J.D., Jr. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2483–2494. [CrossRef]
117. Heath, D.J.; Chantry, A.D.; Buckle, C.H.; Coulton, L.; Shaughnessy, J.D., Jr.; Evans, H.R.; Snowden, J.A.; Stover, D.R.; Vanderkerken, K.; Croucher, P.I. Inhibiting Dickkopf-1 (Dkk1) removes suppression of bone formation and prevents the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *J. Bone Miner. Res.* **2009**, *24*, 425–436. [CrossRef]
118. van Andel, H.; Kocemba, K.A.; Spaargaren, M.; Pals, S.T. Aberrant Wnt signaling in multiple myeloma: Molecular mechanisms and targeting options. *Leukemia* **2019**, *33*, 1063–1075. [CrossRef]
119. Bolzoni, M.; Donofrio, G.; Storti, P.; Guasco, D.; Toscani, D.; Lazzaretti, M.; Bonomini, S.; Agnelli, L.; Capocefalo, A.; Dalla Palma, B.; et al. Myeloma cells inhibit non-canonical wnt co-receptor ror2 expression in human bone marrow osteoprogenitor cells: Effect of wnt5a/ror2 pathway activation on the osteogenic differentiation impairment induced by myeloma cells. *Leukemia* **2013**, *27*, 451–463. [CrossRef]
120. Frenquelli, M.; Caridi, N.; Antonini, E.; Storti, F.; Viganò, V.; Gaviraghi, M.; Occhionorelli, M.; Bianchessi, S.; Bongiovanni, L.; Spinelli, A.; et al. The WNT receptor ROR2 drives the interaction of multiple myeloma cells with the microenvironment through AKT activation. *Leukemia* **2020**, *34*, 257–270. [CrossRef]
121. Mirandola, L.; Apicella, L.; Colombo, M.; Yu, Y.; Berta, D.G.; Platonova, N.; Lazzari, E.; Lancellotti, M.; Bulfamante, G.; Cobos, E.; et al. Anti-Notch treatment prevents multiple myeloma cells localization to the bone marrow via the chemokine system CXCR4/SDF-1. *Leukemia* **2013**, *27*, 1558–1566. [CrossRef] [PubMed]
122. Jundt, F.; Pröbsting, K.S.; Anagnostopoulos, I.; Muehlinghaus, G.; Chatterjee, M.; Mathas, S.; Bargou, R.C.; Manz, R.; Stein, H.; Dörken, B. Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood* **2004**, *103*, 3511–3515. [CrossRef] [PubMed]
123. Houde, C.; Li, Y.; Song, L.; Barton, K.; Zhang, Q.; Godwin, J.; Nand, S.; Toor, A.; Alkan, S.; Smadja, N.V.; et al. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood* **2004**, *104*, 3697–3704. [CrossRef] [PubMed]
124. Giuliani, N.; Colla, S.; Morandi, F.; Lazzaretti, M.; Sala, R.; Bonomini, S.; Grano, M.; Colucci, S.; Svaldi, M.; Rizzoli, V. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood* **2005**, *106*, 2472–2483. [CrossRef]

125. Garayoa, M.; Garcia, J.L.; Santamaria, C.; Garcia-Gomez, A.; Blanco, J.F.; Pandiella, A.; Hernandez, J.M.; Sanchez-Guijo, F.M.; del Canizo, M.C.; Gutierrez, N.C.; et al. Mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients display distinct genomic profile as compared with those from normal donors. *Leukemia* **2009**, *23*, 1515–1527. [CrossRef]
126. Corre, J.; Mahtouk, K.; Attal, M.; Gadelorge, M.; Huynh, A.; Fleury-Cappellesso, S.; Danho, C.; Laharrague, P.; Klein, B.; Rème, T.; et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia* **2007**, *21*, 1079–1088. [CrossRef]
127. Kawano, Y.; Moschetta, M.; Manier, S.; Glavey, S.; Görgün, G.T.; Roccaro, A.M.; Anderson, K.C.; Ghobrial, I.M. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol. Rev.* **2015**, *263*, 160–172. [CrossRef]
128. Gupta, D.; Treon, S.P.; Shima, Y.; Hideshima, T.; Podar, K.; Tai, Y.T.; Lin, B.; Lentzsch, S.; Davies, F.E.; Chauhan, D.; et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: Therapeutic applications. *Leukemia* **2001**, *15*, 1950–1961. [CrossRef]
129. Tanno, T.; Lim, Y.; Wang, Q.; Chesi, M.; Bergsagel, P.L.; Matthews, G.; Johnstone, R.W.; Ghosh, N.; Borrello, I.; Huff, C.A.; et al. Growth differentiating factor 15 enhances the tumor-initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells. *Blood* **2014**, *123*, 725–733. [CrossRef]
130. Nakamura, K.; Smyth, M.J.; Martinet, L. Cancer immunoediting and immune dysregulation in multiple myeloma. *Blood* **2020**. [CrossRef]
