

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



## **TESIS DOCTORAL**

Leishmaniasis asociada a la terapia inmunosupresora: estudio de los  
mecanismos celulares y su repercusión en clínica

Leishmaniasis associated to immunosuppressive therapy: study of the cellular  
mechanisms and their clinical implications

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Lorena Bernardo Bernardo

DIRECTORES

Francisco Javier Moreno Nuncio  
Eugenia Carrillo Gallego

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID**

**TESIS DOCTORAL**

**Leishmaniasis asociada a la terapia inmunosupresora: estudio de los  
mecanismos celulares y su repercusión en clínica.**

**Leishmaniasis associated to immunosuppressive therapy: study of the  
cellular mechanisms and their clinical implications.**

Memoria para optar al grado de Doctora

Presentada por

**Lorena Bernardo Bernardo**

Directores

**Francisco Javier Moreno Nuncio**

**Eugenia Carrillo Gallego**

Madrid, 2023

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DOCTORADO EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID**

**TESIS DOCTORAL**

**Leishmaniasis asociada a la terapia inmunosupresora: estudio de los  
mecanismos celulares y su repercusión en clínica.**

**Leishmaniasis associated to immunosuppressive therapy: study of the  
cellular mechanisms and their clinical implications.**

Memoria para optar al grado de Doctora

Presentada por

**Lorena Bernardo Bernardo**

Directores

**Francisco Javier Moreno Nuncio**

**Eugenia Carrillo Gallego**

Madrid, 2023

A mis padres.

## AGRADECIMIENTOS

Muchas han sido las personas que me han ayudado a empezar este camino en el mundo de la investigación. A todas ellas quiero agradecerles la ayuda y el apoyo recibido.

En primer lugar, quiero empezar agradeciendo a mis directores de tesis, el Dr. Javier Moreno y la Dra. Eugenia Carrillo por darme la oportunidad de unirme a su equipo de laboratorio. Quiero agradecerlos todo lo que me habéis enseñado en este tiempo, vuestra ayuda y consejos. Gracias por haber confiado en mí y por todo el apoyo que me habéis dado a lo largo de estos años.

A Carmen, por acogerme con los brazos abiertos desde que llegué. Gracias por compartir conmigo todo lo que sabes y por enseñarme a trabajar en un laboratorio. Gracias por todo lo que me has ayudado, sin ti esto no hubiese sido posible. Por todos los momentos que hemos vivido juntas, por estar siempre que lo he necesitado y gracias por ser más que una compañera de trabajo, una gran amiga.

A Jose, por la paciencia infinita y por todo el tiempo que ha dedicado para que esto saliera lo mejor posible. Gracias por todos tus consejos y por darme la visión científica que tanto me ha hecho mejorar. Gracias por hacer tan entretenidas las tardes largas de laboratorio y por querer seguir trabajando juntos. Prometo compensar todo lo que has invertido en mí estos años.

A Laura, porque da igual dónde estuviese, que siempre ha estado pendiente. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme y por ser tan buena compañera. Por todo lo que hemos compartido, incluidas las tardes analizando las canciones de la radio.

A Ana, por el apoyo, por las conversaciones y congresos que hemos compartido. Gracias por haberte adentrado en el mundo esclavizador del citómetro hasta horas intempestivas.

Al Dr. Javier Nieto y a la Dra. Carmen Chicharro por sus palabras de ánimo constantes, por su ayuda y complicidad.

Quiero agradecer también a todo el personal de la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, así como al resto de miembros del departamento de

Parasitología del Centro Nacional de Microbiología, que siempre hayan estado pendientes y atentos a cualquier cosa que he necesitado. Gracias por vuestra ayuda y apoyo.

A todas las personas que pasaron por el laboratorio de forma temporal y con las que he podido tanto aprender como participar en sus proyectos. En particular gracias a Richard, Taha, Carmen y Tommaso por todos los buenos momentos compartidos. A Eder, gracias por contagiarnos tu alegría y por todo lo que me has ayudado durante tu estancia.

Un agradecimiento especial al Dr. Christopher Fernández-Prada por haberme acogido durante nueve meses en su laboratorio. Gracias por tu confianza, tu ayuda, por todo lo que me has enseñado y por haberme permitido realizar los experimentos que he considerado interesantes. Asimismo, me gustaría agradecer a todo su equipo, Claudia, Audrey y Victoria, por haberme hecho sentir como en casa. Merci les filles!

Mención especial a Noélie, por el buen equipo que hicimos juntas, por todo lo que me ha enseñado, por todos los momentos que hemos compartido y, en definitiva, por haber sido lo mejor que mi experiencia en Canadá me pudo dar. Merci pour être ma meilleur amie et ma famille à l'autre côté de l'Océan !

A Antoine, Jenn y Marion, quienes hicieron de esa aventura algo increíble. Sin vosotros nada hubiese sido igual. Merci pour avoir été plus que les meilleurs colloqs du monde, des grands amis et ma famille canadienne. Ça a été incroyable de vivre avec vous!

A María, por haberse convertido en un pilar fundamental en mi vida. Por ser y estar siempre que se necesita. Y porque no hay nada mejor que compartir todo lo que te apasiona con tu mejor amiga.

A Javi, el otro regalo que me hizo el Máster. Gracias por estar siempre ahí, por todo lo que hemos compartido y por la alegría que contagias cada vez que nos cruzamos por los pasillos.

A Gonzalo, por impulsarme y apoyarme en las primeras etapas de este proceso.

A Ana, Fanny y Silvia, por ser de esas amigas que se cuentan con los dedos de una mano. Gracias por haber creído tanto en mí.

A Ross, Mery y Evamari, por toda la vida caminando juntas. Por intentar entender siempre lo que estaba haciendo.

A mis abuelos, tíos y primos, porque siempre me han apoyado y animado. Porque en familia, cada uno de los logros conseguidos es más especial.

Gracias a Andrés, porque siempre ha estado pendiente. Por intentar comprender todo lo que recogen estas páginas, por todo el apoyo y cariño que me ha dado en los días buenos y, sobre todo, en los menos buenos. Por lanzarse a esta locura, por haber creado juntos un hogar y por hacerme tremendamente feliz.

A Beatriz, por dejarme ser una hermana mayor bien orgullosa. Gracias por estar siempre que me ha hecho falta, por la conexión que hemos ido ganando con el paso del tiempo y por contagiarme tu alegría diaria. Gracias por todo lo que me has apoyado y por complementar la parte científica de la familia.

Finalmente, agradecer enormemente a mis padres todo su esfuerzo y dedicación para que yo pudiera llegar donde estoy hoy. Porque siempre han apoyado y entendido a lo que me quería dedicar. Por alegrarse cada vez que daba un paso más, por todos los consejos que me han dado siempre y por querer aprender de cada una de las cosas que iba haciendo. No sé cómo agradeceros todo lo que habéis hecho por mí, pero por todo esto y más, este trabajo va por y para vosotros.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	- 4 -
RESUMEN .....	- 7 -
SUMMARY .....	- 10 -
INTRODUCCIÓN .....	- 13 -
I. Leishmaniasis.....	- 14 -
I.1. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> .....	- 14 -
I.2. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis.....	- 15 -
I.3. Epidemiología y distribución de la enfermedad.....	- 17 -
I.4. La leishmaniasis en España.....	- 18 -
II. Respuesta inmunitaria frente a la infección por <i>Leishmania</i> .....	- 20 -
II.1. Respuesta inmunitaria innata.....	- 20 -
II.2. Respuesta inmunitaria adaptativa celular.....	- 21 -
II.3. Respuesta inmunitaria adaptativa humoral.....	- 24 -
III. Tratamientos farmacológicos frente a la leishmaniasis.....	- 24 -
IV. Inmunosupresión, tratamientos inmunosupresores y leishmaniasis visceral.....	- 27 -
IV.1. Inmunosupresión con antagonistas del TNF.....	- 28 -
IV.2. Inmunosupresión con metotrexato.....	- 30 -
V. Modelos animales para el estudio de la leishmaniasis visceral en condiciones de inmunosupresión farmacológica.....	- 31 -
OBJETIVOS .....	- 35 -
MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 37 -
I. Materiales biológicos.....	- 38 -
I.1. Parásitos.....	- 38 -
I.2. Cultivos celulares.....	- 38 -
I.3. Animales de experimentación.....	- 39 -
I.4. Ética y Bienestar animal.....	- 39 -
II. Métodos experimentales.....	- 39 -
II.1. Ensayos de susceptibilidad farmacológica de promastigotes de <i>L. infantum</i> a anti-TNF, MTX o Sb <sup>III</sup> .....	- 40 -
II.2. Determinación de la viabilidad celular a anti-TNF, MTX o Sb <sup>V</sup> en macrófagos derivados de médula ósea.....	- 40 -
II.3. Análisis del efecto de los compuestos anti-TNF, MTX y Sb <sup>V</sup> en amastigotes de <i>L. infantum</i> .....	- 41 -
II.4. Medida de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras el cultivo con MTX o Sb <sup>III</sup> .....	- 42 -

II.5. Análisis de la susceptibilidad farmacológica cruzada entre metotrexato y antimonio en promastigotes de <i>L. infantum</i> .....	43 -
II.6. Inmunosupresión de los animales de experimentación. ....	44 -
II.7. Infección de los animales inmunosuprimidos. ....	45 -
II.8. Tratamiento frente a la infección por <i>Leishmania</i> . ....	45 -
II.9. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas. ....	46 -
II.10. Preparación del antígeno soluble de <i>Leishmania</i> (SLA). ....	47 -
II.11. Extracción del ADN de las muestras biológicas. ....	48 -
II.12. Cuantificación de la carga parasitaria mediante qPCR. ....	48 -
II.13. Determinación del título de anticuerpos frente a <i>Leishmania</i> . ....	49 -
II.14. Determinación de las poblaciones celulares circulantes en sangre. ....	50 -
II.15. Estimulación <i>in vitro</i> de los esplenocitos.....	51 -
II.16. Cuantificación de la concentración de citoquinas en los sobrenadantes del cultivo de los esplenocitos estimulados.....	52 -
II.17. Tinciones para la determinación de las poblaciones celulares en los esplenocitos. -	53 -
II.18. Análisis estadístico.....	55 -
<b>RESULTADOS</b> .....	57 -
<b>I. Acción de los fármacos inmunosupresores anti-TNF y MTX sobre las formas promastigote y amastigote de <i>L. infantum</i></b> .....	58 -
I.1. Los promastigotes de <i>L. infantum</i> son susceptibles al efecto del MTX. ....	58 -
I.2. El índice parasitario en amastigotes de <i>L. infantum</i> se reduce como consecuencia de la acción del MTX, pero no del inmunosupresor anti-TNF. ....	60 -
I.3. Efecto leishmanicida de los antimoniales en <i>L. infantum</i> . ....	63 -
I.4. La exposición a MTX produce un estrés oxidativo en promastigotes de <i>L. infantum</i> mayor que el generado por el antimonio trivalente. ....	65 -
I.5. Identificación de un perfil de resistencia cruzada entre antimonio y metotrexato. -	66 -
<b>II. Papel de los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX en el modelo ratón de infección aguda causada por <i>L. infantum</i></b> .....	69 -
II.1. La carga parasitaria durante la fase aguda de la infección se vio alterada por la inmunosupresión con anti-TNF y MTX. ....	69 -
II.2. La respuesta inmunitaria humoral se vio afectada por los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX. ....	71 -
II.3. Los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX reducen el número de linfocitos circulantes en sangre.....	73 -
II.4. La respuesta inmunitaria celular frente a <i>L. infantum</i> se ve modificada por los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX. ....	75 -
<b>III. Influencia de la inmunosupresión farmacológica con anti-TNF o MTX en el éxito del tratamiento en el modelo experimental de leishmaniasis visceral.</b> .....	81 -

III.1. La eficacia del tratamiento parasitario se ve alterada en condiciones de inmunosupresión farmacológica .....	- 81 -
III.2. La inmunosupresión con anti-TNF genera una marcada hipergammaglobulinemia después del tratamiento con Glucantime®. ....	- 85 -
III.3. La inmunosupresión farmacológica reduce el número de las poblaciones de linfocitos circulantes en sangre antes y después del tratamiento antiparasitario.....	- 87 -
III.4. La funcionalidad de los linfocitos T implicados en la respuesta celular tras el tratamiento con antimoniales pentavalentes se ve alterada por la inmunosupresión..	- 90 -
III.5. La inmunosupresión farmacológica conduce a un incremento del agotamiento celular al finalizar el tratamiento antiparasitario.....	- 95 -
III.6. Las poblaciones de células dendríticas tras el tratamiento con antimoniales pentavalentes se alteran en condiciones de inmunosupresión farmacológica.....	- 97 -
DISCUSIÓN .....	- 103 -
CONCLUSIONES .....	- 120 -
BIBLIOGRAFÍA .....	- 125 -
ANEXO I .....	- 137 -
ANEXO II .....	- 140 -
ANEXO III .....	- 146 -
ANEXO IV .....	- 150 -

## ABREVIATURAS

<b>ACK:</b>	Tampón Amoniaco-Cloruro-Potásico (del inglés, <i>Ammonium-Chloride-Potassium</i> ).
<b>ADN:</b>	Ácido Desoxirribonucleico.
<b>Anti-TNF:</b>	Antagonistas del TNF.
<b>BMDMs:</b>	Macrófagos derivados de médula ósea (del inglés, <i>Bone Marrow Derived Macrophages</i> ).
<b>BSA:</b>	Albúmina de suero bovino (del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i> ).
<b>CBA:</b>	<i>Cytometric Bead Array</i> .
<b>CD-:</b>	Grupo de diferenciación (del inglés, <i>Differentiation Cluster</i> ).
<b>cDCs:</b>	Células Dendríticas Convencionales (del inglés, <i>conventional Dendritic Cells</i> ).
<b>CT:</b>	Umbral de ciclo (del inglés, <i>Cycle Thershold</i> ).
<b>Cy-:</b>	Cianina (del inglés, <i>Cyanine</i> ).
<b>DALYS:</b>	Años de vida ajustados a discapacidad (del inglés, <i>Disability Adjusted Life Years</i> ).
<b>DCF-DA:</b>	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína.
<b>DCs:</b>	Células dendríticas (del inglés, <i>Dendritic Cells</i> ).
<b>DHFR:</b>	Dihidrolato Reductasa.
<b>DMEM:</b>	Medio Eagle Modificado de Dulbecco (del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ).
<b>D.O.:</b>	Densidad Óptica.
<b>EC<sub>50</sub>:</b>	Concentración Efectiva máxima 50 (del inglés, <i>half maximal Effective Concentration</i> ).
<b>EC<sub>90</sub>:</b>	Concentración efectiva máxima 90 (del inglés, <i>90 maximal Effective Concentration</i> ).
<b>EDTA:</b>	Ácido etilenodiaminotetraacético.
<b>ELISA:</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> ).
<b>FBS:</b>	Suero bovino fetal (del inglés, <i>Fetal Bovine Serum</i> ).
<b>FITC:</b>	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés, <i>Fluorescein IsoTioCyanate</i> ).
<b>HRP:</b>	Peroxidasa de rábano (del inglés, <i>HorseRadish Peroxidase</i> ).
<b>IC:</b>	Intervalo de Confianza.
<b>IC<sub>50</sub>:</b>	Concentración Inhibitoria máxima 50 (del inglés, <i>half maximal Inhibitory Concentration</i> ).
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	Interferón gamma.
<b>IgG:</b>	Inmunoglobulina G.

---

<b>IL-:</b>	Interleuquina.
<b>iNOS:</b>	Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés, <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> ).
<b>i.p.:</b>	Vía de inoculación Intraperitoneal.
<b>i.v.:</b>	Vía de inoculación Intravenosa.
<b>LC:</b>	Leishmaniasis Cutánea.
<b>LCD:</b>	Leishmaniasis Cutánea Diseminada.
<b>L-CCM:</b>	Medio condicionado de células L-929 (del inglés, <i>L-929 Cell Conditioned Medium</i> ).
<b>LMC:</b>	Leishmaniasis Mucocutánea.
<b>LV:</b>	Leishmaniasis Visceral.
<b>MA:</b>	Antimoniato de Meglumina (del inglés, <i>Meglumine Antimoniate</i> ).
<b>MFI:</b>	Mediana de la intensidad de fluorescencia (del inglés, <i>Median Fluorescence Intensity</i> ).
<b>MHC:</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i> ).
<b>MTT:</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difeníl tetrazolio.
<b>MTX:</b>	Metotrexato.
<b>NK:</b>	Células Natural Killers.
<b>NO:</b>	óxido nítrico (del inglés, Nitric Oxide).
<b>NTDs:</b>	Enfermedades Tropicales Desatendidas (del inglés, <i>Neglected Tropical Diseases</i> ).
<b>OMS:</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>OPD:</b>	Orto-fenilendiamina.
<b>p:</b>	Probabilidad de que un valor estadístico sea posible dada la hipótesis nula.
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino (de inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i> ).
<b>PD-1:</b>	Proteína de muerte celular programada (del inglés, <i>Programmed cell Dead protein</i> ).
<b>pDCs:</b>	Células dendríticas plasmacitoides (del inglés, <i>Plasmacytoid Dendritic Cells</i> ).
<b>PE:</b>	Ficoeritrina (del inglés, <i>Phycoerythrin</i> ).
<b>PKDL:</b>	Leishmaniasis dérmica post kala-azar (del inglés, <i>Post Kala-Azar dermal leishmaniasis</i> ).
<b>PTR1:</b>	Pteridin reductasa 1.
<b>qPCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés, <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> ).
<b>ROS:</b>	Especies reactivas de oxígeno (del inglés, <i>Reactive Oxygen Species</i> ).
<b>RPMI:</b>	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i> .

## ABREVIATURAS

---

<b>Sb<sup>III</sup>:</b>	Antimonio trivalente.
<b>Sb<sup>V</sup>:</b>	Antimonio pentavalente.
<b>SIDA:</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
<b>SLA:</b>	Antígeno soluble de <i>Leishmania</i> (del inglés, <i>Soluble Leishmania Antigen</i> ).
<b>SSG:</b>	Estibogluconato de sodio (del inglés, <i>Sodium Stibogluconate</i> ).
<b>TARGA:</b>	Terapia Antirretroviral de Gran Actividad.
<b>Th-:</b>	Linfocitos T colaboradores (del inglés, <i>T helper cells</i> ).
<b>Tip-DCs:</b>	Células dendríticas inflamatorias productoras de TNF y óxido nítrico.
<b>TLR:</b>	Receptores de tipo toll (del inglés, <i>Toll Like Receptors</i> ).
<b>Tm:</b>	Temperatura de fusión del ADN (del inglés, <i>melting Temperature</i> ).
<b>TNF:</b>	Factor de necrosis tumoral (del inglés, <i>Tumoral Necrosis Factor</i> ).
<b>TOS:</b>	Trasplantados de Órgano Sólido.
<b>Treg:</b>	Células T reguladoras.
<b>URF:</b>	Unidades Relativas de Fluorescencia.
<b>VIH:</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

## RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida causada por parásitos protozoos del género *Leishmania*. Entre las manifestaciones clínicas que presenta, la leishmaniasis visceral (LV) es la forma más grave de esta enfermedad parasitaria, ya que es mortal en ausencia de tratamiento. Los casos de LV son más frecuentes y severos en pacientes con un sistema inmunitario debilitado, ya que estos responden peor al tratamiento y presentan una mayor probabilidad de sufrir recaídas. Actualmente, se está produciendo un aumento de los casos de LV en pacientes que reciben tratamiento inmunosupresor frente a enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide o la psoriasis. España es una zona endémica de leishmaniasis causada por *L. infantum*, en la que, además, existe un gran número de personas que reciben inmunosupresión farmacológica. Este hecho conlleva que España sea el país de Europa con mayor prevalencia de casos de LV reportados en pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente.