131. Hoyos, V.; Borrello, I. The immunotherapy era of myeloma: Monoclonal antibodies, vaccines, and adoptive T-cell therapies. *Blood* **2016**, *128*, 1679–1687. [CrossRef] [PubMed]
132. Cohen, A.D.; Raje, N.; Fowler, J.A.; Mezzi, K.; Scott, E.C.; Dhodapkar, M.V. How to Train Your T Cells: Overcoming Immune Dysfunction in Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 1541–1554. [CrossRef] [PubMed]
133. Xu, S.; De Veirman, K.; De Becker, A.; Vanderkerken, K.; Van Riet, I. Mesenchymal stem cells in multiple myeloma: A therapeutical tool or target? *Leukemia* **2018**, *32*, 1500–1514. [CrossRef] [PubMed]
134. Lomas, O.C.; Tahri, S.; Ghobrial, I.M. The microenvironment in myeloma. *Curr. Opin. Oncol.* **2020**, *32*, 170–175. [CrossRef] [PubMed]
135. Zheng, Y.; Cai, Z.; Wang, S.; Zhang, X.; Qian, J.; Hong, S.; Li, H.; Wang, M.; Yang, J.; Yi, Q. Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood* **2009**, *114*, 3625–3628. [CrossRef]
136. Lorenzo-Sanz, L.; Muñoz, P. Tumor-Infiltrating Immunosuppressive Cells in Cancer-Cell Plasticity, Tumor Progression and Therapy Response. *Cancer Microenviron* **2019**, *12*, 119–132. [CrossRef]
137. Petty, A.J.; Yang, Y. Tumor-Associated Macrophages in Hematologic Malignancies: New Insights and Targeted Therapies. *Cells* **2019**, *8*, 1526. [CrossRef]
138. Beider, K.; Bitner, H.; Leiba, M.; Gutwein, O.; Koren-Michowitz, M.; Ostrovsky, O.; Abraham, M.; Wald, H.; Galun, E.; Peled, A.; et al. Multiple myeloma cells recruit tumor-supportive macrophages through the CXCR4/CXCL12 axis and promote their polarization toward the M2 phenotype. *Oncotarget* **2014**, *5*, 11283–11296. [CrossRef]
139. Chen, H.; Li, M.; Sanchez, E.; Soof, C.M.; Bujarski, S.; Ng, N.; Cao, J.; Hekmati, T.; Zahab, B.; Nosrati, J.D.; et al. JAK1/2 pathway inhibition suppresses M2 polarization and overcomes resistance of myeloma to lenalidomide by reducing TRIB1, MUC1, CD44, CXCL12, and CXCR4 expression. *Br. J. Haematol.* **2020**, *188*, 283–294. [CrossRef]
140. Li, Y.; Zheng, Y.; Li, T.; Wang, Q.; Qian, J.; Lu, Y.; Zhang, M.; Bi, E.; Yang, M.; Reu, F.; et al. Chemokines CCL2, 3, 14 stimulate macrophage bone marrow homing, proliferation, and polarization in multiple myeloma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 24218–24229. [CrossRef]
141. De Beule, N.; De Veirman, K.; Maes, K.; De Bruyne, E.; Menu, E.; Breckpot, K.; De Raeve, H.; Van Rampelbergh, R.; Van Ginderachter, J.A.; Schots, R.; et al. Tumour-associated macrophage-mediated survival of myeloma cells through STAT3 activation. *J. Pathol.* **2017**, *241*, 534–546. [CrossRef] [PubMed]
142. Wang, Q.; Lu, Y.; Li, R.; Jiang, Y.; Zheng, Y.; Qian, J.; Bi, E.; Zheng, C.; Hou, J.; Wang, S.; et al. Therapeutic effects of CSF1R-blocking antibodies in multiple myeloma. *Leukemia* **2018**, *32*, 176–183. [CrossRef] [PubMed]
143. Chen, X.; Chen, J.; Zhang, W.; Sun, R.; Liu, T.; Zheng, Y.; Wu, Y. Prognostic value of diametrically polarized tumor-associated macrophages in multiple myeloma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 112685–112696. [CrossRef] [PubMed]
144. Wang, H.; Hu, W.M.; Xia, Z.J.; Liang, Y.; Lu, Y.; Lin, S.X.; Tang, H. High numbers of CD163+ tumor-associated macrophages correlate with poor prognosis in multiple myeloma patients receiving bortezomib-based regimens. *J. Cancer* **2019**, *10*, 3239–3245. [CrossRef]
145. Panchabhai, S.; Kelemen, K.; Ahmann, G.; Sebastian, S.; Mantei, J.; Fonseca, R. Tumor-associated macrophages and extracellular matrix metalloproteinase inducer in prognosis of multiple myeloma. *Leukemia* **2016**, *30*, 951–954. [CrossRef]
146. Andersen, M.N.; Andersen, N.F.; Rødgaard-Hansen, S.; Hokland, M.; Abildgaard, N.; Møller, H.J. The novel biomarker of alternative macrophage activation, soluble mannose receptor (sMR/sCD206): Implications in multiple myeloma. *Leuk. Res.* **2015**, *39*, 971–975. [CrossRef] [PubMed]