Por este motivo, el objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido estudiar el efecto que dos de los tratamientos inmunosupresores más empleados en la clínica actual, como son los antagonistas del TNF (anti-TNF) y el fármaco metotrexato (MTX), presentan en el desarrollo de la LV en un modelo experimental. Además, para entender la menor eficacia del tratamiento de la enfermedad en estos casos, se analizó la respuesta inmunitaria generada antes y después del tratamiento con antimoniales pentavalentes, un tratamiento tradicionalmente empleado frente a la LV.

Para ello, se emplearon ratones de las cepas C57BL/6 y BALB/c que fueron inmunosuprimidos a las dosis clínicas con anti-TNF o MTX, junto con un grupo control no inmunosuprimido. Una semana después del inicio de la inmunosupresión, que se mantuvo a lo largo de los experimentos, estos animales fueron infectados vía intravenosa con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *L. infantum*. Para evaluar el efecto de los tratamientos inmunosupresores durante la fase aguda de la LV, cuatro semanas post-infección (S4) se determinó mediante qPCR la carga parasitaria en los órganos diana de la enfermedad. Además, se determinaron los niveles específicos de anticuerpos mediante ELISA y se evaluó la respuesta inmunitaria celular basada tanto en la producción de las citoquinas pro-inflamatorias de tipo Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2) por los

linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, como en la expresión del marcador de agotamiento celular PD-1 y en la población de células T reguladoras, características de la respuesta Th2. Para determinar la eficacia del tratamiento de la LV con antimoniales pentavalentes, comercializados como Glucantime<sup>®</sup>, seis semanas post-infección (S6) se iniciaron las pautas de tratamiento de la LV a las dosis clínicas, hasta alcanzar la semana 9 post-infección (S9). Tanto en S6 como en S9 se evaluaron los mismos parámetros que en S4 para poder establecer la evolución de la infección y de la respuesta inmunitaria antes y después del tratamiento. Además, se determinaron las poblaciones de células dendríticas generadas tras el tratamiento, así como las citoquinas secretadas al medio. Por otro lado, se realizaron ensayos *in vitro* de susceptibilidad farmacológica en promastigotes y amastigotes de *L. infantum*, para establecer la acción leishmanicida de los fármacos inmunosupresores y evaluar además su interacción con los antimoniales.

Por un lado, el inmunosupresor anti-TNF condujo a una mayor severidad de la infección al aumentar la carga parasitaria en hígado durante la fase aguda e impedir la resolución natural de la misma. Además, generó un incremento elevado en el título de anticuerpos específicos frente al parásito y conllevó una respuesta inmunitaria celular polarizada hacia el fenotipo Th2, ya que redujo la producción de citoquinas pro-inflamatorias y aumentó la expresión de PD-1. Durante el tratamiento de la LV la cura parasitológica de la enfermedad en este grupo se vio limitada por el inmunosupresor, ya que impidió la eliminación de los parásitos en el bazo y médula ósea, comparado con el grupo control no inmunosuprimido. De igual forma, tras el tratamiento con Glucantime<sup>®</sup> se produjo un incremento en la expresión de PD-1 por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de este grupo, así como por las células B. Este resultado, junto con la mayor producción de IL-10, la ausencia de citoquinas pro-inflamatorias y la disminución en las poblaciones de células dendríticas, puede explicar el mayor riesgo de recaídas de la LV que presentan estos pacientes inmunosuprimidos con anti-TNF, tras la reintroducción del fármaco inmunosupresor, una vez finalizada la terapia leishmanicida.

Por otro lado, durante la fase aguda de la infección por *L. infantum* el fármaco MTX parece tener un efecto antiparasitario beneficioso que se traduce en las menores cargas parasitarias encontradas en el bazo de los animales de este grupo, así como en la mayor diversidad de células productoras de múltiples citoquinas pro-inflamatorias. Sin

embargo, al administrar el tratamiento con antimoniales pentavalentes se produjo un incremento en las cargas parasitarias presentes en el bazo. Además, la médula ósea de estos animales tras el tratamiento presentó mayores cargas parasitarias que el grupo control. Estos resultados podrían deberse a la existencia de un mecanismo de resistencia cruzada entre MTX y antimonio, descrito por primera vez en los resultados *in vitro* de esta tesis doctoral, que podría estar relacionado con la peor respuesta al tratamiento de los pacientes inmunosuprimidos con MTX. A pesar de la mayor frecuencia de células multiproductoras de citoquinas en este grupo, la elevada expresión de marcadores relacionados con el perfil Th2 de susceptibilidad a la infección, observado al finalizar el tratamiento, como fueron las citoquinas anti-inflamatorias IL-6 e IL-10 y el incremento en el marcador de agotamiento celular PD-1 tanto por los linfocitos T como por las células B, podría agravar aún más esta situación.

En conclusión, estos análisis demuestran que la inmunosupresión farmacológica con anti-TNF o MTX modula de diferente manera el desarrollo de la infección por *L. infantum*, agravando la leishmaniasis visceral desarrollada, y afectando a la eficacia del tratamiento de la enfermedad con Glucantime®. Estos resultados confirman la necesidad de prestar especial atención a los pacientes que reciben terapia inmunosupresora y viven en zonas endémicas de leishmaniasis visceral.

## SUMMARY

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. Among its clinical manifestations, visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease since it is fatal when untreated. VL cases are more frequent and severe among immunosuppressed patients because they have a worst response to treatment and a higher risk of relapses. Currently, there is an increase in the number of VL cases in patients receiving immunosuppressive treatments to treat autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis or psoriasis. Spain is an endemic area of leishmaniasis caused by *L. infantum* in which there is also a huge number of people receiving pharmacological immunosuppression. Thus, lead Spain to be the European country with the highest prevalence of VL cases reported in pharmacological immunosuppressed patients.

For this reason, the main objective of this Thesis has been to study the effect that two of the immunosuppressive treatments most used in the clinical practice, such as TNF antagonist (anti-TNF) and the drug methotrexate (MTX), have on the VL development in an experimental model. In addition, to understand the lower efficacy of the VL treatment in these cases, the immune response was analysed before and after treatment with pentavalent antimonials, as the treatment traditionally used against VL.

For this purpose, C57BL/6 and BALB/c mice were immunosuppressed with anti-TNF or MTX at clinical doses and a non-immunosuppressed control group was used too. One week after the beginning of the immunosuppression, which was maintained until the end of the experiments, animals were intravenously infected with  $1 \times 10^7$  *L. infantum* promastigotes. To evaluate the effect that these immunosuppressive treatments have during the acute phase of VL, four weeks after infection (S4) parasite load was determined by qPCR in the target organs of the disease. In addition, an ELISA measurement of the specific antibody titres was done. Then, the cellular immune response was characterised based on the production of the pro-inflammatory Th1-type cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2) by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and on the expression of the cell exhaustion marker PD-1 and in the regulatory T cells, related with the Th2-type responses. To determine the efficacy of the VL treatment with pentavalent antimonials (Glucantime<sup>®</sup>), six weeks post-infection (S6) VL treatment started at clinical doses until

week 9 post-infection (S9) was reached. Both, in S6 and in S9, the same parameters as the ones done in S4 were evaluated to establish the evolution of the infection in immunosuppressive conditions and the immune response generated before and after VL treatment. Moreover, dendritic cells populations after treatment were analysed as well as cytokines secreted to the medium. Finally, *in vitro* analysis were carried out to identify pharmacological susceptibility of *L. infantum* promastigotes and amastigotes to the leishmanicidal activity of anti-TNF and MTX. It was also evaluated their interaction with antimonials.

On the one hand, the anti-TNF immunosuppressant led to a higher severity of the infection by increasing the parasite load in the liver during the acute phase and by preventing the natural resolution of the infection in this organ. Additionally, it increased the specific antibody titre against the parasite, and it led to a Th2-type cellular immune response since it reduced the pro-inflammatory cytokines production and it increased PD-1 expression. During VL treatment, this immunosuppressant impeded parasite elimination in the spleen and bone marrow, as it occurred in the non-immunosuppressed control group. Similarly, after Glucantime® treatment there was an increased in the PD-1 expression by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and by B cells in this group. This result, together with the greater production of IL-10 by B cells, the absence of pro-inflammatory cytokines and the decrease in the dendritic cell populations, may explain the higher risk of VL relapses occurring in anti-TNF immunosuppressed patients, after the reintroduction of the immunosuppressive drug, once the leishmanicidal therapy has finished.

On the other hand, during the VL acute phase, MTX seemed to have an antiparasitic effect, which was reflected in the lower parasite load found in the spleen of this group, as well as in the higher diversity of cells producing multiple pro-inflammatory cytokines. However, the administration of pentavalent antimonials in this group resulted in an increase in the parasite load found in the spleen. In addition, the bone marrow of these animals after treatment showed higher parasites loads than the control group. These results could be due to the existence of a cross-resistance mechanism between MTX and antimonials, described for the first time in the *in vitro* results of this thesis, which could be related to the worse response to treatment in MTX

immunosuppressive patients. Despite the higher frequency of multi-cytokine producing cells in this group, the higher expression of Th2-susceptibility type markers observed after treatment, as the anti-inflammatory cytokines IL-6 and IL-10 and the increase in PD-1 expression by T Lymphocytes and B cells worsened the situation.

In conclusion, these analyses show that pharmacological immunosuppression with anti-TNF or MTX modulates in a different way the development of *L. infantum* infection, exacerbating VL disease. They also affect the efficacy of VL treatment with Glucantime®. These results confirm that special attention is needed in patients under immunosuppressive therapy in endemic areas of visceral leishmaniasis.

# INTRODUCCIÓN

A decorative graphic consisting of several horizontal lines of varying lengths and colors (blue and grey) positioned below the title.

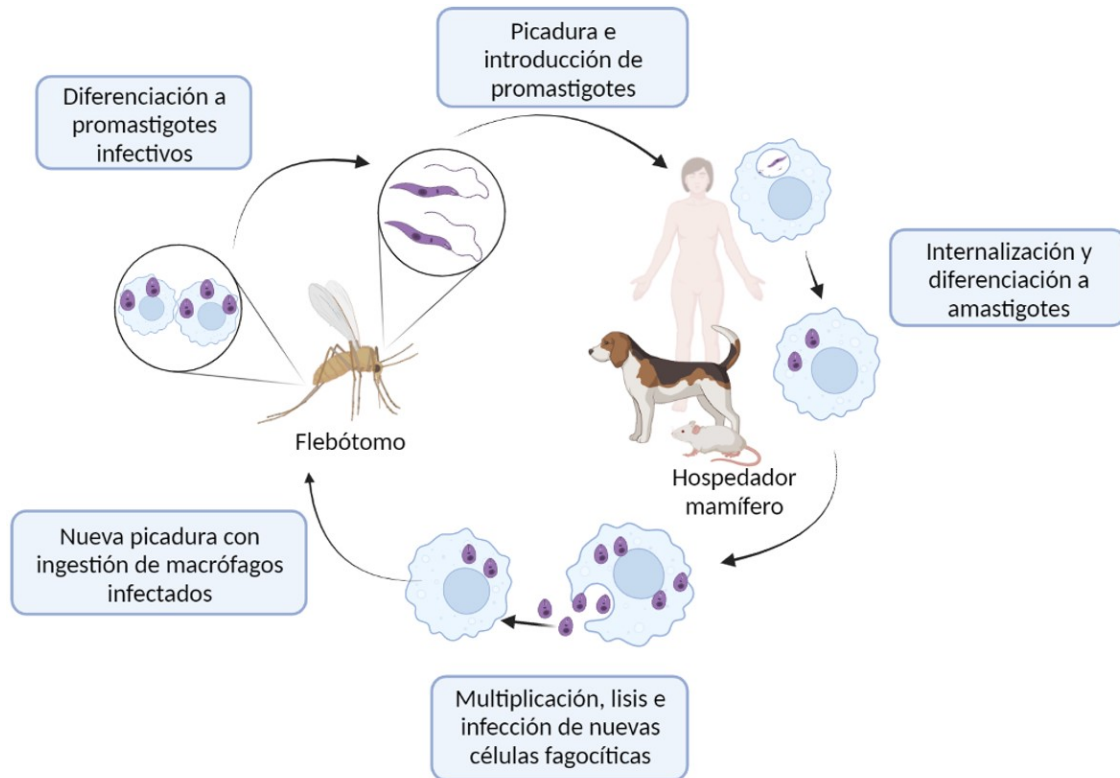
### I. Leishmaniasis.

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria con diversas presentaciones clínicas producida por protozoos del género *Leishmania* y transmitidas por la picadura de insectos hembras del género *Phlebotomus* o *Lutzomyia* (Gradoni *et al.* 2017). La leishmaniasis es clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro de las enfermedades tropicales desatendidas (NTDs). Además, se trata de una de las enfermedades con más carga de morbilidad y mortalidad asociada, siendo la segunda enfermedad parasitaria con mayor número de años de vida ajustados por discapacidad (DALYs) (Hotez *et al.* 2016).

#### I.1. Ciclo biológico de *Leishmania*.

En el ciclo biológico de *Leishmania* participan un hospedador mamífero, principalmente cánidos, roedores y humanos, y un insecto vector (figura 1). Tras la picadura del vector infectado se introduce en el hospedador la forma extracelular, móvil y flagelada del parásito, denominada promastigote. Una vez dentro del hospedador, estos promastigotes son internalizados por las células fagocíticas, en las cuales se produce la diferenciación del parásito hacia la forma amastigote, aflagelar e intracelular. Los amastigotes se multiplican rápidamente en el interior de la célula, provocando su lisis y, con ello, su liberación al medio. Este proceso conduce al ingreso de más parásitos en nuevas células fagocíticas, expandiéndose así la infección en el hospedador. El ciclo se completa cuando un nuevo flebótomo se alimenta de la sangre de un hospedador infectado. Durante esta ingesta se capturan macrófagos infectados con amastigotes que, se diferencian de nuevo, en el intestino del vector, en promastigotes, originando así la forma infectiva del parásito.

La mayoría de las especies de *Leishmania* presentan un ciclo de transmisión zoonótico en el que están implicados una serie de reservorios mamíferos como roedores, primates o cánidos, entre los que destaca el perro como reservorio doméstico en la infección por *L. infantum* (Ready 2008). Sin embargo, en las infecciones producidas por *L. donovani* o *L. tropica* pueden darse ciclos de transmisión antroponóticos en los que el reservorio lo constituyen los individuos humanos enfermos y asintomáticos, lo que incrementa el riesgo de transmisión directa, conduciendo a la aparición de brotes epidémicos (Desjeux 2001; Bern *et al.* 2008).



**Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania*.** Representación gráfica del ciclo biológico de *Leishmania* entre el hospedador mamífero y el insecto vector. Imagen creada a través de BioRender.com

## 1.2. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis.

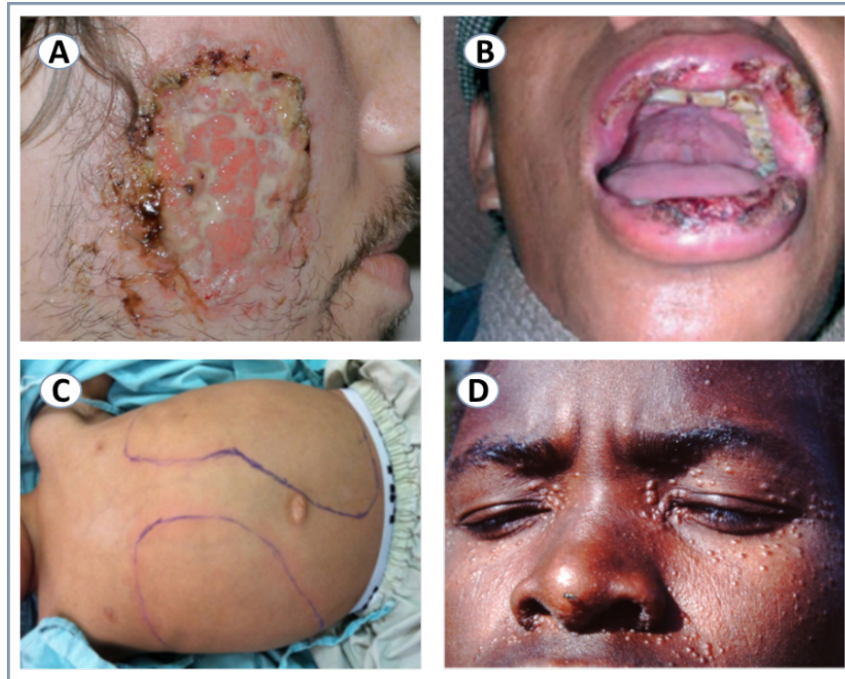
Se conocen más de 20 especies de *Leishmania* causantes de las distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad. Estas manifestaciones clínicas dependen tanto de la especie infectante como del estado inmunológico del hospedador (Burza *et al.* 2018) y se pueden dividir en tres tipos:

- Leishmaniasis cutánea (LC). Es la manifestación clínica menos grave y la más común de esta enfermedad parasitaria, aunque puede producir una estigmatización generalizada del paciente. Los distintos signos clínicos varían en función de la especie de *Leishmania* causante de la patología, principalmente *L. major*, *L. tropica* y *L. braziliensis*, y se producen como consecuencia de una respuesta inflamatoria local exacerbada. De forma general, se caracterizan por la aparición de lesiones en el sitio de inoculación que evolucionan hacia la formación de pápulas, seguido de un proceso de ulceración que termina, en la mayoría de las ocasiones, resolviéndose de forma espontánea (Abadias-Granado *et al.* 2021). Aunque estas lesiones confieren inmunidad

frente a reinfecciones, en algunos casos como las infecciones producidas por *L. aethiopica* o *L. braziliensis*, se pueden producir complicaciones dando lugar a máculas cutáneas que se expanden, desembocando en lo que se conoce como leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) (Okwor and Uzonna 2008).

- Leishmaniasis mucocutánea (LMC). Aparece tras la cura de la LC producida especialmente por *L. braziliensis*. Entre el 2 y el 5 % de las ocasiones se produce una diseminación linfática del parásito desde el sitio de inoculación hasta las mucosas bucales y nasales (de Oliveira and Brodskyn 2012). Esta diseminación del parásito desemboca frecuentemente en mutilaciones de las mucosas tras la destrucción de la piel, lo que produce una drástica estigmatización del paciente (WHO 2010).

- Leishmaniasis visceral (LV). También denominada como kala-azar, es producida por la infección causada por *L. infantum* y *L. donovani*, siendo la manifestación clínica más grave de esta enfermedad parasitaria, ya que es mortal en ausencia de tratamiento (Faleiro *et al.* 2014). La sintomatología asociada es consecuencia de la diseminación de las células fagocíticas infectadas al hígado, bazo y médula ósea, ocasionando una alteración en su correcto funcionamiento. Por ello, los signos característicos relacionados con esta manifestación clínica son fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia, neutropenia, leucopenia e hipergammaglobulinemia (van Griensven and Diro 2012). Además, en zonas del Este de África o en el Subcontinente Indio pueden aparecer complicaciones tras la cura de la LV, originando lo que se conoce como leishmaniasis dérmica post kala-azar (PKDL). En estos casos se produce una acumulación excesiva de los parásitos en los macrófagos de la epidermis, generando una erupción característica de pápulas o máculas por toda la superficie de la piel (Zijlstra 2016). Se conoce que aquellos individuos que desarrollan PKDL actúan como reservorios de la enfermedad, facilitando la propagación de la LV (Al-Salem *et al.* 2016).



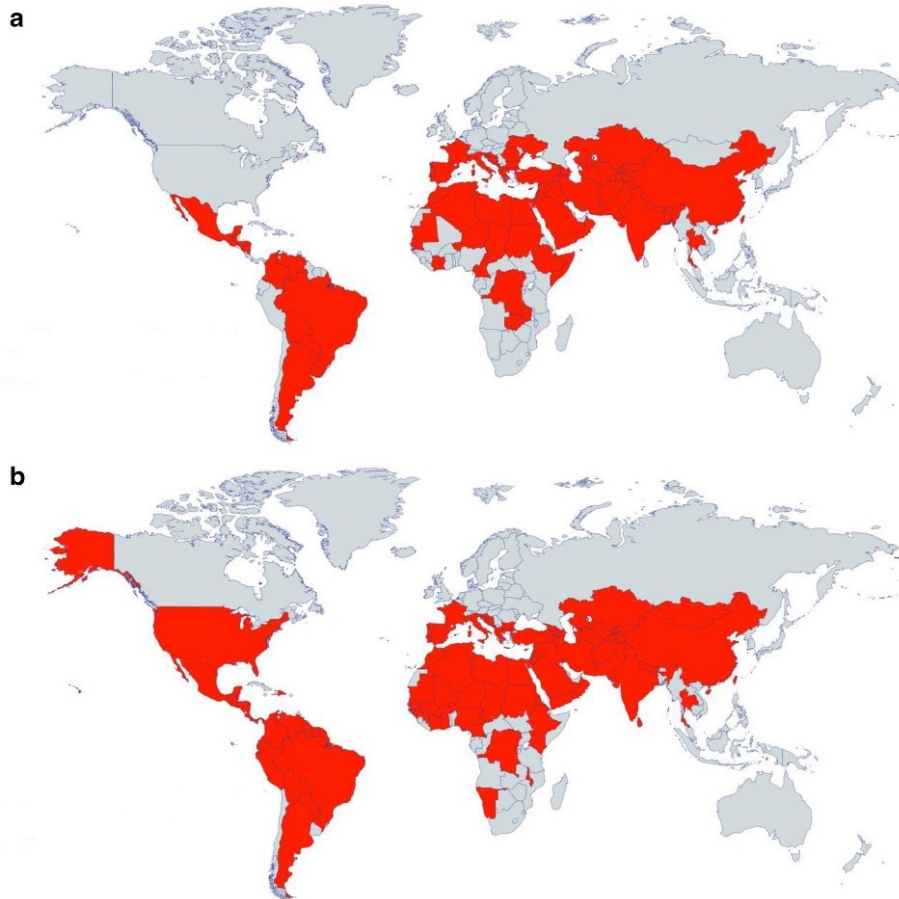
**Figura 2. Formas clínicas de la leishmaniasis.** (A) Leishmaniasis cutánea con lesión ulcerativa. (B) Leishmaniasis mucocutánea con destrucción de la mucosa bucal. (C) Leishmaniasis visceral con presencia de hepatoesplenomegalia. (D) Leishmaniasis dérmica post kala-azar con erupción papular. Imágenes extraídas de Burza *et al.* (2018), Chappuis *et al.* (2007), Sangenis *et al.* (2014) y Zijlstra (2016), respectivamente.

### I.3. Epidemiología y distribución de la enfermedad.

Se estima que anualmente se producen 1.000.000 de casos de LC y hasta 90.000 casos de LV, aunque existe una importante subdeclaración de los casos de leishmaniasis y, por lo tanto, estas cifras no reflejan la realidad de la enfermedad (Burza *et al.* 2018). Es importante resaltar que, a pesar de que el número de casos de LV es discreto, el 95 % de los mismos presentan consecuencias fatales en ausencia de tratamiento, llegando hasta las 30.000 muertes anuales (Makau-Barasa *et al.* 2022).

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en 98 países, de los cuales Afganistán, Iraq, Brasil o Siria reportan la mayor parte de casos de LC; mientras que el 90 % de los casos de LV ocurren en países como India, Bangladés, Sudán del Sur, Sudán, Brasil y Etiopía (WHO. 2017). En los últimos años se han implementado una serie de medidas de control, impulsadas por la OMS, entre las que destacan el diagnóstico temprano, el control de la transmisión y el acceso a los medicamentos. Estas estrategias han conseguido reducir la incidencia de la LV, así como las muertes asociadas en un 30

%, especialmente en el este de África y en el sur de Asia, dos de las regiones más afectadas por la enfermedad (Alvar *et al.* 2021; Rijal *et al.* 2019).



**Figura 3. Mapa de distribución geográfica de los casos de leishmaniasis.** En rojo se señalan los países endémicos de leishmaniasis visceral (a) y cutánea (b). Imagen correspondiente a los datos de 2018 de la OMS, adaptada de Sasidharan and Saudagar (2021).

#### **I.4. La leishmaniasis en España.**

La mayoría de los casos de leishmaniasis ocurren en países de las zonas tropicales y subtropicales del planeta. La Cuenca Mediterránea es tradicionalmente una zona endémica de esta enfermedad, aunque presenta una baja prevalencia de la leishmaniasis humana. En los últimos años se ha producido una reemergencia de la enfermedad en esta zona, con aparición de casos en países que no eran endémicos y con incremento de estos casos en países que sí eran endémicos de la enfermedad. Esta situación ha sido propiciada por diversos factores entre los que se encuentran los

---

cambios ambientales, que conllevan fundamentalmente una redistribución del vector y de los reservorios, así como la extensión del período de transmisión. También destacan factores sociales como los viajes a zonas endémicas o los conflictos bélicos. Además, en los países del sur de Europa destaca la influencia de factores sanitarios como la pandemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la generalización de trasplantes de órgano sólido y el incremento en el uso de tratamientos inmunosupresores (Glans *et al.* 2018; Ready 2010).

España es el país europeo con más casos reportados de leishmaniasis visceral humana (WHO. 2017). En el año 2009 se declaró en nuestro país un brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid causado por *L. infantum*. Hasta la fecha ha sido el brote epidémico más grande que se ha producido en Europa, con más de 770 casos, de los cuales el 35,9 % fueron de LV y el 64,1 % de LC, incrementando la incidencia de la enfermedad en la zona más de 100 veces, de 0,3 a 43,5 por cada 100.000 habitantes (Arce *et al.* 2013; Horrillo *et al.* 2019; Humanes-Navarro *et al.* 2021).

El aumento general de casos en España se ha visto, además, propiciado por el incremento de personas inmunodeprimidas, al ser la inmunosupresión un factor fundamental de riesgo individual (Carrillo *et al.* 2013). La extensión de la pandemia VIH/SIDA en zonas endémicas de leishmaniasis produjo entre los años 80 y 90 en nuestro país el mayor número de enfermos coinfectados VIH-*Leishmania* de toda Europa, hasta la introducción de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) (Alvar *et al.* 2008). En la actualidad, son aquellas personas que presentan una supresión del sistema inmunológico por el uso de fármacos inmunosupresores, las que se encuentran ante una mayor dificultad a la hora de contener la infección y, por lo tanto, son más propensas a desarrollar las formas viscerales de la enfermedad. Esta situación se observó en el brote de Fuenlabrada, en la Comunidad de Madrid, donde el factor de riesgo intrínseco más importante para desarrollar leishmaniasis visceral fue la inmunosupresión farmacológica, con un 15,6 % de los casos frente al 10 % en pacientes VIH (Arce *et al.* 2013).

Esta nueva situación de pacientes con leishmaniasis visceral que presentan una inmunosupresión debido a tratamientos inmunosupresores frente a enfermedades

autoinmunes genera numerosas preguntas que aún están por resolver. La mayor gravedad clínica en estas condiciones de inmunosupresión, así como el mayor riesgo de recaídas por falta de respuesta al tratamiento leishmanicida son unas de ellas. Por este motivo, el desarrollo de esta tesis doctoral se centra en el estudio de la leishmaniasis visceral producida por *L. infantum* y en el tratamiento de la infección, en condiciones de inmunosupresión farmacológica.

## **II. Respuesta inmunitaria frente a la infección por *Leishmania*.**

La respuesta inmunitaria frente a la infección por *Leishmania* depende de un amplio espectro de factores y varía dependiendo de la especie de *Leishmania* implicada y de la situación inmunitaria del hospedador. Dado que este trabajo se centra en el desarrollo de la leishmaniasis visceral producida por *L. infantum*, se detalla a continuación la respuesta inmunitaria asociada a esta manifestación clínica. Algunos de los mecanismos que se describen ocurren, no obstante, en otras manifestaciones clínicas de la leishmaniasis.

### **II.1. Respuesta inmunitaria innata.**

En los primeros momentos de la infección se produce una rápida movilización de neutrófilos al sitio de inoculación de los promastigotes, los cuales fagocitan a estos parásitos. Los neutrófilos, una vez infectados por *Leishmania*, presentan una vida media corta, por lo que rápidamente evolucionan hacia un estado apoptótico. Una vez alcanzado este estado, son internalizados por los macrófagos, realizando una función de intermediarios entre *Leishmania* y sus principales células hospedadoras. Este mecanismo supone una vía de entrada silenciosa de los promastigotes en el organismo al retrasar la respuesta inmunitaria frente a la infección (Peters *et al.* 2008; Liu and Uzonna 2012). La secreción de la citoquina IL-8 por los neutrófilos conlleva un reclutamiento de más neutrófilos al sitio de infección, lo que implica una entrada masiva de promastigotes por esta vía (Charmoy *et al.* 2010). *Leishmania*, por su parte, ha sido capaz de desarrollar varios mecanismos de evasión, evitando temporalmente su eliminación, al eludir la acción lítica de estos neutrófilos (Charmoy *et al.* 2010; Gueirard *et al.* 2008).

Los macrófagos actúan como células hospedadoras definitivas del parásito y, además, son unas de las células responsables del control de la infección por *Leishmania*.

---

Una vez activados tanto por interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) como por el factor de necrosis tumoral (TNF), producen moléculas tóxicas para el parásito, mediante el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la generación de óxido nítrico (NO), a través de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) (Sisto *et al.* 2001; Cunningham 2002). Además, son capaces de acidificar el medio que, como consecuencia, lleva a una degradación del ADN del parásito y, con ello, a la eliminación del mismo.

Como mecanismo de resistencia, *Leishmania* es capaz de fomentar su persistencia en los macrófagos, al aumentar la expresión de citoquinas como IL-4, IL-13 e IL-10 así como de la enzima arginasa, que inhibe la producción de óxido nítrico (Liu *et al.* 2012; Muxel *et al.* 2017).

Posteriormente, se produce la llegada de las células natural killer (NK) y las células dendríticas (DCs) al sitio de infección. Las células NK son principalmente responsables de controlar la diseminación del parásito al activar a los macrófagos infectados por medio de la secreción endógena de IFN- $\gamma$  y TNF (Manna *et al.* 2014; Stanley and Engwerda 2007). Por otro lado, entre las células presentadoras de antígenos, las células dendríticas reconocen a los antígenos como *Leishmania* a través de receptores tipo toll (TLR) y los transportan hacia los órganos linfoides para presentárselos a las células T (Shortman and Liu 2002). Durante su migración a los órganos linfoides estas células dendríticas experimentan un proceso de maduración que consiste en el aumento de la expresión en su superficie del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), responsable de la presentación antigénica (Feijo *et al.* 2016). Además, se ha visto que, en este proceso de maduración las células dendríticas se pueden diferenciar hacia un subtipo de células dendríticas inflamatorias, denominadas también Tip-DCs. Estas Tip-DCs están implicadas en el control de la infección por *Leishmania* al producir TNF y NO (De Trez *et al.* 2009; Schmid *et al.* 2012).

## II.2. Respuesta inmunitaria adaptativa celular.

En los órganos linfoides se produce la presentación antigénica a los linfocitos T, principales células de la respuesta inmunitaria celular que se activarán produciendo citoquinas. En función del tipo de citoquina que secreten estos linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, se producirá una respuesta celular de tipo Th1, de protección, o de tipo Th2, de susceptibilidad a la infección por *Leishmania* (figura 4).

La primera señal que producen las células dendríticas es una rápida secreción de IL-12, citoquina de especial importancia en el desarrollo de una respuesta inmunitaria de tipo Th1. La presencia de esta citoquina va a estimular y a diferenciar a las células T naive hacia células T CD4<sup>+</sup> o T CD8<sup>+</sup> con fenotipo Th1. Tanto los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como los T CD8<sup>+</sup> son responsables de la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2. Por su parte, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> secretan, además, granzimas y perforinas con potencial citolítico, responsables de la eliminación del parásito (Novais and Scott 2015; Stager and Rafati 2012).

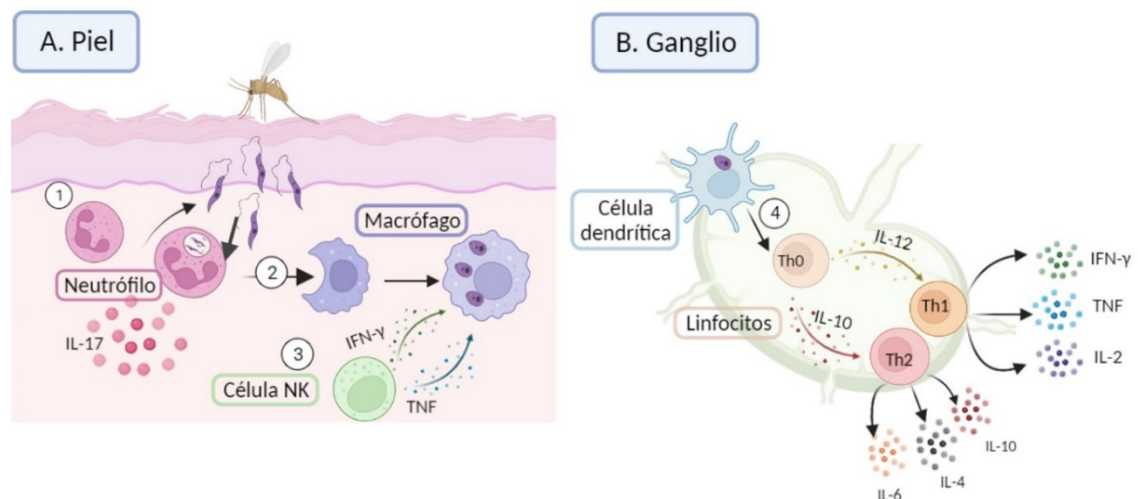
Estas citoquinas pro-inflamatorias van a activar a los macrófagos infectados para generar un incremento de óxido nítrico, capaz de eliminar a los amastigotes (Engwerda *et al.* 2004; Cunningham 2002). Sin embargo, a pesar de su papel protector, un exceso descontrolado de estas citoquinas pro-inflamatorias conduce hacia un estado de inflamación crónica relacionada con daño tisular y con una disfunción inmunológica (Stanley *et al.* 2007).

Esta respuesta de tipo Th1 se complementa con la acción de los linfocitos Th17, los cuales, a través de la producción de la citoquina IL-17, fomentan la migración y activación de los neutrófilos (Alexander and Brombacher 2012). Esta IL-17 ayuda también a prevenir el desarrollo de una leishmaniasis visceral, controlando la replicación del parásito, al actuar de forma sinérgica con el IFN- $\gamma$  para aumentar la secreción de óxido nítrico por los macrófagos infectados (Faleiro *et al.* 2014; Jawed *et al.* 2019).

Si, por el contrario, los linfocitos T producen citoquinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-6 e IL-10, se genera una respuesta celular de tipo Th2 que permite la persistencia del parásito. La citoquina IL-10 es producida por un gran número de células entre las que se encuentran linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, células NK y los linfocitos T reguladores (Treg). Su función principal consiste en desactivar los mecanismos leishmanicidas de los macrófagos, provocando una ausencia de respuesta a las señales de activación y, con ello, promoviendo el crecimiento de los amastigotes (Rodrigues *et al.* 2016). Además, suprime la función de las células dendríticas como células presentadoras de antígenos al inhibir la producción de IL-12 (Nylen and Sacks 2007). Otra de las funciones de la IL-10 es la de producir la proteína de muerte programada (PD-1) que lleva al agotamiento

de los linfocitos T y, con ello, a una disminución de su funcionalidad y, por tanto, a la reducción en la secreción de citoquinas pro inflamatorias (Wherry and Kurachi 2015).

Los linfocitos T reguladores (Treg) representan entre el 5 y el 10 % de las células T CD4<sup>+</sup> y presentan un papel complementario al de los linfocitos Th2, descritos previamente, al ser una fuente importante de IL-10 (Rodrigues *et al.* 2009; Jawed *et al.* 2019). Estos Treg disminuyen, por lo tanto, la respuesta del sistema inmunitario al inhibir la frecuencia de las células T efectoras, especialmente durante las primeras etapas de infección, conduciendo a una activación de la patología asociada a la LV (Rai *et al.* 2012).



**Figura 4. Esquema general de la respuesta inmunitaria desarrollada durante la leishmaniasis visceral.** En A se detalla la respuesta inmunitaria innata originada tras la picadura del flebótomo. Con la picadura del flebótomo infectado se produce la entrada de promastigotes que serán rápidamente fagocitados por los neutrófilos (1). Estos neutrófilos son fagocitados por los macrófagos (2), en el interior de los cuales se produce una rápida multiplicación de los amastigotes de *Leishmania*. Las células natural killers (NK) tras su llegada al sitio de inoculación, secretan de forma temprana IFN- $\gamma$  y TNF para intentar controlar la infección (3). En B se muestra el proceso de presentación antigénica llevado a cabo por las células dendríticas en los ganglios linfáticos. Si con la presentación del antígeno (4) a los linfocitos T naive (Th0) se produce una secreción de la citoquina IL-12, estos linfocitos se diferencian hacia el fenotipo Th1, encargados de controlar la infección por medio de la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2. Por el contrario, si la activación de los linfocitos T naive conduce a la producción de la citoquina IL-10, estos se diferencian hacia el fenotipo Th2 de susceptibilidad a la infección con producción de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10, IL-4 e IL-6. Dibujo de elaboración propia creado con BioRender.com.