147. Wang, Q.; Zhao, D.; Xian, M.; Wang, Z.; Bi, E.; Su, P.; Qian, J.; Ma, X.; Yang, M.; Liu, L.; et al. MIF as a biomarker and therapeutic target for overcoming resistance to proteasome inhibitors in human myeloma. *Blood* **2020**. [CrossRef]
148. Xu, R.; Li, Y.; Yan, H.; Zhang, E.; Huang, X.; Chen, Q.; Chen, J.; Qu, J.; Liu, Y.; He, J.; et al. CCL2 promotes macrophages-associated chemoresistance via MCPIP1 dual catalytic activities in multiple myeloma. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 781. [CrossRef] [PubMed]

149. Kim, J.; Denu, R.A.; Dollar, B.A.; Escalante, L.E.; Kuether, J.P.; Callander, N.S.; Asimakopoulos, F.; Hematti, P. Macrophages and mesenchymal stromal cells support survival and proliferation of multiple myeloma cells. *Br. J. Haematol.* **2012**, *158*, 336–346. [CrossRef]
150. Zheng, Y.; Yang, J.; Qian, J.; Qiu, P.; Hanabuchi, S.; Lu, Y.; Wang, Z.; Liu, Z.; Li, H.; He, J.; et al. PSGL-1/selectin and ICAM-1/CD18 interactions are involved in macrophage-induced drug resistance in myeloma. *Leukemia* **2013**, *27*, 702–710. [CrossRef]
151. Beyar-Katz, O.; Magidey, K.; Ben-Tsedek, N.; Alishekevitz, D.; Timaner, M.; Miller, V.; Lindzen, M.; Yarden, Y.; Avivi, I.; Shaked, Y. Bortezomib-induced pro-inflammatory macrophages as a potential factor limiting anti-tumour efficacy. *J. Pathol.* **2016**, *239*, 262–273. [CrossRef] [PubMed]
152. Minnie, S.A.; Kuns, R.D.; Gartlan, K.H.; Zhang, P.; Wilkinson, A.N.; Samson, L.; Guillerey, C.; Engwerda, C.; MacDonald, K.P.A.; Smyth, M.J.; et al. Myeloma escape after stem cell transplantation is a consequence of T-cell exhaustion and is prevented by TIGIT blockade. *Blood* **2018**, *132*, 1675–1688. [CrossRef] [PubMed]
153. Opperman, K.S.; Vandyke, K.; Clark, K.C.; Coulter, E.A.; Hewett, D.R.; Mrozik, K.M.; Schwarz, N.; Evdokiou, A.; Croucher, P.I.; Psaltis, P.J.; et al. Clodronate-Liposome Mediated Macrophage Depletion Abrogates Multiple Myeloma Tumor Establishment In Vivo. *Neoplasia* **2019**, *21*, 777–787. [CrossRef] [PubMed]
154. Scavelli, C.; Nico, B.; Cirulli, T.; Ria, R.; Di Pietro, G.; Mangieri, D.; Bacigalupo, A.; Mangialardi, G.; Coluccia, A.M.; Caravita, T.; et al. Vasculogenic mimicry by bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Oncogene* **2008**, *27*, 663–674. [CrossRef]
155. Alexandrakis, M.G.; Goulidaki, N.; Pappa, C.A.; Boula, A.; Psarakis, F.; Neonakis, I.; Tsirakis, G. Interleukin-10 Induces Both Plasma Cell Proliferation and Angiogenesis in Multiple Myeloma. *Pathol. Oncol. Res.* **2015**, *21*, 929–934. [CrossRef]
156. Berardi, S.; Ria, R.; Reale, A.; De Luisi, A.; Catacchio, I.; Moschetta, M.; Vacca, A. Multiple myeloma macrophages: Pivotal players in the tumor microenvironment. *J. Oncol.* **2013**, *2013*, 183602. [CrossRef]
157. Bogen, B.; Fauskanger, M.; Haabeth, O.A.; Tveita, A. CD4(+) T cells indirectly kill tumor cells via induction of cytotoxic macrophages in mouse models. *Cancer Immunol. Immunother* **2019**, *68*, 1865–1873. [CrossRef]
158. Haabeth, O.A.W.; Hennig, K.; Fauskanger, M.; Løset, G.; Bogen, B.; Tveita, A. CD4+ T-cell killing of multiple myeloma cells is mediated by resident bone marrow macrophages. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 2595–2605. [CrossRef]
159. Fauskanger, M.; Haabeth, O.A.W.; Skjeldal, F.M.; Bogen, B.; Tveita, A.A. Tumor Killing by $CD4^+$ T Cells Is Mediated via Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase-Dependent Macrophage Cytotoxicity. *Front Immunol.* **2018**, *9*, 1684. [CrossRef]
160. Haabeth, O.A.; Lorvik, K.B.; Hammarström, C.; Donaldson, I.M.; Haraldsen, G.; Bogen, B.; Corthay, A. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 240. [CrossRef]