### II.3. Respuesta inmunitaria adaptativa humoral.

La producción de anticuerpos por las células B en la infección por *Leishmania* y, especialmente en los casos de leishmaniasis visceral, se relaciona con una progresión de la infección y con una respuesta celular de tipo Th2. Esto se debe a que los anticuerpos forman inmunocomplejos con los antígenos que pueden unirse al receptor Fc de los macrófagos, provocando un aumento en la secreción de IL-10, lo que incrementa la patología asociada a la leishmaniasis visceral (Silva-Barríos *et al.* 2016). Se ha determinado que, en estados avanzados de la enfermedad, se produce un aumento en la cantidad de anticuerpos IgG que favorecen la persistencia del parásito siendo, por lo tanto, la hipergammaglobulinemia uno de los signos de una enfermedad visceral activa (Rodríguez *et al.* 2016). Por este motivo, la presencia de anticuerpos resulta de utilidad en el diagnóstico de la leishmaniasis visceral (WHO 2010).

### III. Tratamientos farmacológicos frente a la leishmaniasis.

El tratamiento de la leishmaniasis visceral humana sigue siendo a día de hoy un reto importante ya que, para que sea efectivo, tiene que resolver la infección y además reducir el riesgo de recaídas, especialmente en personas con un sistema inmunitario debilitado. En la actualidad, este tratamiento está basado en una lista reducida de agentes quimioterapéuticos que varían en función de la región geográfica y que presentan un coste elevado, una toxicidad alta y, por lo general, una difícil administración (Sundar and Singh 2018). Entre los tratamientos empleados se encuentran:

- Antimoniales pentavalentes. Desde su introducción en 1940 como estibogluconato de sodio (SSG) o antimoniato de meglumina (MA), han sido el tratamiento de primera línea de elección para la LV hasta la aparición de resistencias, especialmente en zonas de la India (Sundar *et al.* 2000; Sundar and Rai 2002). Su mecanismo de acción está basado en la inhibición de la replicación del ADN del parásito (Sundar *et al.* 2018). Para ello, la forma pentavalente del antimonio ( $Sb^V$ ), considerada como un pro-fármaco, tiene que entrar en el interior de los macrófagos infectados y reducirse a su forma activa trivalente ( $Sb^{III}$ ). Una vez activa, inhibe el metabolismo redox de los tioles, esencial en tripanosomátidos (Schmidt and Krauth-Siegel 2002), aumentando la acumulación de ROS en el parásito y conduciendo a un estado

---

apoptótico de los amastigotes (Wyllie *et al.* 2004). *Leishmania* ha desarrollado la habilidad de resistir a la acción de estos tratamientos a través de dos mecanismos principales. El primero de ellos corresponde a la reducción de los transportadores de membrana ABC, encargados del acceso de los antimoniales al interior de los macrófagos infectados, disminuyendo, por lo tanto, la entrada del antimonio a la célula (Ouellette *et al.* 2004; Baiocco *et al.* 2009). El segundo mecanismo de resistencia consiste en la amplificación génica del gen que codifica para la proteína mrpa, encargada de secuestrar metales como el antimonio en vacuolas, conduciendo a su expulsión de la célula (Douanne *et al.* 2020; Rai *et al.* 2013). Actualmente, debido al aumento de resistencias, el tratamiento de elección frente a la LV es la anfotericina b liposomal.

- Anfotericina b liposomal. Se trata de un antifúngico que se introdujo en su formulación no lipídica en 1980 para el tratamiento de la leishmaniasis visceral en la India. Su mecanismo de acción consiste en la interferencia con el ergosterol, componente fundamental para el correcto funcionamiento de la membrana de *Leishmania* (de Souza and Rodrigues 2009). Estas formulaciones no lipídicas de la anfotericina B exhiben una eficacia del 92 % en casos de pacientes con fallo terapéutico tras la administración de antimoniales (Monge-Maillo and Lopez-Velez 2013). Sin embargo, presentan frecuentes reacciones adversas. Para disminuir las reacciones al tratamiento se desarrollaron formulaciones liposomales de la anfotericina B, las cuales presentan las mismas eficacias (Lopez-Velez *et al.* 2004). Por ello, es el tratamiento de primera línea de elección para la leishmaniasis visceral en la región Mediterránea (WHO 2010). No obstante, a pesar de la efectividad de la anfotericina B liposomal, su coste sigue siendo excesivo en muchas regiones endémicas (Uliana *et al.* 2018), lo que hace que no se administren en zonas de escasos recursos.

- Paromomicina. Es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro que empezó a utilizarse en pacientes con leishmaniasis en 1990 por su actividad sinérgica a los antimoniales, aunque con menor eficacia que éstos. Su mecanismo de acción consiste en la afectación de la síntesis de proteínas al interactuar con los ribosomas del parásito, y, además, inhibe la actividad mitocondrial (Maarouf *et al.* 1997). Sin embargo, presenta eficacias que varían según las regiones geográficas con porcentajes de cura del 30 % en Sudán o del 80 % en Kenia (Monge-Maillo *et al.* 2013). En lo que

respecta a la Cuenca Mediterránea, no hay datos reportados de pacientes de leishmaniasis visceral que hayan sido tratados con este fármaco.

- Miltefosina. Es el único fármaco de administración oral frente a la leishmaniasis, por lo que debido a su fácil administración y a las eficacias demostradas ha sido, desde 2002, recomendado como tratamiento de elección para la LV en India y Bangladesh (Sundar *et al.* 2008). Se trata de un agente antitumoral cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la biosíntesis de fosfolípidos. En *Leishmania*, estos fosfolípidos están presentes en la superficie del parásito (Lux *et al.* 2000). Sin embargo, estudios recientes están demostrando una disminución de su eficacia con tasas de entre el 70 y el 80 % de curación, debido a la aparición de parásitos resistentes, entre otras cosas (Sundar *et al.* 2012). A esta problemática se suman los efectos adversos asociados, entre los que se encuentran la toxicidad gastrointestinal y hepática, así como el potencial teratogénico, lo que hace que no sea recomendable para mujeres embarazadas o en edad fértil (Uliana *et al.* 2018).

- Tratamientos combinados. Con el objetivo de reducir el tiempo de administración, las dosis de los distintos tratamientos leishmanicidas, así como los efectos adversos asociados y la aparición de resistencias, en estos últimos años se están llevando a cabo combinaciones de dos o más fármacos con actividad sinérgica y distintos mecanismos de acción. Dos son las estrategias desarrolladas hasta el momento son:

- En primer lugar, en el este de África se administra la combinación de antimoniales pentavalentes y paromomicina (WHO 2010). Esta combinación de tratamientos ha demostrado una reducción del tiempo de tratamiento de 30 a 17 días con una cura del 86 % (Atia *et al.* 2015; Musa *et al.* 2012). Sin embargo, presenta la limitación de no ser aplicable a pacientes con VIH, mujeres embarazadas o personas con fallo renal (Uliana *et al.* 2018) debido a las toxicidades asociadas a ambos fármacos.

- En segundo lugar, la combinación de anfotericina b con miltefosina, empleada fundamentalmente en la India, ha demostrado una curación terapéutica en el 95 % de los casos y una reducción en la toxicidad asociada y en el coste de la terapia (WHO 2010). En los diferentes ensayos clínicos realizados con esta combinación de fármacos no se han registrado efectos adversos asociados y, además, se disminuye el riesgo de aparición de parásitos resistentes a la miltefosina (Uliana *et al.* 2018). Es zonas del Este

---

de África o en Brasil esta combinación no resulta tan eficaz (Chakravarty and Sundar 2019).

Los diferentes tratamientos farmacológicos empleados frente a la leishmaniasis visceral, descritos en este apartado, presentan una menor eficacia en aquellos pacientes con un sistema inmunitario debilitado. Esto es debido a que un factor fundamental para el éxito completo de cualquier terapia leishmanicida es el desarrollo de una respuesta inmunitaria efectiva frente al parásito capaz de ayudar a su eliminación.

#### **IV. Inmunosupresión, tratamientos inmunosupresores y leishmaniasis visceral.**

Tal y como se ha descrito anteriormente, un sistema inmunitario debilitado condiciona tanto la gravedad de la enfermedad como la respuesta al tratamiento. Por este motivo, la inmunosupresión es uno de los factores de riesgo principales que predisponen a sufrir una leishmaniasis visceral severa.

La inmunosupresión se asocia tradicionalmente a pacientes coinfectados con VIH y *Leishmania* debido a que en ambos patógenos los macrófagos actúan como células hospedadoras definitivas. Además, la coinfección VIH-*Leishmania* produce una retroalimentación de los mecanismos patogénicos de ambos (Andreani *et al.* 2012). Se conoce que el VIH incrementa de forma drástica el riesgo de sufrir una leishmaniasis visceral severa, con una incidencia 418 veces mayor con respecto a pacientes no VIH (Alvar *et al.* 2008; Pintado *et al.* 2001). Además, disminuye la respuesta al tratamiento en un 30 % (Akuffo *et al.* 2018; Adriaensen *et al.* 2017).

Sin embargo, en los últimos años se está produciendo un aumento de casos de LV en pacientes inmunosuprimidos no VIH. Un ejemplo de ello se observó en el brote de 2009 de Fuenlabrada, en la Comunidad de Madrid. En dicho brote, de entre los casos de leishmaniasis visceral producidos en personas inmunodeprimidas, el 50 % ocurrieron en pacientes bajo una terapia inmunosupresora (Arce *et al.* 2013). Entre estos pacientes se encuentran aquellos que reciben fármacos inmunosupresores, tanto para evitar un rechazo en trasplantados de órgano sólido (TOS) (Carrillo *et al.* 2015), como para el tratamiento de enfermedades como el cáncer o enfermedades autoinmunes, como por ejemplo la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria intestinal. Es precisamente en este último grupo de pacientes en el que están apareciendo más casos de

leishmaniasis visceral, suponiendo un 15,2 % de todos los casos declarados (Antinori *et al.* 2012; van Griensven *et al.* 2014). Además, el incremento en el número de personas que reciben estos tratamientos y el aumento de viajes a zonas endémicas está dando lugar a la aparición de brotes de leishmaniasis en zonas no endémicas, como los ocurridos recientemente en Noruega (Schwartz *et al.* 2019) y Suecia (Glans *et al.* 2018).

Si comparamos la eficacia del tratamiento de la leishmaniasis visceral en pacientes inmunosuprimidos por VIH y en aquellos inmunosuprimidos farmacológicamente, estos últimos responden mejor al tratamiento de la leishmaniasis y experimentan menos recaídas que los pacientes con VIH. Sin embargo, las tasas de curación que presentan son un 10 % más bajas que las de la población inmunocompetente, ya que el tratamiento de la leishmaniasis visceral se complica al solapar e interaccionar con la terapia inmunosupresora implementada (van Griensven *et al.* 2014; Antinori *et al.* 2008). Este hecho agrava la situación de los pacientes y conduce a la necesidad de retirada del fármaco inmunosupresor durante el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Tras el tratamiento frente a la leishmaniasis visceral, con la reintroducción del fármaco inmunosupresor incrementa el riesgo de recaídas tempranas en aquellos pacientes en los que no se haya logrado la cura parasitológica (Botana *et al.* 2021).

Actualmente, no se dispone de guías clínicas para el manejo de estos pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente ni se conocen los mecanismos celulares que subyacen en la mayor susceptibilidad de estos pacientes a la leishmaniasis. Por este motivo, esta tesis doctoral está centrada en el estudio de la inmunosupresión debida a tratamientos farmacológicos. La mayor parte de los casos de leishmaniasis visceral en pacientes con enfermedades autoinmunes ocurren en aquellos pacientes que reciben inmunosupresión farmacológica con antagonistas del TNF (anti-TNF) o metotrexato (MTX) (Kurizky *et al.* 2020). Por este motivo, se describen a continuación los aspectos más relevantes de estos dos tratamientos inmunosupresores.

### **IV.1. Inmunosupresión con antagonistas del TNF.**

Tal y como se ha descrito en la sección anterior (apartado II), el TNF es una citoquina crucial para el control de enfermedades causadas por patógenos intracelulares como *Leishmania* al presentar un papel central en la activación,

diferenciación y reclutamiento de células inflamatorias como los macrófagos. Sin embargo, un exceso descontrolado de esta citoquina genera una inflamación crónica característica de enfermedades autoinmunes e infecciosas.

Desde 1998 se han desarrollado una serie de tratamientos antagonistas del TNF cuya función consiste en la inhibición de esta citoquina, con el objetivo de disminuir su actividad inflamatoria, constituyendo así una terapia de especial importancia para el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes (Keyser 2011). Estos antagonistas del TNF presentan dos mecanismos de acción diferenciados, aunque en todos ellos la molécula diana es el TNF. Por un lado, destacan los anticuerpos monoclonales Infliximab y Adalimumab, responsables de la neutralización del TNF soluble, que, además, regulan negativamente otras citoquinas pro-inflamatorias y conducen a la apoptosis de las células que expresan el TNF en su superficie (Mpofu *et al.* 2005; Azevedo *et al.* 2012). Por otro lado, los tratamientos que se unen al receptor del TNF soluble, como el Etanercept, actúan como competidores inhibitorios de este TNF. Estos antagonistas reducen también el reclutamiento de neutrófilos al sitio de inflamación, por lo que disminuye la activación de los macrófagos (Zanger *et al.* 2012; Yang *et al.* 2018).

El uso de estos tratamientos inmunosupresores ha mejorado en gran medida el curso de algunas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn o la psoriasis y, con ello, las condiciones de vida de las personas que las padecen. Sin embargo, al reducir la capacidad del sistema inmunitario mediante la disminución de la activación y proliferación de los linfocitos T (Saporito *et al.* 2013), incrementan en estos pacientes el riesgo de sufrir enfermedades oportunistas como la leishmaniasis (Bosch-Nicolau *et al.* 2019; Neumayr *et al.* 2013). Aunque ambos antagonistas del TNF aumentan el riesgo de sufrir leishmaniasis visceral, este es ocho veces mayor al emplear aquellos antagonistas monoclonales como el Infliximab que los que se unen al receptor como el Etanercept, especialmente durante las primeras dosis de tratamiento (Neumayr *et al.* 2013; Garcia-Vidal *et al.* 2009). No existen datos concretos sobre los mecanismos celulares específicos que subyacen en este efecto de los tratamientos antagonistas del TNF sobre la infección por *Leishmania*. Por este motivo, un compuesto antagonista del TNF soluble va a ser empleado en el desarrollo

de esta tesis doctoral, para evaluar el efecto de la inmunosupresión con este fármaco en la leishmaniasis visceral y su tratamiento.

### IV.2. Inmunosupresión con metotrexato.

Desarrollado para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, desde 1990 el metotrexato es uno de los inmunosupresores más empleados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Gaies and Jebabli 2012). Al ser un antagonista del ácido fólico, bloquea la síntesis de purinas y pirimidinas y, por lo tanto, su principal mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis del ADN celular. Para poder ser activos, estos folatos tienen que reducirse por medio de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) a timidilatos, constituyentes importantes del ADN (Barnhart *et al.* 2001). De tal forma que, para bloquear esta ruta, el metotrexato actúa como un competidor inhibitorio de la enzima DHFR, por lo que se reducen los niveles intracelulares de folatos necesarios para la síntesis de ADN, disminuyendo así la replicación celular y conduciendo a la apoptosis de las células (Tian and Cronstein 2007; Thomas *et al.* 2015).

Se ha visto que los pacientes inmunosuprimidos con metotrexato presentan entre un 15 y un 17 % más de probabilidades de sufrir enfermedades oportunistas como la leishmaniasis que la población inmunocompetente (Marie *et al.* 2011; van der Veen *et al.* 1994). Esto se debe, en parte, a que el metotrexato presenta como efecto adverso la supresión de la médula ósea (Fotoohi and Albertioni 2008), lo que conlleva una disminución en la producción de los linfocitos T y una inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos (Loarce-Martos *et al.* 2019). Esta situación origina una disminución en la activación de los macrófagos, disminuyendo la respuesta inmunitaria celular frente al parásito.

No obstante, estudios previos han descrito un efecto leishmanicida del metotrexato (Mahmoudvand *et al.* 2017). *Leishmania* no solo necesita la presencia de folatos para su correcto crecimiento sino también de pteridinas, las cuales son reducidas por la enzima pteridin reductasa (PTR1). El metotrexato es capaz de inhibir el funcionamiento tanto de la enzima DHFR como de PTR1 que actúan como diana primaria y secundaria de dicho fármaco, respectivamente (Gazanion *et al.* 2016), aumentando así la sensibilidad del parásito al mismo. Sin embargo, *Leishmania* ha desarrollado un

mecanismo de resistencia frente a la acción leishmanicida del metotrexato que consiste en la amplificación cromosómica de ambas enzimas (Ubeda *et al.* 2008).

Existen pocos datos que permitan entender la mayor gravedad clínica que presentan estos pacientes inmunosuprimidos, a pesar del efecto leishmanicida del MTX. Por este motivo, este fármaco va a ser empleado en esta tesis doctoral para el estudio de la leishmaniasis visceral y su tratamiento en condiciones de inmunosupresión farmacológica.

## **V. Modelos animales para el estudio de la leishmaniasis visceral en condiciones de inmunosupresión farmacológica**

El uso de modelos animales de experimentación ha permitido estudiar los aspectos inmunológicos implicados en la patología de la leishmaniasis y, además, resultan útiles para la evaluación de la efectividad de los fármacos leishmanicidas (Uliana *et al.* 2018).

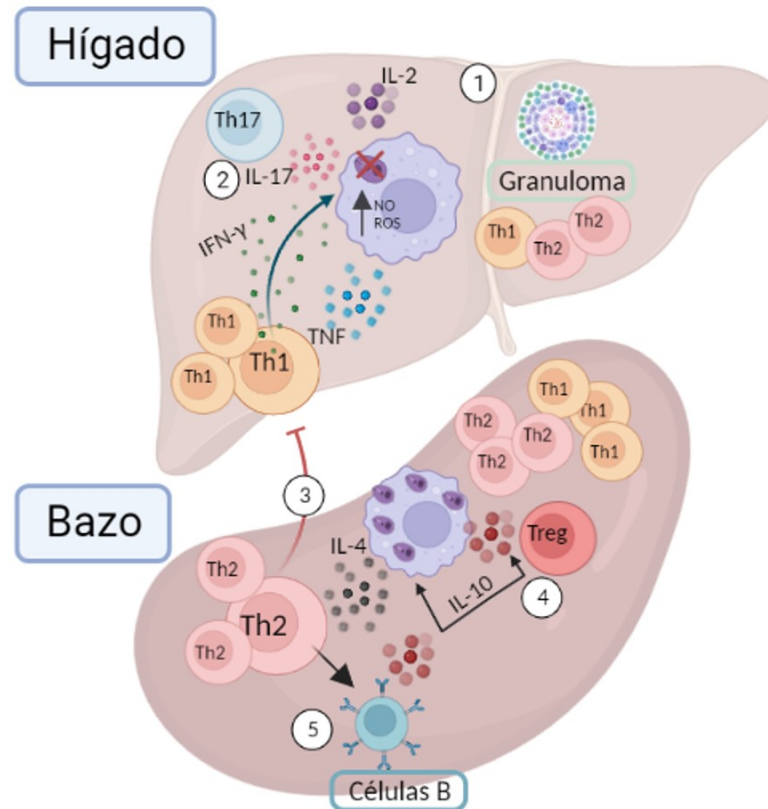
Tanto el hámster como el ratón han sido ampliamente utilizados como modelos de leishmaniasis visceral. El primero de ellos es empleado para estudios de evaluación de la patogenia de esta enfermedad, al ser más susceptible a la misma (Nieto *et al.* 2011). Por su parte, el modelo de ratón es el modelo experimental empleado para el estudio de la respuesta inmunitaria (Loeuillet *et al.* 2016). Este aspecto hace que el ratón haya sido el modelo experimental empleado para la realización de esta tesis doctoral.

La infección en el modelo ratón con especies viscerotrópicas de *Leishmania* establece una clara asociación entre resistencia con respuesta Th1 y susceptibilidad a la infección con respuesta Th2. Por un lado, las cepas de ratón resistentes, como C57BL/6, permiten estudiar el desarrollo de la leishmaniasis visceral en su fase aguda. Estos ratones son capaces de curar de forma espontánea en las primeras semanas de infección al redirigir la respuesta inmunitaria hacia el fenotipo Th1 con producción de IFN- $\gamma$  (Loeuillet *et al.* 2016). Por otro lado, las cepas susceptibles a la enfermedad, como BALB/c, no curan de forma espontánea y progresan hacia un estado crónico de la leishmaniasis visceral (Sacks and Melby 2015).

En la infección en el ratón se produce una respuesta inmunitaria órgano específica, en la que el hígado, bazo y médula ósea resultan principalmente afectados,

presentando un patrón de comportamiento claramente diferenciado entre ellos. En primer lugar, en el hígado se genera una rápida multiplicación de los amastigotes en las células de Kupffer, llegando al pico máximo de parasitemia entre la semana 2 y 4 post infección, constituyendo la fase aguda de la infección (Faleiro *et al.* 2014). Entre 6 y 8 semanas más tarde del inicio de la infección se produce una resistencia hepática a la misma en la que las citoquinas pro-inflamatorias están altamente implicadas (Manna *et al.* 2014). Estas citoquinas atraen al hígado a monocitos y neutrófilos responsables de la formación de agregados conocidos como granulomas, capaces de contener la propagación del parásito (Beattie *et al.* 2010). Es en estas mismas semanas en las que se establece la fase crónica de la enfermedad con persistencia del parásito en bazo y médula ósea debido a que la respuesta inmunitaria en estos órganos es insuficiente para controlar la infección. Esto es debido a que la inflamación generada por las citoquinas pro-inflamatorias, especialmente por el TNF, conlleva una desregulación en la estructura del bazo con aumento de la hematopoyesis y mielopoyesis. Esto desembocan en una esplenomegalia marcada, signo característico de la leishmaniasis visceral (Stanley *et al.* 2007; Rodrigues *et al.* 2016).

La hipergammaglobulinemia es otro signo clínico de la enfermedad. Por lo tanto, el análisis de las distintas subclases de anticuerpos IgG facilita la relación con los distintos perfiles de enfermedad (Perez-Cabezas *et al.* 2019). De tal forma que, la presencia del isotipo IgG1 aumenta durante la infección y se relaciona con la producción de IL-10 por los macrófagos, así como con la inhibición de IL-12, lo que lleva a una mayor persistencia de los amastigotes y al incremento de las respuestas celulares de tipo Th2. La protección frente al parásito está relacionada con la presencia de anticuerpos de tipo IgG2a en cepas de ratones BALB/c o IgG2c en ratones C57BL/6 (Martin *et al.* 1998; Rostamian *et al.* 2017).



**Figura 5. Esquema general de la respuesta inmunitaria órgano específica desarrollada durante la leishmaniasis visceral en el modelo ratón.** En el hígado, la fase aguda de la infección por *L. infantum* es controlada por una mayor presencia de linfocitos de tipo Th1 productores de las citocinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2. La secreción de estas citocinas conduce a la activación de los mecanismos leishmanicidas de los macrófagos, con generación de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) capaces de eliminar a los amastigotes (1). Esta respuesta Th1 es responsable de la formación de granulomas hepáticos importantes en la resistencia a la infección. Además, los linfocitos Th17 son productores de IL-17 (2), citocina que presenta funciones sinérgicas al IFN- $\gamma$ . Mientras tanto, en el bazo se produce una desregulación con predominio de los linfocitos Th2. Estos linfocitos secretan citocinas anti-inflamatorias, facilitando la persistencia del parásito al inhibir la respuesta de tipo Th1 (3). Las células T reguladoras también participan en esta respuesta Th2 (4). El aumento en la producción de anticuerpos por las células B (5) junto con la presencia de la citocina IL-10 conducen a la diseminación del parásito por el organismo. Dibujo de elaboración propia creado con BioRender.com.

La caracterización de las poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmunitaria es importante ya que ayuda a determinar el tipo de respuesta celular que se va a originar frente a la infección por *Leishmania*. El uso del ratón como modelo experimental permite identificar dichas poblaciones celulares en el bazo de los animales:

- Las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> capaces de producir múltiples citoquinas pro-inflamatorias simultáneamente (IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2) son indicativas de una respuesta efectora más eficaz en estos animales y, además, presentan una mayor capacidad de protección frente a la infección por *Leishmania* (Darrah *et al.* 2007).

- En el modelo ratón las células dendríticas se dividen en dos grandes grupos en función de los marcadores celulares que presenten: las células dendríticas convencionales (cDCs), caracterizadas por una elevada expresión de MHCII y CD11c y, las células dendríticas plasmacitoides (pDCs), con menor expresión de MHCII. Ambos subtipos celulares comparten capacidad de presentación antigénica pero se diferencian en diversos aspectos de señalización celular (Shortman *et al.* 2002). En primer lugar, las cDCs son las responsables de la activación de los linfocitos T y se dividen, a su vez, en cDCs CD8<sup>-</sup>, estimuladoras de la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, y cDCs CD8<sup>+</sup>, productoras de IFN- $\gamma$  e IL-12 (Moser and Murphy 2000). Por su parte, las pDCs se caracterizan por la producción de interferones de tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) (Feijo *et al.* 2016).

El uso del modelo ratón permite, además, establecer conclusiones del efecto de los tratamientos leishmanicidas (Murray 2001).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la ausencia de guías específicas para el manejo clínico de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente, que desarrollen una leishmaniasis visceral, genera una problemática real en la práctica clínica. Esta situación radica en la menor eficacia que presentan los tratamientos leishmanicidas en estos pacientes y en el mayor riesgo de recaídas que sufren al reintroducir el tratamiento inmunosupresor. Por todo ello, existe una necesidad real de determinar el efecto que estos tratamientos inmunosupresores tienen en el desarrollo de una leishmaniasis visceral, determinando el grado de afectación de la respuesta inmunitaria tras el uso de estas terapias inmunosupresoras. Además, es importante establecer la respuesta asociada a los tratamientos leishmanicidas, entre los que destacan los antimoniales pentavalentes como tratamiento tradicionalmente utilizado frente a esta enfermedad, en condiciones de inmunosupresión farmacológica. En este contexto, se han planteado una serie de objetivos a desarrollar durante esta tesis doctoral, que se describen a continuación.

# OBJETIVOS

The word 'OBJETIVOS' is centered on the page. Below it, there are several horizontal lines of varying lengths and colors (light blue and grey) that create a decorative underline effect.

El objetivo principal de esta tesis doctoral fue estudiar el efecto que los tratamientos inmunosupresores usados en la práctica clínica, como los antagonistas del TNF (anti-TNF) o el fármaco metotrexato (MTX), tienen en el desarrollo de la leishmaniasis visceral causada por *L. infantum*. Asimismo, se estudió cómo estos tratamientos inmunosupresores influyen en la cura de la enfermedad cuando se administran antimoniales pentavalentes como tratamiento antiparasitario.

Para ello se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la susceptibilidad *in vitro* de promastigote y amastigote de *L. infantum* a los inmunosupresores anti-TNF y MTX, evaluar el efecto leishmanicida asociado a la actividad de estos inmunosupresores y estudiar su capacidad para generar resistencias a los tratamientos antimoniales.
2. Evaluar en el modelo ratón de leishmaniasis aguda cómo la inmunosupresión farmacológica por estos compuestos afecta a la multiplicación y diseminación de *L. infantum* y a la respuesta inmunitaria específica frente al parásito, con el fin de identificar los mecanismos celulares que subyacen en la mayor susceptibilidad al desarrollo de la leishmaniasis visceral en los hospedadores inmunosuprimidos.
3. Estudiar en el modelo ratón de leishmaniasis crónica cómo dicha inmunosupresión farmacológica modifica la respuesta al tratamiento de la leishmaniasis visceral con antimonio de meglumina, determinando los componentes de la respuesta inmunitaria implicados en la menor eficacia de la terapia leishmanicida y el aumento del riesgo de recaídas.

# MATERIALES Y MÉTODOS

A decorative graphic consisting of several horizontal lines of varying lengths and colors (blue and grey) positioned below the title.

En este apartado se detallan los materiales y procedimientos que se emplearon para la realización de los distintos experimentos desarrollados a lo largo de esta tesis doctoral.

### I. Materiales biológicos.

En la ejecución de los experimentos realizados en este trabajo fueron empleados los materiales biológicos que se detallan a continuación.

#### I.1. Parásitos.

Para el desarrollo de los distintos procedimientos experimentales se emplearon las siguientes cepas:

- *L. infantum* cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263, empleada para la realización de los ensayos *in vitro*. Esta cepa fue cultivada en medio M199 (Gibco, EE. UU.) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS; Wisent, Canadá), 5 µg/ml de hemina (Millipore, EE. UU.) y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza, Suiza) a una temperatura de 26 °C en frascos de cultivo celular Falcon® (Corning, EE. UU.) de 25 cm<sup>2</sup>. Los ensayos *in vitro* que requirieron la forma promastigote del parásito se realizaron con la fase estacionaria de crecimiento de los mismos, la cual se alcanzó tras cinco días de cultivo.

- *L. infantum* JPC cepa MCAN/ES/98/LLM-724, procedente de la colección de cepas del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III. El cultivo de estos promastigotes se realizó empleando el medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute; Lonza, Suiza) con L-glutamina, suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (Sigma, EE. UU.), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Lonza, Suiza) y 10 µg/ml de hemina (Sigma, EE. UU.). Se utilizaron promastigotes en fase estacionaria de esta cepa para proceder a la infección de los animales de experimentación. Tras alcanzar la fase estacionaria, los parásitos fueron centrifugados a 1.360 g durante 5 min y lavados dos veces con tampón fosfato-salino (PBS; Gibco, EE. UU.).

#### I.2. Cultivos celulares.

La obtención de los macrófagos empleados en esta tesis doctoral se llevó a cabo a partir del aislamiento de la médula ósea procedente de los fémures y las tibias de ratones BALB/c de entre 8 y 16 semanas de edad. Para ello, se perfundió PBS a través

de la cavidad medular por medio de una aguja de 25 G. Para conseguir la diferenciación a macrófagos (BMDMs), las células de la suspensión resultante se cultivaron en medio DMEM (medio Eagle Modificado de Dulbecco; Wisent, Canadá) suplementado con 10 % FBS, 100 U/ml penicilina/estreptomicina y 20 % de L-CCM (medio condicionado de células L-929) en estufa a temperatura de 37 °C con una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio L-CCM se empleó como factor estimulador del crecimiento de los macrófagos y fue añadido nuevamente al cultivo celular 4 días más tarde. Finalmente, tras 6 días de cultivo, los BMDMs resultantes se recogieron levantando suavemente la monocapa adherente formada con PBS-citrato 15 mM.

### I.3. Animales de experimentación.

Para la realización de los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones hembra de las cepas C57BL/6 y BALB/c de entre 6 y 8 semanas de edad. Los animales fueron suministrados por Charles Rivers (Estados Unidos) y por Janvier Labs (Francia), respectivamente, y mantenidos en las instalaciones del animalario del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III. En cada ensayo los animales se dividieron en tres grupos con una n = 6 en cada grupo.

### I.4. Ética y Bienestar animal.

Los procedimientos que se describen a continuación sobre infección, tratamiento, toma de muestras y eutanasia fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III (CBA 04\_2018) y por la Comunidad de Madrid (PROEX 072/18).

## II. Métodos experimentales.

En primer lugar, se describen los procedimientos necesarios para la ejecución de los análisis *in vitro* en los que se determinó la susceptibilidad de *L. infantum* a los fármacos inmunosupresores anti-TNF o MTX.

En segundo lugar, se especifica la metodología aplicada para determinar la influencia de dichos tratamientos inmunosupresores en el desarrollo de la leishmaniasis visceral, y en el tratamiento con antimoniales pentavalentes en el modelo ratón.

### II.1. Ensayos de susceptibilidad farmacológica de promastigotes de *L. infantum* a anti-TNF, MTX o Sb<sup>III</sup>.

Estos análisis se realizaron para determinar la actividad leishmanicida que los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX, así como la forma trivalente del antimonio (Sb<sup>III</sup>), presentan sobre promastigotes de *L. infantum*. Para ello,  $1 \times 10^6$  parásitos/ml se cultivaron en paralelo en placas de 24 pocillos, en un volumen de 1,5 ml por pocillo, durante 72 h a una temperatura de 26 °C. Se añadieron concentraciones crecientes de anti-TNF (1 ng/ml a 10 µg/ml; Clon TN3-19.12; Invitrogen, EE. UU.), MTX (10 nM a 100 µM; Merk, Alemania) o Sb<sup>III</sup> (20 µM a 200 µM; Merk, Alemania). Para este ensayo, se estableció el rango óptimo de concentraciones a utilizar mediante la realización de diluciones seriadas 1/10 para el anti-TNF y MTX y 1/2 para el caso del Sb<sup>III</sup>, a partir de la primera concentración indicada. Cada una de las condiciones se realizó por triplicado y, además, se añadió un control positivo consistente en promastigotes cultivados en medio M199 suplementado sin tratamiento farmacológico, así como un control negativo correspondiente al medio M199 suplementado en ausencia de parásitos. Finalmente, terminada la incubación, se midió la absorbancia de cada uno de los pocillos a 600 nm, empleando para ello el modo espectrofotómetro del lector de placas multimodal Cytation 5 (BioTek, EE. UU.).

La susceptibilidad de los promastigotes de *L. infantum* a cada uno de los tratamientos estudiados se determinó a través del cálculo del valor de EC<sub>50</sub> o concentración efectiva máxima a la cual un fármaco es capaz de producir un 50 % de su efecto. Para ello se realizaron curvas de dosis-respuesta a través de una regresión no lineal mediante el software GraphPad Prism v9 (EE. UU.).

### II.2. Determinación de la viabilidad celular a anti-TNF, MTX o Sb<sup>V</sup> en macrófagos derivados de médula ósea.

El estudio de la viabilidad celular se efectuó para establecer el rango de concentraciones óptimas de los tratamientos anti-TNF, MTX y antimonio pentavalente (Sb<sup>V</sup>) a emplear en el análisis de la susceptibilidad farmacológica de estos compuestos en la forma amastigote de *L. infantum*. Este ensayo de viabilidad celular se realizó mediante una prueba colorimétrica con el reactivo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromuro; Merk, Alemania) empleado para la medición de la actividad

metabólica de las células, tal y como describen Riss y colaboradores (Riss *et al.* 2004). De forma resumida, el reactivo MTT es reducido a cristales de formazán por las células viables. La cantidad de estos cristales, medida en unidades de absorbancia, es, por lo tanto, directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo.

Para ello, 100  $\mu$ l de una concentración de  $2,5 \times 10^6$  BMDMs/ml fueron cultivados en placas de 96 pocillos durante 5 días a una temperatura de 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Además, se añadieron 100  $\mu$ l de un rango de concentraciones crecientes de anti-TNF (1 ng/ml a 30  $\mu$ g/ml), MTX (10 nM a 100  $\mu$ M) o Sb<sup>V</sup> (25 a 300  $\mu$ g/ml) obtenidas mediante la realización de diluciones seriadas. Cada condición se realizó por triplicado junto con pocillos que contenían solamente BMDM (control positivo de viabilidad) o medio DMEM (control negativo). Una vez finalizada la incubación, se añadieron 10  $\mu$ l del reactivo MTT a una concentración de 10 mg/ml y se procedió a una incubación de 4 h a una temperatura de 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. A continuación, para disolver los cristales de formazán, las células se resuspendieron con 100  $\mu$ l de tampón de lisis (50 % etanol absoluto, 10 % SDS en PBS) y se volvieron a incubar durante 30 min. Finalmente, 150  $\mu$ l de la suspensión celular fueron transferidos a una nueva placa de 96 pocillos para proceder a la lectura de la absorbancia a 600 nm en el lector Cytation 5. Los resultados de viabilidad celular se calcularon como un porcentaje relativo a la absorbancia detectada en el pocillo control con células sin tratamiento farmacológico (100 %) (Anexo I). Se establecieron como citotóxicas aquellas concentraciones que redujesen el número de macrófagos viables en más de un 65 %.

### II.3. Análisis del efecto de los compuestos anti-TNF, MTX y Sb<sup>V</sup> en amastigotes de *L. infantum*.

Para la caracterización de la acción leishmanicida tanto de los inmunosupresores anti-TNF y MTX como de la forma pentavalente del antimonio (Sb<sup>V</sup>) en amastigotes de *L. infantum*, se sembraron 100  $\mu$ l de una concentración de  $2,5 \times 10^6$  BMDMs en medio DMEM suplementado, en placas de 12 pocillos (IBIDI, Alemania). Estas células fueron cultivadas durante 3 h a una temperatura de 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, en una relación de 1:10 promastigotes de *L. infantum*. A continuación, se realizaron tres lavados con 200  $\mu$ l de medio Hepes-NaCl (21 mM Hepes, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6 mM glucosa, pH 7,4) para la eliminación de los promastigotes que no se hubieran

internalizado en los macrófagos, y las células infectadas se incubaron durante 24 h más con medio DMEM suplementado. Posteriormente, este medio fue reemplazado por concentraciones crecientes de anti-TNF (1 a 10 µg/ml), MTX (100 a 500 nM) o Sb<sup>v</sup> (15 a 100 µg/ml) en 200 µl de medio DMEM suplementado e incubados durante 5 días a una temperatura de 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Por último, al terminar la incubación, el medio fue retirado y se realizó una tinción celular eosinófila-basófila empleando el kit comercial Diff-Quik™ (RAL Diagnostic, Francia). Este proceso de tinción celular se llevó a cabo en tres pasos, según las indicaciones del fabricante: en primer lugar, las células se fijaron con metanol; a continuación, se tiñeron con la solución eosinófila seguido, finalmente, por una tinción basófila.