161. Tveita, A.A.; Schjesvold, F.; Haabeth, O.A.; Fauskanger, M.; Bogen, B. Tumors Escape CD4+ T-cell-Mediated Immunosurveillance by Impairing the Ability of Infiltrating Macrophages to Indirectly Present Tumor Antigens. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 3268–3278. [CrossRef] [PubMed]
162. Tveita, A.A.; Schjesvold, F.H.; Sundnes, O.; Haabeth, O.A.; Haraldsen, G.; Bogen, B. Indirect CD4+ T-cell-mediated elimination of MHC II(NEG) tumor cells is spatially restricted and fails to prevent escape of antigen-negative cells. *Eur. J. Immunol.* **2014**, *44*, 2625–2637. [CrossRef] [PubMed]
163. Gutiérrez-González, A.; Martínez-Moreno, M.; Samaniego, R.; Arellano-Sánchez, N.; Salinas-Muñoz, L.; Relloso, M.; Valeri, A.; Martínez-López, J.; Corbí, Á.L.; Hidalgo, A.; et al. Evaluation of the potential therapeutic benefits of macrophage reprogramming in multiple myeloma. *Blood* **2016**, *128*, 2241–2252. [CrossRef] [PubMed]
164. Lee, S.E.; Lim, J.Y.; Ryu, D.B.; Kim, T.W.; Yoon, J.H.; Cho, B.S.; Eom, K.S.; Kim, Y.J.; Kim, H.J.; Lee, S.; et al. Circulating immune cell phenotype can predict the outcome of lenalidomide plus low-dose dexamethasone treatment in patients with refractory/relapsed multiple myeloma. *Cancer Immunol. Immunother* **2016**, *65*, 983–994. [CrossRef]
165. Giallongo, C.; Tibullo, D.; Parrinello, N.L.; La Cava, P.; Di Rosa, M.; Bramanti, V.; Di Raimondo, C.; Conticello, C.; Chiarenza, A.; Palumbo, G.A.; et al. Granulocyte-like myeloid derived suppressor cells (G-MDSC) are increased in multiple myeloma and are driven by dysfunctional mesenchymal stem cells (MSC). *Oncotarget* **2016**, *7*, 85764–85775. [CrossRef]
166. Favaloro, J.; Liyadipitiya, T.; Brown, R.; Yang, S.; Suen, H.; Woodland, N.; Nassif, N.; Hart, D.; Fromm, P.; Weatherburn, C.; et al. Myeloid derived suppressor cells are numerically, functionally and phenotypically different in patients with multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* **2014**, *55*, 2893–2900. [CrossRef]
167. Tai, Y.T.; Lin, L.; Xing, L.; Cho, S.F.; Yu, T.; Acharya, C.; Wen, K.; Hsieh, P.A.; Dulos, J.; van Elsas, A.; et al. APRIL signaling via TACI mediates immunosuppression by T regulatory cells in multiple myeloma: Therapeutic implications. *Leukemia* **2019**, *33*, 426–438. [CrossRef]
168. Romano, A.; Parrinello, N.L.; La Cava, P.; Tibullo, D.; Giallongo, C.; Camiolo, G.; Puglisi, F.; Parisi, M.; Pirosa, M.C.; Martino, E.; et al. PMN-MDSC and arginase are increased in myeloma and may contribute to resistance to therapy. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2018**, *18*, 675–683. [CrossRef]
169. Wang, Z.; Zhang, L.; Wang, H.; Xiong, S.; Li, Y.; Tao, Q.; Xiao, W.; Qin, H.; Wang, Y.; Zhai, Z. Tumor-induced CD14+HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with tumor progression and outcome of therapy in multiple myeloma patients. *Cancer Immunol. Immunother* **2015**, *64*, 389–399. [CrossRef]
170. Kuwahara-Ota, S.; Shimura, Y.; Steinebach, C.; Isa, R.; Yamaguchi, J.; Nishiyama, D.; Fujibayashi, Y.; Takimoto-Shimomura, T.; Mizuno, Y.; Matsumura-Kimoto, Y.; et al. Lenalidomide and pomalidomide potently interfere with induction of myeloid-derived suppressor cells in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **2020**. [CrossRef]

171. Gorgun, G.; Samur, M.K.; Cowens, K.B.; Paula, S.; Bianchi, G.; Anderson, J.E.; White, R.E.; Singh, A.; Ohguchi, H.; Suzuki, R.; et al. Lenalidomide Enhances Immune Checkpoint Blockade-Induced Immune Response in Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 4607–4618. [CrossRef] [PubMed]
172. De Veirman, K.; Van Ginderachter, J.A.; Lub, S.; De Beule, N.; Thielemans, K.; Bautmans, I.; Oyajobi, B.O.; De Bruyne, E.; Menu, E.; Lemaire, M.; et al. Multiple myeloma induces Mcl-1 expression and survival of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 10532–10547. [CrossRef] [PubMed]
173. Zhou, J.; Lin, H.; Hu, L.; Li, G.; Zhang, X. Decitabine shows potent anti-myeloma activity by depleting monocytic myeloid-derived suppressor cells in the myeloma microenvironment. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2019**, *145*, 329–336. [CrossRef] [PubMed]