Para conocer la susceptibilidad farmacológica en amastigotes debe calcularse en primer lugar el índice parasitario para cada concentración, cuantificando el número medio de amastigotes en los macrófagos infectados y multiplicando este dato por el número de macrófagos infectados (en un total de 100 macrófagos examinados). Con estos índices, se calculó, mediante curvas de dosis-respuesta para cada tratamiento, el valor de IC<sub>50</sub> o concentración inhibitoria máxima con la cual un fármaco es capaz de impedir el 50 % de un proceso biológico.

#### **II.4. Medida de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras el cultivo con MTX o Sb<sup>III</sup>.**

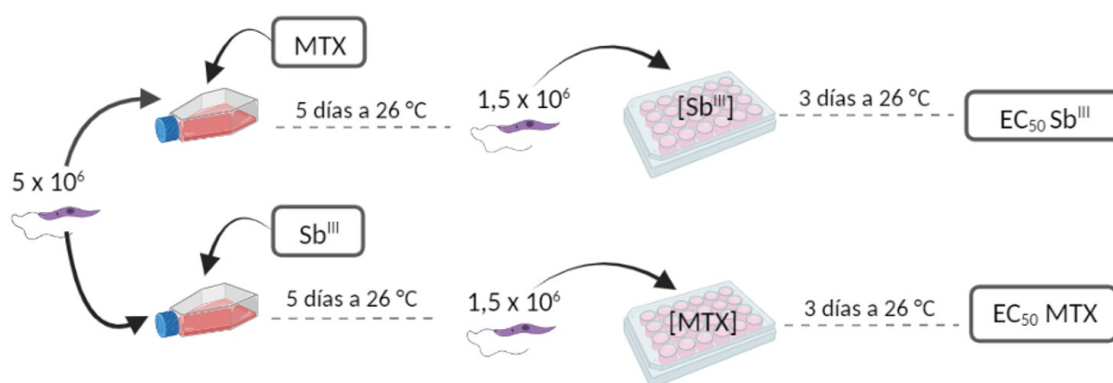
Con el objetivo de determinar si los tratamientos farmacológicos MTX y Sb<sup>III</sup> interferían en el daño oxidativo en promastigotes de *L. infantum*, se utilizó el valor de EC<sub>90</sub> o concentración máxima a la cual un fármaco es capaz de producir el 90 % de su efecto.

La acumulación intracelular de ROS se determinó empleando el reactivo DCF-DA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína; Invitrogen, EE. UU.). Este reactivo es capaz de penetrar en el interior del parásito por difusión y una vez dentro, es oxidado por los ROS generados como consecuencia del daño oxidativo del parásito. Esta oxidación lleva asociada una emisión de fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de ROS presentes en el interior del parásito.

Con este fin,  $5 \times 10^6$  promastigotes de *L. infantum* fueron cultivados en frascos de cultivo celular de  $25 \text{ cm}^2$  durante 72 h a una temperatura de  $26 \text{ }^\circ\text{C}$ , en 5 ml de medio M199 suplementado con presencia o ausencia de la concentración del  $\text{EC}_{90}$  de MTX o del  $\text{Sb}^{\text{III}}$ . Tras la incubación, los parásitos se lavaron dos veces con  $500 \text{ }\mu\text{l}$  de Hepes-NaCl por medio de centrifugaciones a  $1.300 \text{ g}$  durante 5 min. Tras estos lavados los parásitos fueron resuspendidos en  $500 \text{ }\mu\text{l}$  de Hepes-NaCl con  $25 \text{ }\mu\text{g/ml}$  de DCF-DA e incubados durante 30 min en oscuridad, a temperatura ambiente. A continuación, los parásitos se volvieron a lavar dos veces con Hepes-NaCl y, seguidamente, se resuspendieron en  $500 \text{ }\mu\text{l}$  de Hepes-NaCl. Finalmente, se traspasaron  $200 \text{ }\mu\text{l}$  de cada condición a una placa de 96 pocillos de fondo negro (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) y se procedió a la lectura de fluorescencia ( $485 \text{ nm}$  de excitación y  $535 \text{ nm}$  de emisión) en el modo espectrofotómetro del lector de placas multimodal Cytation5. Las unidades relativas de fluorescencia (URF) obtenidas se relacionaron con el número total de parásitos viables presentes en el cultivo.

#### II.5. Análisis de la susceptibilidad farmacológica cruzada entre metotrexato y antimonio en promastigotes de *L. infantum*.

Con el fin de determinar la interacción entre la inmunosupresión producida por el inmunosupresor MTX y la acción del tratamiento con antimoniales, se realizaron ensayos de susceptibilidad combinada entre ambos fármacos en promastigotes de *L. infantum*, tal y como se muestra en la figura 6.



**Figura 6. Esquema del ensayo susceptibilidad cruzada entre MTX y  $\text{Sb}^{\text{III}}$ .** Después de 5 días de preexposición de promastigotes de *L. infantum* con MTX o  $\text{Sb}^{\text{III}}$ , los parásitos se sometieron a una prueba de susceptibilidad ( $\text{EC}_{50}$ ) al  $\text{Sb}^{\text{III}}$  y MTX, respectivamente. Dibujo de elaboración propia creado con BioRender.com.

Por un lado,  $5 \times 10^6$  promastigotes de *L. infantum* se cultivaron en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> durante 5 días a una temperatura de 26 °C, con la concentración correspondiente al EC<sub>50</sub> o EC<sub>90</sub> del MTX en 5 ml de medio M199 suplementado. Tras esta preexposición de los promastigotes al fármaco MTX, los parásitos fueron sometidos a una prueba de susceptibilidad al Sb<sup>III</sup>. Para ello, se traspasaron  $1,5 \times 10^6$  parásitos a una placa de cultivo de 24 pocillos ( $1 \times 10^6$  parásitos/ml) con medio M199 suplementado y, posteriormente, se incubaron durante 72 h a una temperatura de 26 °C, en presencia de concentraciones crecientes de Sb<sup>III</sup>. Finalmente, se determinó, tal y como se ha descrito previamente, el valor de EC<sub>50</sub> al Sb<sup>III</sup> de estos promastigotes pre-expuestos al MTX.

Por otro lado, y de igual modo que lo descrito para el MTX,  $5 \times 10^6$  promastigotes de *L. infantum* fueron preexpuestos a la concentración del EC<sub>50</sub> o EC<sub>90</sub> del Sb<sup>III</sup> en medio M199 suplementado durante 5 días a una temperatura de 26 °C. Terminada esta incubación,  $1,5 \times 10^6$  parásitos se traspasaron a una placa de 24 pocillos ( $1 \times 10^6$  parásitos/ml) para realizar una prueba de susceptibilidad al fármaco MTX. Tras la incubación de 72 h a una temperatura de 26 °C se calculó el índice EC<sub>50</sub> del MTX en estos parásitos pre-expuestos al Sb<sup>III</sup>.

En ambos casos, los resultados de EC<sub>50</sub> se compararon con los EC<sub>50</sub> de promastigotes de *L. infantum* sin exposición previa a ninguno de los fármacos.

### **II.6. Inmunosupresión de los animales de experimentación.**

Los tratamientos inmunosupresores fueron administrados a los animales por vía intraperitoneal (i.p.), en un volumen de 0,1 ml, de forma continuada durante la duración de todo el experimento. Las distintas dosis de los tratamientos inmunosupresores empleadas en este trabajo corresponden a las dosis empleadas en la práctica clínica, adaptadas al peso de los animales. Estas dosis ya han sido previamente utilizadas con éxito en ensayos experimentales en el modelo ratón para el estudio de otras infecciones intracelulares o patologías (Bigbee *et al.* 2007; Iqbal *et al.* 2001).

Los animales se dividieron en tres grupos en función del tratamiento inmunosupresor que les fue administrado:

- Anticuerpo monoclonal antagonista del TNF (anti-TNF, clon TN3-19.12; Leinco Technologies, EE. UU.). Los ratones recibieron este tratamiento dos veces por semana a la dosis de 20 mg/kg.
- Metotrexato (MTX; Merk, Alemania). Administrado tres veces por semana a la dosis de 3,5 mg/kg.
- Se estableció un grupo control al que se le administró tampón fosfato salino (PBS; Gibco, EE. UU.) tres veces por semana.

### II.7. Infección de los animales inmunosuprimidos.

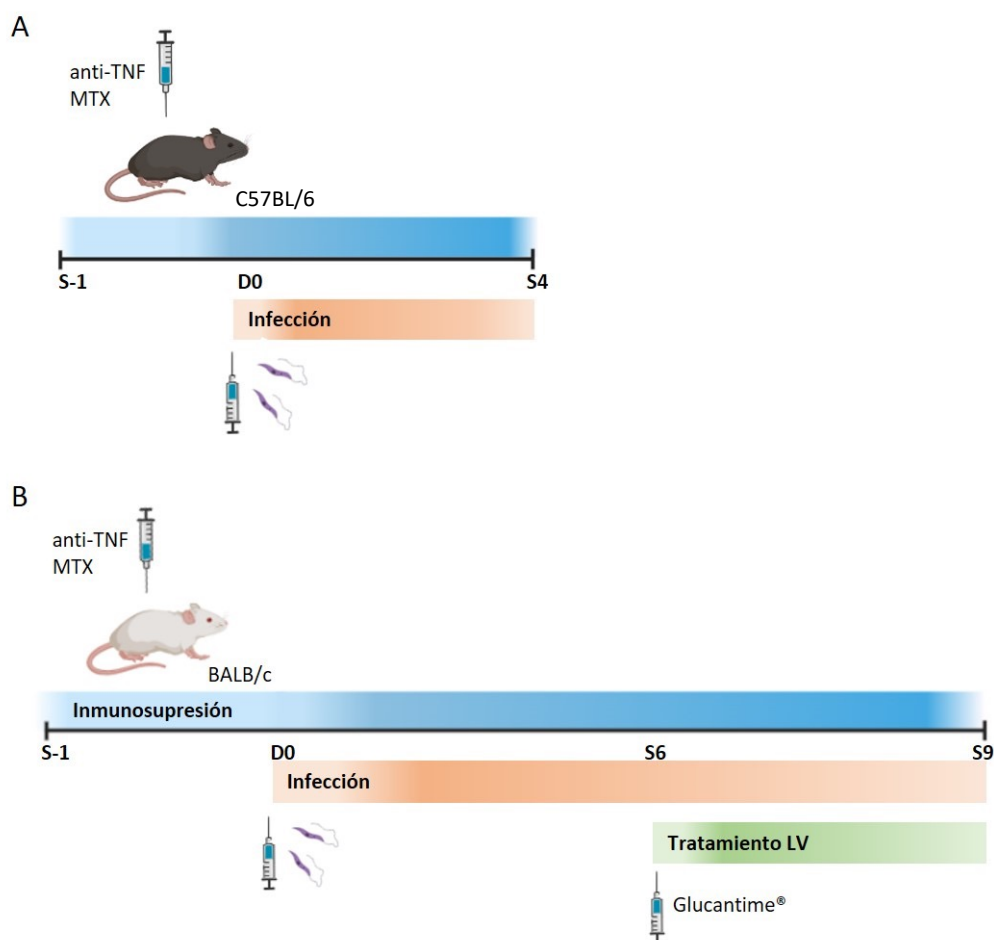
Los ratones fueron infectados por vía intravenosa (i.v.), a través de la vena lateral de la cola, con  $1 \times 10^7$  promastigotes en un volumen de 200  $\mu$ l de PBS. En los ensayos realizados, la infección de los animales (día cero; D0) se llevó a cabo una semana después de haber iniciado las pautas de inmunosupresión (S -1). Esta infección se mantuvo a lo largo de cuatro semanas (S4) en el caso del estudio realizado durante la fase aguda de la infección o durante nueve semanas (S9) en los experimentos que incluyen el tratamiento antiparasitario, tal y como se detalla en la figura 7.

Al finalizar los experimentos, se realizó la eutanasia de los animales en la cámara de CO<sub>2</sub> para proceder a la extracción de las muestras biológicas hígado, bazo y médula ósea, como se detalla más adelante.

### II.8. Tratamiento frente a la infección por *Leishmania*.

En el estudio de la eficacia del tratamiento antiparasitario bajo condiciones de inmunosupresión farmacológica, los análisis experimentales se realizaron antes (S6) y después del tratamiento (S9).

Seis semanas después (S6) de la infección con promastigotes de *L. infantum*, los ratones inmunosuprimidos farmacológicamente fueron tratados con antimonio de meglumina comercial (MA, Glucantime®; Sanofi, Francia). El tratamiento antiparasitario se administró en un volumen de 0,1 ml por vía i.p. La dosis empleada fue de 20mg/kg/día durante 21 días, dosis clínica recomendada por la OMS (Gradoni *et al.* 2017).



**Figura 7. Esquema del diseño experimental de los ensayos realizados en el modelo ratón.** Ratones hembra de las cepas C57BL/6 (A) o BALB/c (B) fueron inmunosuprimidos (S-1) con anti-TNF o MTX y, una semana más tarde (D0), infectados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *L. infantum*. En (A) se detalla el experimento realizado durante la fase aguda de la infección, en el que dicha infección se mantuvo durante 4 semanas (S4). En (B), seis semanas post-infección (S6), los ratones fueron tratados frente a la LV con antimoniato de meglumina (Glucantime®) durante 21 días. La eutanasia de los animales se llevó a cabo en S4, S6 y S9 para proceder a la obtención y procesamiento de las muestras biológicas. Dibujo de elaboración propia creado con BioRender.com.

## II.9. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas.

La obtención de las distintas muestras biológicas empleadas para la ejecución de los análisis llevados a cabo a lo largo de esta tesis doctoral se realizó de la siguiente manera:

- Obtención de sangre y suero. Semanalmente se realizó una punción de la vena submaxilar de los animales. Para la realización del marcaje de poblaciones circulantes en sangre, 50  $\mu$ l de sangre fueron recolectados en un tubo con el anticoagulante EDTA (Sarsted, Alemania). Para la obtención del suero, 150  $\mu$ l de sangre se recolectaron en

otro tubo y se incubaron a una temperatura de 37 °C durante media hora para promover la coagulación. Tras una incubación durante toda la noche a temperatura de 4 °C, los tubos se centrifugaron 15 min a 17.000 g. Los sueros obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

- Obtención del hígado y bazo. Tras la disección de los animales, el hígado y el bazo se homogeneizaron mediante disrupción a través de una membrana de nylon de 40 µM (Cell Strainer; Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). La suspensión celular fue lavada con medio RPMI, centrifugada durante 5 min a 800 g y resuspendida en un tampón hipotónico para la lisis de los eritrocitos (tampón ACK 1X; 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub> and 0.1 mM EDTA at pH 7.2) durante 5 min a una temperatura de 37 °C. A continuación, las células se lavaron una vez más con medio RPMI. En el caso del hígado, el sedimento resultante se resuspendió en 4 ml de medio RPMI suplementado. Para la suspensión del sedimento obtenido del bazo, se emplearon 2 ml del RPMI suplementado además con aminoácidos no esenciales (0,44 mM L-alanina, 0,4 mM L-asparagina, 0,343 mM L-glutamato), 50 µg/ml de gentamicina y 10 µM de β-mercaptoetanol.

- Obtención de la médula ósea. Tras la eliminación del tejido muscular, se cortaron las epífisis de los fémures para proceder a perfundir PBS a través de la cavidad medular por medio de una aguja de 25 G. La suspensión celular resultante se lavó con PBS, se centrifugó 5 min a 800 g y se resuspendió en 1 ml de medio RPMI suplementado.

Se emplearon 200 µl de la suspensión celular de cada órgano para la realización de la extracción de ADN y posterior cuantificación de la carga parasitaria por qPCR. En el caso del bazo, el resto del volumen fue utilizado para la estimulación de los esplenocitos para, seguidamente, realizar una tinción con anticuerpos específicos.

#### **II.10. Preparación del antígeno soluble de *Leishmania* (SLA).**

El antígeno SLA se obtuvo a partir de un cultivo de promastigotes de *L. infantum* de la cepa JPC en fase estacionaria (Fernandez *et al.* 2021). Este cultivo se centrifugó a 1.000 g durante 15 min y a una temperatura de 4 °C. Tras realizar dos lavados con PBS, el sedimento se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl 5 mM EDTA a pH 7) por cada 1 x 10<sup>9</sup> parásitos. A continuación, los parásitos fueron sometidos a tres ciclos de congelación/descongelación seguidos de tres ciclos de 20 s de sonicación a 40 W (Homogeneizador Ultrasónico 4710; Cole Palmer, EE. UU.). El lisado resultante se

ultracentrifugó a 27.000 g durante 20 min y a una temperatura de 4 °C en ultracentrífuga (Beckman L8-80M; Beckman, EE. UU.). Seguidamente, el sobrenadante se ultracentrifugó durante 4 h a 100.000 g para asegurar la eliminación de los antígenos de membrana. Al finalizar este proceso, el sobrenadante con las proteínas solubles fue recogido y se determinó su concentración en proteínas a través del kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. El antígeno SLA se almacenó en alícuotas a -80 °C hasta su utilización.

### **II.11. Extracción del ADN de las muestras biológicas.**

El ADN de las muestras biológicas hígado, bazo y médula ósea fue aislado empleando el método de fenol-cloroformo en las proporciones 25:24:1 (Sambrook and Russell 2001). Para ello se utilizaron 200 µl de la suspensión celular de cada una de las muestras biológicas. En primer lugar, se añadieron a dicha suspensión celular 400 µl de tampón NET10 (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl a pH 8), 40 µl de SDS al 10 % y 2 µl de proteinasa K (Sigma, EE. UU.) a una concentración de 20 mg/ml, con la finalidad de digerir las proteínas de la muestra. Las muestras se incubaron en agitación y a una temperatura de 56 °C durante toda la noche. Posteriormente, se añadieron 500 µl de fenol-cloroformo y las muestras se centrifugaron durante 6 minutos a 2.600 g. La fase acuosa resultante se recuperó en un nuevo tubo y se añadieron 500 µl de alcohol cloroformo isoamílico para volver a centrifugarlas a 2.600 g durante 6 minutos. Nuevamente, se recogió la fase acuosa que se incorporó a un tubo con 700 µl de etanol absoluto y 30 µl de acetato 3 M, para precipitar el ADN. Este tubo se mezcló por inversión diez veces y se incubó durante 20 minutos a - 80 °C. Pasado este tiempo, se realizó otra centrifugación a 2.600 g durante 6 minutos y el sedimento se resuspendió en 1 ml de etanol al 70 %. Finalmente, se realizó una última centrifugación a 2.600 g durante 6 minutos y los tubos se dejaron secar al aire durante 24 h para, por último, resuspender el ADN total en 100 µl de H<sub>2</sub>O. La concentración de ADN de cada muestra (µg de ADN/µl) se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

### **II.12. Cuantificación de la carga parasitaria mediante qPCR.**

El ADN extraído del hígado, bazo y médula ósea se empleó para determinar las cargas parasitarias en dichos órganos mediante una PCR cuantitativa (qPCR). Para ello,

se utilizaron los oligonucleótidos R223 (1000 nM) y R333 (500 nM) frente a la subunidad ribosomal 18S de *Leishmania* (Cruz *et al.* 2002). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l utilizando el kit comercial LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostic, España) y el termociclador LightCycler 2.0 (Roche Diagnostic, España). Las condiciones de los 40 ciclos de amplificación de la reacción de qPCR fueron una desnaturalización durante 10 segundos a 95 °C, un anillamiento de 5 segundos a 70 °C y una extensión a 75 °C durante 5 segundos (Cunha *et al.* 2013). Al finalizar la reacción se obtuvieron los valores del umbral de ciclo (CT, Cycle Thershold) específicos de cada muestra, así como la temperatura fusión del ADN o melting (Tm) a la que se produjo dicha amplificación. Mediante el análisis de la Tm se estableció que la temperatura específica de amplificación del ADN de *Leishmania* corresponde a 86-88 °C.