174. Wang, J.; De Veirman, K.; Faict, S.; Frassanito, M.A.; Ribatti, D.; Vacca, A.; Menu, E. Multiple myeloma exosomes establish a favourable bone marrow microenvironment with enhanced angiogenesis and immunosuppression. *J. Pathol.* **2016**, *239*, 162–173. [CrossRef] [PubMed]
175. Wang, J.; De Veirman, K.; De Beule, N.; Maes, K.; De Bruyne, E.; Van Valckenborgh, E.; Vanderkerken, K.; Menu, E. The bone marrow microenvironment enhances multiple myeloma progression by exosome-mediated activation of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 43992–44004. [CrossRef]
176. Leone, P.; Berardi, S.; Frassanito, M.A.; Ria, R.; De Re, V.; Cicco, S.; Battaglia, S.; Ditonno, P.; Dammacco, F.; Vacca, A.; et al. Dendritic cells accumulate in the bone marrow of myeloma patients where they protect tumor plasma cells from CD8+ T-cell killing. *Blood* **2015**, *126*, 1443–1451. [CrossRef]
177. Ray, A.; Das, D.S.; Song, Y.; Macri, V.; Richardson, P.; Brooks, C.L.; Chauhan, D.; Anderson, K.C. A novel agent SL-401 induces anti-myeloma activity by targeting plasmacytoid dendritic cells, osteoclastogenesis and cancer stem-like cells. *Leukemia* **2017**, *31*, 2652–2660. [CrossRef]
178. Lamarthee, B.; de Vassoigne, F.; Malard, F.; Stocker, N.; Boussen, I.; Mediavilla, C.; Tang, R.; Fava, F.; Garderet, L.; Marjanovic, Z.; et al. Quantitative and functional alterations of 6-sulfo LacNac dendritic cells in multiple myeloma. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1444411. [CrossRef]
179. Shinde, P.; Fernandes, S.; Melinkeri, S.; Kale, V.; Limaye, L. Compromised functionality of monocyte-derived dendritic cells in multiple myeloma patients may limit their use in cancer immunotherapy. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5705. [CrossRef]
180. Romano, A.; Parrinello, N.L.; Simeon, V.; Puglisi, F.; La Cava, P.; Bellofiore, C.; Giallongo, C.; Camiolo, G.; D'Auria, F.; Grieco, V.; et al. High-density neutrophils in MGUS and multiple myeloma are dysfunctional and immune-suppressive due to increased STAT3 downstream signaling. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1983. [CrossRef]
181. Puglisi, F.; Parrinello, N.L.; Giallongo, C.; Cambria, D.; Camiolo, G.; Bellofiore, C.; Conticello, C.; Del Fabro, V.; Leotta, V.; Markovic, U.; et al. Plasticity of High-Density Neutrophils in Multiple Myeloma is Associated with Increased Autophagy Via STAT3. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3548. [CrossRef] [PubMed]
182. Perez, C.; Botta, C.; Zabaleta, A.; Puig, N.; Cedena, M.T.; Goicoechea, I.; Alameda, D.; San Jose-Eneriz, E.; Merino, J.; Rodriguez-Otero, P.; et al. Immunogenomic identification and characterization of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in multiple myeloma. *Blood* **2020**, *136*, 199–209. [CrossRef] [PubMed]
183. Wong, T.W.; Kita, H.; Hanson, C.A.; Walters, D.K.; Arendt, B.K.; Jelinek, D.F. Induction of malignant plasma cell proliferation by eosinophils. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70554. [CrossRef] [PubMed]
184. Glatman Zaretsky, A.; Konradt, C.; Dépis, F.; Wing, J.B.; Goenka, R.; Atria, D.G.; Silver, J.S.; Cho, S.; Wolf, A.I.; Quinn, W.J.; et al. T Regulatory Cells Support Plasma Cell Populations in the Bone Marrow. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 1906–1916. [CrossRef]
185. Vyzoukaki, R.; Tsirakis, G.; Pappa, C.A.; Devetzoglou, M.; Tzardi, M.; Alexandrakis, M.G. The Impact of Mast Cell Density on the Progression of Bone Disease in Multiple Myeloma Patients. *Int. Arch Allergy Immunol.* **2015**, *168*, 263–268. [CrossRef]
186. Takagi, S.; Tsukamoto, S.; Park, J.; Johnson, K.E.; Kawano, Y.; Moschetta, M.; Liu, C.J.; Mishima, Y.; Kokubun, K.; Manier, S.; et al. Platelets Enhance Multiple Myeloma Progression via IL-1beta Upregulation. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 2430–2439. [CrossRef]
187. Prabhala, R.H.; Pelluru, D.; Fulciniti, M.; Prabhala, H.K.; Nanjappa, P.; Song, W.; Pai, C.; Amin, S.; Tai, Y.T.; Richardson, P.G.; et al. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. *Blood* **2010**, *115*, 5385–5392. [CrossRef]
188. Bryant, C.; Suen, H.; Brown, R.; Yang, S.; Favaloro, J.; Aklilu, E.; Gibson, J.; Ho, P.J.; Iland, H.; Fromm, P.; et al. Long-term survival in multiple myeloma is associated with a distinct immunological profile, which includes proliferative cytotoxic T-cell clones and a favourable Treg/Th17 balance. *Blood Cancer J.* **2013**, *3*, e148. [CrossRef]
189. Lad, D.; Huang, Q.; Hoeppli, R.; Garcia, R.; Xu, L.; Levings, M.; Song, K.; Broady, R. Evaluating the role of Tregs in the progression of multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* **2019**, *60*, 2134–2142. [CrossRef]
190. Alrasheed, N.; Lee, L.; Ghorani, E.; Henry, J.Y.; Conde, L.; Chin, M.; Galas-Filipowicz, D.; Furness, A.J.S.; Chavda, S.J.; Richards, H.; et al. Marrow-Infiltrating Regulatory T Cells Correlate with the Presence of Dysfunctional $CD4^{+}PD\text{-}1^{+}$ Cells and Inferior Survival in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 3443–3454. [CrossRef]
191. Giannopoulos, K.; Kaminska, W.; Hus, I.; Dmoszynska, A. The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: Detailed characterisation of immune status in multiple myeloma. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 546–552. [CrossRef] [PubMed]
192. Wang, J.N.; Cao, X.X.; Zhao, A.L.; Cai, H.; Wang, X.; Li, J. Increased activated regulatory T cell subsets and aging Treg-like cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: A case control study. *Cancer Cell Int.* **2018**, *18*, 187. [CrossRef] [PubMed]

193. Kawano, Y.; Zavidij, O.; Park, J.; Moschetta, M.; Kokubun, K.; Mouhieddine, T.H.; Manier, S.; Mishima, Y.; Murakami, N.; Bustoros, M.; et al. Blocking IFNAR1 inhibits multiple myeloma-driven Treg expansion and immunosuppression. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 2487–2499. [CrossRef] [PubMed]
194. Bonanno, G.; Mariotti, A.; Procoli, A.; Folgiero, V.; Natale, D.; De Rosa, L.; Majolino, I.; Novarese, L.; Rocci, A.; Gambella, M.; et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity correlates with immune system abnormalities in multiple myeloma. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 247. [CrossRef] [PubMed]
195. Krejcik, J.; Casneuf, T.; Nijhof, I.S.; Verbist, B.; Bald, J.; Plesner, T.; Syed, K.; Liu, K.; van de Donk, N.W.; Weiss, B.M.; et al. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood* **2016**, *128*, 384–394. [CrossRef]
196. Rosenblatt, J.; Glotzbecker, B.; Mills, H.; Vasir, B.; Tzachanis, D.; Levine, J.D.; Joyce, R.M.; Wellenstein, K.; Keefe, W.; Schickler, M.; et al. PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo T-cell responses to autologous dendritic cell/myeloma fusion vaccine. *J. Immunother* **2011**, *34*, 409–418. [CrossRef]
197. Yousef, S.; Marvin, J.; Steinbach, M.; Langemo, A.; Kovacsovics, T.; Binder, M.; Kröger, N.; Luetkens, T.; Atanackovic, D. Immunomodulatory molecule PD-L1 is expressed on malignant plasma cells and myeloma-propagating pre-plasma cells in the bone marrow of multiple myeloma patients. *Blood Cancer J.* **2015**, *5*, e285. [CrossRef]
198. Lee, B.H.; Park, Y.; Kim, J.H.; Kang, K.W.; Lee, S.J.; Kim, S.J.; Kim, B.S. PD-L1 expression in bone marrow plasma cells as a biomarker to predict multiple myeloma prognosis: Developing a nomogram-based prognostic model. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12641. [CrossRef]
199. Usmani, S.Z.; Schjesvold, F.; Oriol, A.; Karlin, L.; Cavo, M.; Rifkin, R.M.; Yimer, H.A.; LeBlanc, R.; Takezako, N.; McCroskey, R.D.; et al. Pembrolizumab plus lenalidomide and dexamethasone for patients with treatment-naive multiple myeloma (KEYNOTE-185): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* **2019**, *6*, e448–e458. [CrossRef]