La concentración de cada muestra fue calculada a partir de la extrapolación de su valor de CT a una curva estándar correspondiente a las concentraciones de  $10^6$  parásitos/ $\mu$ l hasta  $10^{-2}$  parásitos/ $\mu$ l (Cunha *et al.* 2013). Para analizar los resultados, la concentración obtenida de parásitos/ $\mu$ l se dividió entre la concentración de ADN medida en el espectrofotómetro NanoDrop para obtener el número de parásitos/ $\mu$ g de ADN. El número de parásitos totales para cada órgano se determinó multiplicando este valor por el número de  $\mu$ g totales de cada muestra.

### II.13. Determinación del título de anticuerpos frente a *Leishmania*.

El suero recolectado semanalmente de cada uno de los animales fue empleado para la determinación mediante ELISA de los anticuerpos específicos frente a *L. infantum*. Se sensibilizaron placas de 96 pocillos Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) con 100  $\mu$ l de una concentración de 2  $\mu$ g/ml del SLA de *L. infantum* en PBS y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. A continuación, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado consistente en PBS al 0,5 % Tween20 (Merk, Alemania) y se bloquearon durante una hora a 37 °C con una solución de bloqueo compuesta por 3 % de albúmina de suero bovino (BSA; Merk, Alemania) en PBS-Tween20. Finalizado este proceso y después de otros tres lavados con dicho tampón, se añadieron los sueros a una dilución 1:200 en solución de bloqueo, realizándose diluciones seriadas 1/2 hasta alcanzar la dilución 1:25.600. Seguidamente, se realizó una incubación de 1 h a una temperatura de 37 °C. Después los pocillos se lavaron tres veces más con tampón de

lavado y, se añadieron los distintos anticuerpos secundarios (Nordic, Países Bajos) conjugados con peroxidasa (HRP) y diluidos en solución de bloqueo: anti-IgG (1:4000), anti-IgG1 (1:2000), anti-IgG2a (1:4000) o anti-IgG2c (1:4000). Tras una incubación de media hora a 37 °C, se realizaron tres lavados de los pocillos con tampón de lavado. Finalmente, para el revelado de la placa se añadió el sustrato de la peroxidasa, orto-fenilendiamina (OPD; Merk, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción colorimétrica se detuvo tras añadir a cada pocillo una solución 2 N de HCl. La absorbancia se midió a 490 nm en el espectrofotómetro MultiskanFC (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

Para calcular el título de cada uno de los anticuerpos se tomó como medida el valor inverso de la última dilución seriada en la que se observó una reactividad mayor que la del control negativo, correspondiente a 0,15 unidades de absorbancia.

#### II.14. Determinación de las poblaciones celulares circulantes en sangre.

Para conocer el número de linfocitos circulantes en sangre/mm<sup>3</sup> se emplearon 50 µl de la sangre extraída de forma semanal, los cuales fueron incubados con los anticuerpos específicos frente a ratón que se detallan en la tabla 1. Para el marcaje de los linfocitos T se emplearon los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 o anti-CD8 para la determinación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, respectivamente. El anticuerpo anti-CD19 se utilizó para definir la población de células B.

**Tabla 1. Anticuerpos monoclonales utilizados para realizar la tinción de los linfocitos circulantes en sangre.**

ANTICUERPO	CLON	CASA COMERCIAL
CD3-APC	17A2	Biolegend
CD4-PECy5	GK1.5	Biolegend
CD8-PE	53-6.7	Biolegend
CD19-FITC	MB19-1	Biolegend

Tras añadir los anticuerpos correspondientes, las muestras se incubaron durante media hora a una temperatura de 4 °C en oscuridad. A continuación, se procedió a la lisis de los eritrocitos, a través de una incubación de 20 minutos a temperatura

ambiente, con el tampón ACK. Después de una centrifugación a 800 g durante 6 min, el sedimento se lavó con una solución consistente en albúmina de suero bovino al 2 % en PBS. Finalmente, se procedió a la fijación de las células con tampón PBS-formaldehído al 2 %.

El análisis de la muestra teñida se realizó en el citómetro BD Accuri C6 Plus (Beckton Dickinson Biosciences, EE. UU.) y los resultados se obtuvieron tras el procesamiento de los datos en el software FlowJo versión 10 (EE. UU.). El número total de cada una de las poblaciones de células T/mm<sup>3</sup> se obtuvo al multiplicar los valores de frecuencia obtenidos en el citómetro, por el número de linfocitos resultante en el hemograma realizado previamente en el analizador veterinario Scill Vet ABC Plus (Horiba Medical, Japón).

#### II.15. Estimulación *in vitro* de los esplenocitos.

Los esplenocitos resultantes de la homogenización del bazo se utilizaron para analizar, mediante citometría de flujo, las distintas poblaciones celulares presentes en este órgano, así como la producción de citoquinas intracelulares por dichas poblaciones. Para ello, los esplenocitos se prepararon a una concentración de  $1 \times 10^7$  esplenocitos/ml y se realizaron tres tipos de estimulaciones. Una vez finalizada la estimulación de los esplenocitos se procedió a la recolección de los sobrenadantes. Para ello, las placas se centrifugaron a 800 g durante 2 min y los sobrenadantes obtenidos se guardaron a -80 °C hasta su utilización. Las estimulaciones realizadas fueron las siguientes:

- Estimulación con anti-CD3/anti-CD28. Para realizar esta estimulación, se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano y alta afinidad High Binding Costar® (Corning, EE. UU.) que fueron tapizadas con 100 µl del anticuerpo anti-CD3e (Clon 145-2C11) a una concentración de 10 µg/ml en tampón PBS durante 2 h a una temperatura de 37 °C. Pasado este tiempo las placas se incubaron a 4 °C durante 24 h. A continuación, los pocillos se lavaron dos veces con 200 µl de tampón PBS y se sembraron 100 µl de la suspensión celular ( $1 \times 10^6$  células) junto con 100 µl del coestimulador anti-CD28 (Clon 37.51) a una concentración de 2 µg/ml en medio RPMI suplementado. Finalmente, la placa se incubó a una temperatura de 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h. En las últimas 6-8 horas de estimulación se añadieron 10 µg/ml de Brefeldina A (Merk, Alemania) para detener la secreción de moléculas intracelulares al medio. Tras

esta incubación, el sobrenadante fue recogido para posteriormente detectar las citoquinas secretadas al medio, y en las células se procedió a realizar la tinción celular con anticuerpos específicos. Ambos anticuerpos utilizados para la estimulación fueron suministrados por eBioscience (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

- Estimulación específica con el SLA de *L. infantum*. En este caso,  $1 \times 10^6$  células fueron sembradas en placas de 96 pocillos de cultivo celular Nunclon (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) con 100  $\mu$ l de una concentración de 10  $\mu$ g/ml del SLA de *L. infantum* previamente preparado (apartado II.10.). Las placas se incubaron durante 6 h o 72 h en una estufa a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. En las últimas horas de cultivo se añadieron 10  $\mu$ g/ml de Brefeldina A para detener la secreción de citoquinas al medio. Al finalizar la incubación, los sobrenadantes fueron recogidos y en las células se realizó la tinción correspondiente con anticuerpos específicos.

- Como control negativo de estimulación,  $1 \times 10^6$  células se sembraron en placas de 96 pocillos de cultivo celular con 200  $\mu$ l de medio RPMI suplementado. Las placas se incubaron en estufa a una temperatura de 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 6, 24 o 72 h, correspondientes a los distintos tiempos de estimulación descritos. De igual modo, finalizadas las incubaciones, se recogieron los sobrenadantes y en las células se realizó la tinción con anticuerpos específicos.

### **II.16. Cuantificación de la concentración de citoquinas en los sobrenadantes del cultivo de los esplenocitos estimulados.**

La cuantificación de las citoquinas en los sobrenadantes se realizó empleando el kit comercial BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Beckton Dickinson Bioscience, EE. UU.), que permite la cuantificación de las siguientes citoquinas: IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-17A e IL-10. Este método se basa en la captura de las citoquinas solubles a través microesferas recubiertas de anticuerpos específicos para cada una de las citoquinas a analizar. Mediante el reactivo de detección conjugado con ficoeritrina (PE) se produce una señal de fluorescencia que será proporcionalmente dependiente a la cantidad de citoquina presente en el sobrenadante. Las distintas poblaciones de citoquinas están dispuestas de forma diferenciada en una matriz, en función de la intensidad de fluorescencia que presentan, lo que permite analizarlas simultáneamente en la misma muestra.

De forma resumida, se emplearon placas de 96 pocillos a las que se añadieron 50  $\mu$ l de cada una de las muestras, junto con 50  $\mu$ l por pocillo de la mezcla de las microesferas correspondientes a cada una de las citoquinas a analizar y 50  $\mu$ l del reactivo de detección conjugado con PE. Las muestras se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se centrifugaron a 400 g durante 8 min y el sedimento se lavó con la solución de lavado suministrada en el kit. Por último, el sedimento resultante se resuspendió en 150  $\mu$ l de la solución de lavado y las muestras se analizaron por citometría de flujo.

Además de las muestras, se preparó una curva estándar a partir de la reconstitución del reactivo liofilizado de la casa comercial. Se realizaron diluciones seriadas de este liofilizado partiendo de la concentración de 5.000 pg/ml hasta 20 pg/ml, junto con un control negativo (0 pg/ml).

La adquisición de las muestras se realizó a través del citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus (Beckton Dickinson Bioscience, EE. UU.) y el análisis de las mismas empleando el software FlowJo v10 (FlowJo LLC, EE. UU.). Los resultados se obtuvieron como valores correspondientes a la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) del fluoróforo reportero en cada población de citoquinas (300 eventos por cada citoquina). La transformación de los datos de MFI a valores de concentración para cada citoquina se realizó mediante su interpolación a la curva estándar.

#### **II.17. Tinciones para la determinación de las poblaciones celulares en los esplenocitos.**

Para el análisis de las distintas poblaciones celulares por citometría de flujo los esplenocitos previamente cultivados con o sin estimulación, fueron traspasados a placas de 96 pocillos de fondo V (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) para realizar la tinción celular correspondiente. Se efectuaron dos tipos de marcajes en las células, uno de superficie y, posteriormente, otro intracelular.

En primer lugar, se realizó un lavado a 800 g durante 2 min con 150  $\mu$ l de tampón FACS (1 % de suero bovino fetal en tampón PBS). Tras este lavado, las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de Mouse BD FcBlock (clon 2.4G2; Beckton Dickinson Bioscience, EE. UU.) diluido 1:100 en tampón FACS y se incubaron durante 5 min a 4 °C. La utilización de este compuesto permite reducir las uniones no específicas de los anticuerpos

facilitando, por lo tanto, la identificación de las distintas poblaciones celulares deseadas. A continuación, se añadieron 50  $\mu$ l de la mezcla de anticuerpos correspondientes a la tinción celular con anticuerpos de superficie diluidos todos ellos a 1:200 en tampón FACS (tabla 2). La dilución seleccionada de estos anticuerpos fue resultante de un proceso de optimización previo (no incluido). Las células se incubaron durante 20 min a una temperatura de 4 °C y en oscuridad. Una vez finalizada la incubación, en aquellas células en las que solamente se realiza el marcaje de superficie, se realizó un lavado de los pocillos con tampón FACS para proceder a la fijación de las células con una solución consistente en 2 % de formaldehído en tampón PBS. Esta fijación se realizó durante 15 min en oscuridad y a una temperatura de 4 °C. Finalmente, las células se lavaron una vez más con tampón FACS y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de dicho tampón. Con este marcaje de superficie se pudieron determinar las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8, las células reguladoras, el marcador de agotamiento celular PD1 y las distintas poblaciones de células dendríticas.

Por otro lado, para realizar la tinción intracelular de citoquinas y tras la incubación con los anticuerpos de superficie, las células se fijaron y permeabilizaron con 100  $\mu$ l de la solución Cytotfix/Cytoperm (Beckton Dickinson Bioscience, EE. UU.) durante 20 min a 4 °C en oscuridad. Después de esta incubación, se realizó un lavado con tampón PermWash (Beckton Dickinson, EE. UU.) y se añadieron 50  $\mu$ l de la mezcla del panel de anticuerpos intracelulares diluidos 1:100 en tampón PermWash (tabla 3). Esta tinción se incubó durante 30 min a una temperatura de 4 °C en oscuridad, para, a continuación, lavar la placa dos veces con PermWash y resuspender las células en 200  $\mu$ l de tampón FACS. Mediante la realización de este marcaje se determinaron las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 productores de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2, así como las poblaciones de células Tip-DCs productoras de iNOS.

Finalizada la tinción celular correspondiente, se procedió al análisis de las muestras mediante citometría de flujo a través del citómetro de flujo LSRFortessa X-20 (BD, EE. UU.). Los resultados fueron analizados empleando el software FlowJo v10 y utilizando la estrategia de análisis booleano para definir a las poblaciones de citoquinas marcadas con anticuerpos intracelulares. Esta estrategia se basa en la identificación simultánea de los linfocitos productores de una, dos o tres citoquinas al mismo tiempo.

**Tabla 2. Anticuerpos monoclonales utilizados para realizar la tinción celular de superficie para el análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo.**

<b>ANTICUERPO</b>	<b>CLON</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>POBLACIÓN</b>
CD3e PerCp-Cy5.5	145-2C11	BD	Linfocitos T
CD4 BUV395	GK1.5	BD	Linfocitos T CD4
CD8 PE-Cy7	53-6.7	Biolegend	Linfocitos T CD8
CD8 FITC	53-6.7	Biolegend	Linfocitos T CD8
CD44 APC/Fire 750	IM7	Biolegend	Linfocitos Treg
CD127 APC	SB/199	Biolegend	Linfocitos Treg
CD25 BB515	PC61	BD	Linfocitos Treg
CD19 BV510	ID3	BD	Células B
Ly6C BV785	HK1.14	Biolegend	Células dendríticas
Ly6G AlexaFluor 647	1A8	Biolegend	Células dendríticas
CD11c APCH7	N418	Biolegend	Células dendríticas
CD11b PECy7	M1/70	Biolegend	Células dendríticas
MHCII FITC	39-10-8	Biolegend	Células dendríticas
PD1 BV711	29F.1A12	Biolegend	

**Tabla 3. Anticuerpos monoclonales utilizados para realizar la tinción intracelular para el análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo.**

<b>ANTICUERPO</b>	<b>CLON</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
IFN- $\gamma$ PECy7	XMG1.2	Biolegend
IL-2 PE	JES6-5H4	Biolegend
TNF AlexaFluor 647	MP6-XT22	Biolegend
IL-10 BV421	JES5-16E3	Biolegend
iNOS PE	W16030C	Biolegend

## II.18. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados y representados mediante el software GraphPad Prism v9 (EE. UU.). En primer lugar, los datos fueron sometidos a una prueba Shapiro-Wilk para comprobar si seguían una distribución normal. Para la comparación

entre dos grupos, cuando los datos superaron esta prueba de normalidad, se aplicó un análisis estadístico paramétrico a través de la prueba t de Student de dos colas y, para las diferencias entre más de dos grupos, se aplicó un test ANOVA seguido del test *post-hoc* de Tukey. Si los datos no superaron la prueba de normalidad, se realizó un análisis no paramétrico mediante el test U de Mann-Whitney.

Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

# RESULTADOS

The word "RESULTADOS" is centered on the page. Below it, there are several horizontal lines of varying lengths and colors (light blue and grey) that create a decorative underline effect.

## I. Acción de los fármacos inmunosupresores anti-TNF y MTX sobre las formas promastigote y amastigote de *L. infantum*.

En este apartado se describen los resultados correspondientes al análisis *in vitro* del efecto de los compuestos inmunosupresores anti-TNF y MTX en las formas promastigote y amastigote de *L. infantum*. También se incluye la comparativa con los fármacos antimoniales, tratamiento habitual de la leishmaniasis visceral.

### I.1. Los promastigotes de *L. infantum* son susceptibles al efecto del MTX.

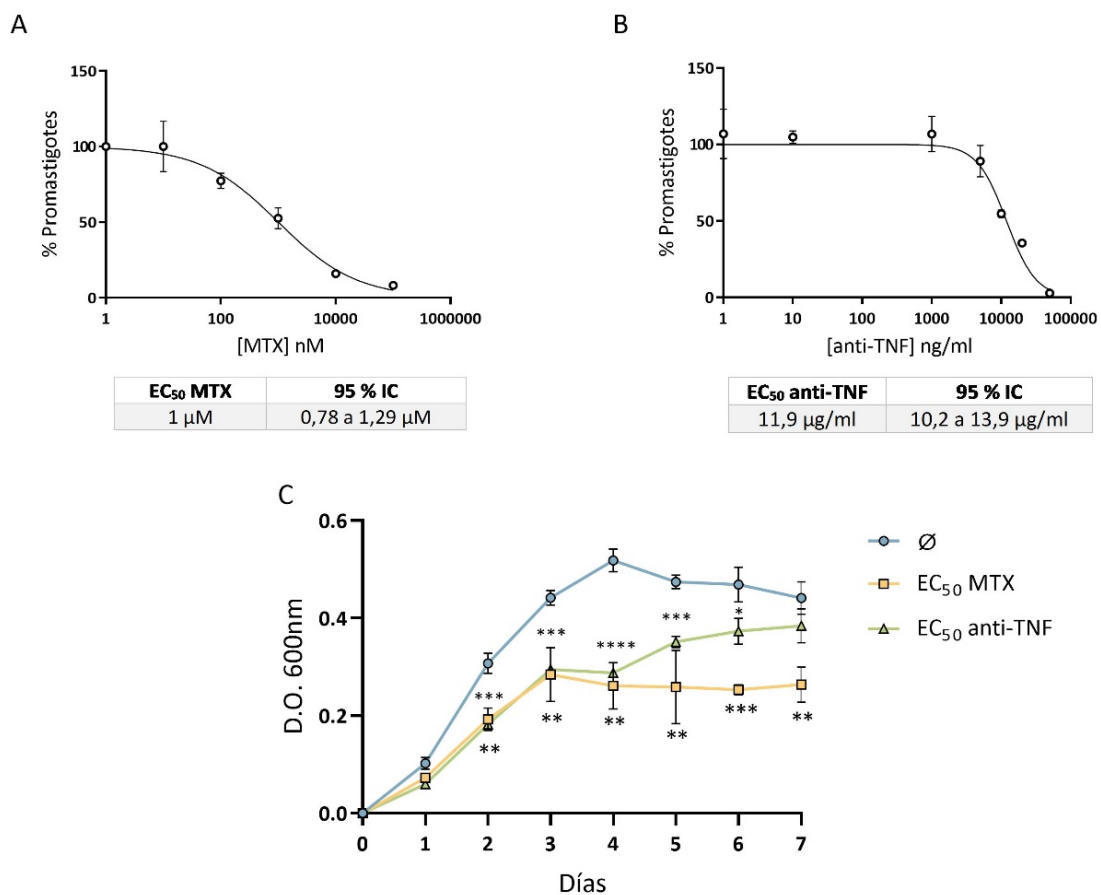
Con el objetivo de conocer la posible actividad leishmanicida de los compuestos inmunosupresores anti-TNF y MTX, se calculó el índice EC<sub>50</sub> para cada uno de ellos. Este índice permite caracterizar la potencia y actividad de un tratamiento farmacológico, y consiste en el cálculo de la concentración efectiva máxima a la que un fármaco es capaz de producir un 50 % de su efecto. Para ello, se cultivaron promastigotes de *L. infantum* en presencia de concentraciones crecientes de anti-TNF o MTX. El rango de concentraciones empleado del anticuerpo anti-TNF fue de 1 ng/ml a 10 µg/ml, mientras que, el rango de concentraciones establecido para el fármaco MTX fue de 10 nM a 100 µM (apartado II.1. de materiales y métodos).