200. Mateos, M.V.; Blacklock, H.; Schjesvold, F.; Oriol, A.; Simpson, D.; George, A.; Goldschmidt, H.; Larocca, A.; Chanan-Khan, A.; Sherbenou, D.; et al. Pembrolizumab plus pomalidomide and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (KEYNOTE-183): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* **2019**, *6*, e459–e469. [CrossRef]
201. Suen, H.; Brown, R.; Yang, S.; Weatherburn, C.; Ho, P.J.; Woodland, N.; Nassif, N.; Barbaro, P.; Bryant, C.; Hart, D.; et al. Multiple myeloma causes clonal T-cell immunosenescence: Identification of potential novel targets for promoting tumour immunity and implications for checkpoint blockade. *Leukemia* **2016**, *30*, 1716–1724. [CrossRef]
202. Bailur, J.K.; McCachren, S.S.; Doxie, D.B.; Shrestha, M.; Pendleton, K.; Nooka, A.K.; Neparidze, N.; Parker, T.L.; Bar, N.; Kaufman, J.L.; et al. Early alterations in stem-like/resident T cells, innate and myeloid cells in the bone marrow in preneoplastic gammopathy. *JCI Insight* **2019**, *5*. [CrossRef]
203. Zelle-Rieser, C.; Thangavadivel, S.; Biedermann, R.; Brunner, A.; Stoitzner, P.; Willenbacher, E.; Greil, R.; Jöhrer, K. T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site. *J. Hematol. Oncol.* **2016**, *9*, 116. [CrossRef] [PubMed]
204. Witzens-Harig, M.; Hose, D.; Jünger, S.; Pfirschke, C.; Khandelwal, N.; Umansky, L.; Seckinger, A.; Conrad, H.; Brackertz, B.; Rème, T.; et al. Tumor cells in multiple myeloma patients inhibit myeloma-reactive T cells through carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-6. *Blood* **2013**, *121*, 4493–4503. [CrossRef] [PubMed]
205. Giuliani, N.; Colla, S.; Sala, R.; Moroni, M.; Lazzaretti, M.; La Monica, S.; Bonomini, S.; Hojden, M.; Sammarelli, G.; Barillè, S.; et al. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: A potential role in multiple myeloma bone disease. *Blood* **2002**, *100*, 4615–4621. [CrossRef]
206. Ehrlich, L.A.; Chung, H.Y.; Ghobrial, I.; Choi, S.J.; Morandi, F.; Colla, S.; Rizzoli, V.; Roodman, G.D.; Giuliani, N. IL-3 is a potential inhibitor of osteoblast differentiation in multiple myeloma. *Blood* **2005**, *106*, 1407–1414. [CrossRef]
207. Giuliani, N.; Morandi, F.; Tagliaferri, S.; Colla, S.; Bonomini, S.; Sammarelli, G.; Rizzoli, V. Interleukin-3 (IL-3) is overexpressed by T lymphocytes in multiple myeloma patients. *Blood* **2006**, *107*, 841–842. [CrossRef]
208. Noonan, K.; Marchionni, L.; Anderson, J.; Pardoll, D.; Roodman, G.D.; Borrello, I. A novel role of IL-17-producing lymphocytes in mediating lytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* **2010**, *116*, 3554–3563. [CrossRef]
209. Schütt, P.; Brandhorst, D.; Stellberg, W.; Poser, M.; Ebeling, P.; Müller, S.; Buttkereit, U.; Opalka, B.; Lindemann, M.; Grosse-Wilde, H.; et al. Immune parameters in multiple myeloma patients: Influence of treatment and correlation with opportunistic infections. *Leuk. Lymphoma* **2006**, *47*, 1570–1582. [CrossRef]
210. García-Sanz, R.; González, M.; Orfão, A.; Moro, M.J.; Hernández, J.M.; Borrego, D.; Carnero, M.; Casanova, F.; Bárez, A.; Jiménez, R.; et al. Analysis of natural killer-associated antigens in peripheral blood and bone marrow of multiple myeloma patients and prognostic implications. *Br. J. Haematol.* **1996**, *93*, 81–88. [CrossRef]
211. Jurisic, V.; Srdic, T.; Konjevic, G.; Markovic, O.; Colovic, M. Clinical stage-depending decrease of NK cell activity in multiple myeloma patients. *Med. Oncol.* **2007**, *24*, 312–317. [CrossRef] [PubMed]
212. Frassanito, M.A.; Silvestris, F.; Cafforio, P.; Silvestris, N.; Dammacco, F. IgG M-components in active myeloma patients induce a down-regulation of natural killer cell activity. *Int. J. Clin. Lab Res.* **1997**, *27*, 48–54. [CrossRef] [PubMed]
213. Konjević, G.; Vuletić, A.; Mirjačić Martinović, K.; Colović, N.; Čolović, M.; Jurišić, V. Decreased CD161 activating and increased CD158a inhibitory receptor expression on NK cells underlies impaired NK cell cytotoxicity in patients with multiple myeloma. *J. Clin. Pathol.* **2016**. [CrossRef] [PubMed]

214. Fauriat, C.; Mallet, F.; Olive, D.; Costello, R.T. Impaired activating receptor expression pattern in natural killer cells from patients with multiple myeloma. *Leukemia* **2006**, *20*, 732–733. [CrossRef] [PubMed]
215. Jinushi, M.; Vanneman, M.; Munshi, N.C.; Tai, Y.T.; Prabhala, R.H.; Ritz, J.; Neuberg, D.; Anderson, K.C.; Carrasco, D.R.; Dranoff, G. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 1285–1290. [CrossRef]
216. El-Sherbiny, Y.M.; Meade, J.L.; Holmes, T.D.; McGonagle, D.; Mackie, S.L.; Morgan, A.W.; Cook, G.; Feyler, S.; Richards, S.J.; Davies, F.E.; et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8444–8449. [CrossRef]
217. Ponzetta, A.; Benigni, G.; Antonangeli, F.; Sciumè, G.; Sanseviero, E.; Zingoni, A.; Ricciardi, M.R.; Petrucci, M.T.; Santoni, A.; Bernardini, G. Multiple Myeloma Impairs Bone Marrow Localization of Effector Natural Killer Cells by Altering the Chemokine Microenvironment. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 4766–4777. [CrossRef]
218. Dhodapkar, M.V.; Geller, M.D.; Chang, D.H.; Shimizu, K.; Fujii, S.; Dhodapkar, K.M.; Krasovsky, J. A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 1667–1676. [CrossRef]
219. Horenstein, A.L.; Quarona, V.; Toscani, D.; Costa, F.; Chillemi, A.; Pistoia, V.; Giuliani, N.; Malavasi, F. Adenosine Generated in the Bone Marrow Niche Through a CD38-Mediated Pathway Correlates with Progression of Human Myeloma. *Mol. Med.* **2016**, *22*, 694–704. [CrossRef]
220. Lappas, C.M.; Rieger, J.M.; Linden, J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 1073–1080. [CrossRef]
221. Stagg, J.; Divisekera, U.; Duret, H.; Sparwasser, T.; Teng, M.W.; Darcy, P.K.; Smyth, M.J. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 2892–2900. [CrossRef] [PubMed]
222. Young, A.; Ngiow, S.F.; Gao, Y.; Patch, A.M.; Barkauskas, D.S.; Messaoudene, M.; Lin, G.; Coudert, J.D.; Stannard, K.A.; Zitvogel, L.; et al. A2AR Adenosine Signaling Suppresses Natural Killer Cell Maturation in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 1003–1016. [CrossRef] [PubMed]
223. Zarek, P.E.; Huang, C.T.; Lutz, E.R.; Kowalski, J.; Horton, M.R.; Linden, J.; Drake, C.G.; Powell, J.D. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* **2008**, *111*, 251–259. [CrossRef] [PubMed]
224. Horenstein, A.L.; Bracci, C.; Morandi, F.; Malavasi, F. CD38 in Adenosinergic Pathways and Metabolic Re-programming in Human Multiple Myeloma Cells: In-tandem Insights From Basic Science to Therapy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 760. [CrossRef] [PubMed]
225. Horenstein, A.L.; Chillemi, A.; Zaccarello, G.; Bruzzone, S.; Quarona, V.; Zito, A.; Serra, S.; Malavasi, F. A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncoimmunology* **2013**, *2*, e26246. [CrossRef]
226. Yang, R.; Elsaadi, S.; Misund, K.; Abdollahi, P.; Vandsemb, E.N.; Moen, S.H.; Kusnierczyk, A.; Slupphaug, G.; Standal, T.; Waage, A.; et al. Conversion of ATP to adenosine by CD39 and CD73 in multiple myeloma can be successfully targeted together with adenosine receptor A2A blockade. *J. Immunother Cancer* **2020**, *8*. [CrossRef]
227. Rebmann, V.; Schütt, P.; Brandhorst, D.; Opalka, B.; Moritz, T.; Nowrousian, M.R.; Grosse-Wilde, H. Soluble MICA as an independent prognostic factor for the overall survival and progression-free survival of multiple myeloma patients. *Clin. Immunol.* **2007**, *123*, 114–120. [CrossRef]
228. Groh, V.; Wu, J.; Yee, C.; Spies, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **2002**, *419*, 734–738. [CrossRef]