Los resultados mostraron, por un lado, que el valor de EC<sub>50</sub> del MTX fue de 1 µM, con un intervalo de confianza (IC) del 95 % de entre 0,78 y 1,29 µM (figura 8 A). Por otro lado, se determinó que el EC<sub>50</sub> del inmunosupresor anti-TNF fue de 11,9 µg/ml, con un intervalo de confianza de 10,2 a 13,9 µg/ml (figura 8 B).

Una vez calculados estos índices asociados al potencial leishmanicida, se realizaron curvas de crecimiento de promastigotes de *L. infantum* en presencia y ausencia del EC<sub>50</sub> del MTX o del anti-TNF, con el objetivo de determinar si estos inmunosupresores interfieren en el crecimiento normal de los promastigotes. Para ello, se midieron los valores de densidad óptica (D.O.) a 600 nm para cada condición a lo largo de 7 días. Como se puede observar en la Figura 8 C, la adición del EC<sub>50</sub> del MTX al cultivo de promastigotes produjo una disminución significativa del crecimiento de los parásitos a lo largo de toda la curva de crecimiento. Esta disminución desemboca, al finalizar la curva de crecimiento en presencia de MTX, en una reducción significativa ( $p = 0,0034$ ) del 40 % en la D.O., con respecto al valor de D.O. en la curva de crecimiento realizada

en ausencia de presión farmacológica (curva  $\emptyset$  de la figura 8 C). Por otro lado, la presencia del EC<sub>50</sub> del anti-TNF en el cultivo de promastigotes también condujo a una ralentización significativa en la velocidad de crecimiento de *L. infantum*. No obstante, al finalizar la curva de crecimiento no se observó una reducción significativa ( $p = 0,10$ ) en la D.O. de estos promastigotes con respecto a los promastigotes que crecieron en ausencia de fármacos.

Los resultados obtenidos sugieren que el inmunosupresor MTX produce una clara afectación de la multiplicación de los promastigotes de *L. infantum*, mientras que el compuesto anti-TNF parece ralentizar el crecimiento de los promastigotes sin afectar al desarrollo de los parásitos.



**Figura 8. Caracterización de la acción del MTX y anti-TNF en promastigotes de *L. infantum*.** En (A) se muestra la curva de dosis-respuesta calculada para el rango de concentraciones del MTX, así como el valor de EC<sub>50</sub> para dicho inmunosupresor, tras el cultivo de promastigotes durante 72 h con concentraciones crecientes de dicho fármaco. En (B) se representa la curva de dosis-respuesta asociada al incremento de concentraciones del anti-TNF y el valor de EC<sub>50</sub> resultante, después del cultivo durante 72 h con concentraciones crecientes de este compuesto. En (C) se muestran las curvas de crecimiento tras siete días de cultivo de promastigotes en ausencia de fármaco ( $\emptyset$ , curva azul), en presencia del EC<sub>50</sub> del MTX (curva amarilla) o del anti-TNF (curva verde). Las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos inmunosupresores y el control sin fármaco se determinaron empleando la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ).

### **I.2. El índice parasitario en amastigotes de *L. infantum* se reduce como consecuencia de la acción del MTX, pero no del inmunosupresor anti-TNF.**

Para conocer el impacto que los inmunosupresores MTX y anti-TNF producen en la viabilidad de la forma amastigote del parásito, se calculó el índice IC<sub>50</sub> o concentración inhibitoria máxima de cada uno de los compuestos. Este índice se define como la concentración a la cual un fármaco es capaz de impedir el 50 % del desarrollo de un proceso biológico. A diferencia del EC<sub>50</sub>, que informa sobre la eficacia de un fármaco, el IC<sub>50</sub> indica inhibición biológica. Para ello, macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDMs) se infectaron con promastigotes de *L. infantum*. Tras la internalización de estos promastigotes en los BMDMs, el cultivo se expuso a concentraciones crecientes de anti-TNF o MTX en un rango de 1 a 10  $\mu\text{g/ml}$  o de 100 a 500 nM, respectivamente. Finalizada la incubación, los BMDMs se tiñeron con el reactivo Diff-Quick™ y se procedió al cálculo del índice parasitario o número de amastigotes por macrófago infectado en un total de 100 macrófagos examinados.

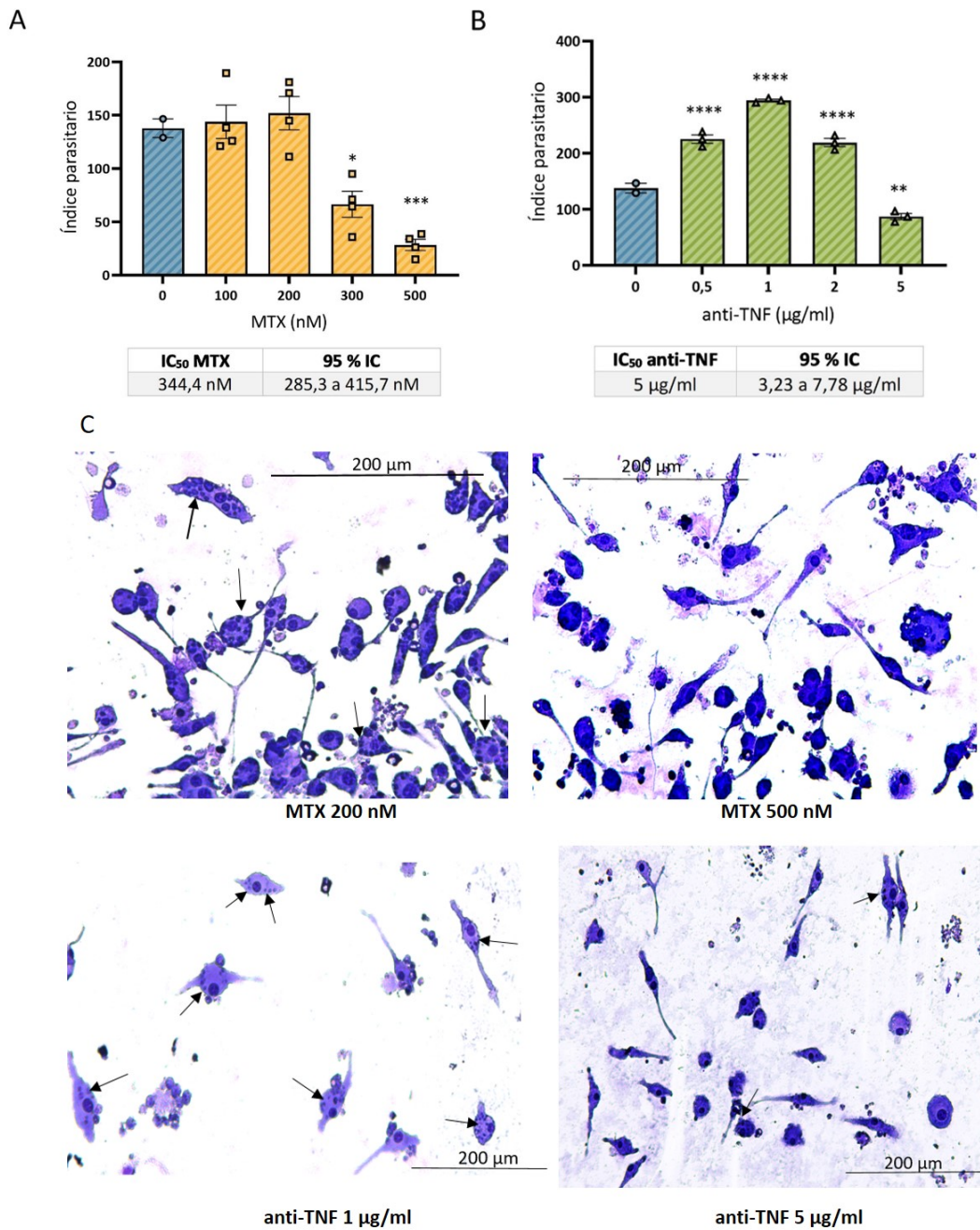
Los resultados mostraron que el fármaco MTX produjo una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) del índice parasitario con respecto al cultivo en ausencia de tratamiento (figura 9 A). Así, la concentración de 300 nM del compuesto redujo el índice parasitario en un 51 % ( $p = 0,017$ ), mientras que la concentración de 500 nM lo hizo en un 79 % ( $p = 0,0007$ ). El cálculo del índice parasitario de cada concentración de MTX se utilizó para determinar el IC<sub>50</sub> del compuesto, cuyo valor para el fármaco MTX fue de 344,4 nM, con un intervalo de confianza de 285,3 a 415,7 nM.

---

La presencia del inmunosupresor anti-TNF en el cultivo de macrófagos infectados condujo a un aumento del número de amastigotes por célula infectada (figura 9 B). Este incremento fue de hasta el 113 % ( $p < 0,0001$ ) cuando se empleó 1  $\mu\text{g/ml}$  de dicho compuesto. Probablemente, este resultado se debe al bloqueo de la citoquina TNF que, desempeña un papel crucial en la activación de los macrófagos y su función leishmanicida (Manna *et al.* 2014). No obstante, la concentración más elevada de anti-TNF (5  $\mu\text{g/ml}$ ) supuso una disminución del 36 % en el índice parasitario ( $p = 0,0017$ ). Este cambio se debe a la reducción observada en el número de macrófagos viables en el cultivo, posiblemente relacionada con un efecto perjudicial en las células del tratamiento anti-TNF a altas concentraciones. El valor de  $\text{IC}_{50}$  para el anti-TNF fue, por lo tanto, de 5  $\mu\text{g/ml}$ , con un intervalo de confianza de entre 3,23 y 7,78  $\mu\text{g/ml}$ .

Los resultados descritos en este apartado indican que, de forma similar a lo observado en la forma promastigote de *L. infantum*, el MTX a altas concentraciones produce una reducción del número de amastigotes en células infectadas. Sin embargo, el cultivo con anti-TNF favorece la multiplicación de estos amastigotes en el interior de los macrófagos.

Teniendo en cuenta que el inmunosupresor anti-TNF no presenta una inhibición directa sobre el parásito, sino que potencia su persistencia, se continuó a continuación, con el estudio de la acción leishmanicida del MTX.



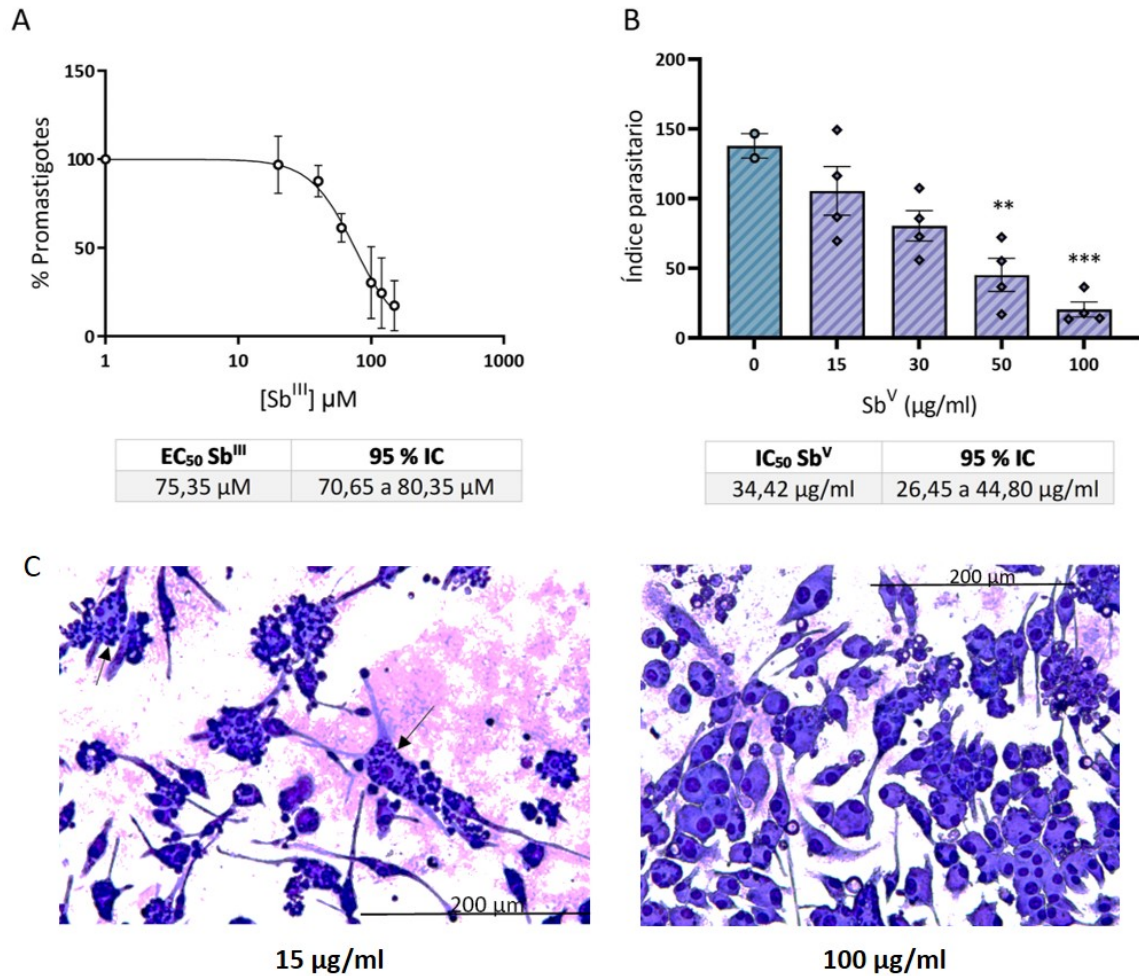
**Figura 9. Efecto de MTX y anti-TNF en amastigotes de *L. infantum*.**  $2,5 \times 10^5$  BMDMs fueron infectados con una ratio 1:10 BMDMs:promastigotes de *L. infantum* durante 3 horas y, posteriormente, cultivados durante 5 días con concentraciones crecientes de MTX (A) y anti-TNF (B). El índice parasitario se determinó para cada una de las concentraciones de fármaco empleadas y los resultados se muestran como la media de al menos dos replicados biológicos. Se calculó el valor de IC<sub>50</sub> para cada tratamiento, con respecto a las células infectadas en ausencia de fármaco. En (C) se muestran imágenes de la tinción celular realizada con el kit Diff-Quik™ en las que se observa el número de amastigotes intracelulares tras la adición del MTX o anti-TNF (flechas). Las diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de MTX o anti-TNF y la ausencia de fármaco se determinaron mediante ANOVA y el método post-hoc de Tukey. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) o \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

### I.3. Efecto leishmanicida de los antimoniales en *L. infantum*.

Para comparar la acción inhibitoria de los compuestos inmunosupresores con el efecto leishmanicida del tratamiento habitual de la enfermedad visceral, se determinaron los valores de EC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> de los antimoniales. Para ello, se empleó la misma cepa de *L. infantum* que en los ensayos anteriores. Es importante tener en cuenta que la toxicidad de los compuestos del antimonio varía a lo largo del ciclo biológico del parásito (Shaked-Mishan *et al.* 2001). La forma trivalente o reducida del antimonio (Sb<sup>III</sup>) es tóxica para los promastigotes, mientras que el antimonio pentavalente (Sb<sup>V</sup>) penetra en mayor medida en el interior de los macrófagos y actúa en la forma amastigote. Por este motivo, el cálculo de los índices EC<sub>50</sub> en promastigotes e IC<sub>50</sub> en amastigotes se realizó empleando la forma trivalente y pentavalente del antimonio, respectivamente.

Para calcular el índice EC<sub>50</sub>, promastigotes de *L. infantum* fueron expuestos durante 72 h a un rango de concentraciones crecientes (de 20 µM a 200 µM) de antimonio trivalente. La realización de curvas de dosis-respuesta determinó que el EC<sub>50</sub> para el Sb<sup>III</sup> en esta cepa de *L. infantum* fue de 75,35 µM, con un IC del 95 % de 70,65 a 80,35 µM (figura 10 A).

Por otro lado, para el cálculo del IC<sub>50</sub>, BMDMs se infectaron con *L. infantum* y se cultivaron durante 5 días con concentraciones crecientes de Sb<sup>V</sup> (de 25 a 300 µg/ml). Al finalizar la incubación, se identificó el número de amastigotes en el interior de los macrófagos mediante la tinción con el reactivo Diff-Quik™. Los resultados mostraron una reducción en el número de amastigotes por macrófago infectado debido al tratamiento (figura 10 B). Así, una concentración de Sb<sup>V</sup> de 50 µg/ml fue capaz de reducir el índice parasitario en un 67 % ( $p = 0,0044$ ) mientras que, el aumento de la concentración a 100 µg/ml fue capaz de disminuir la infección en un 85 % ( $p = 0,0006$ ). El IC<sub>50</sub> calculado para el antimonio pentavalente en esta cepa de *L. infantum* corresponde a la concentración de 34,42 µg/ml, con un intervalo de confianza de 26,45 a 44,80 µg/ml. Es importante mencionar que en la figura 10 C se puede apreciar como disminuyen de forma significativa el número de amastigotes al aumentar la concentración de antimonio pentavalente sin afectar al número de macrófagos viables.



**Figura 10. Determinación del efecto de los antimoniales sobre *L. infantum*.** (A) Cálculo del  $EC_{50}$  a través de la realización de curvas de dosis-respuesta después de 72 h de cultivo de promastigotes de *L. infantum* con concentraciones crecientes de antimonio trivalente. El resultado se muestra como la media de tres replicados biológicos. (B)  $2,5 \times 10^5$  BMDMs fueron infectados con una ratio 1:10 BMDMs:promastigotes de *L. infantum* durante 3 horas y, posteriormente, cultivados durante 5 días con concentraciones crecientes de antimonio pentavalente. El índice parasitario se calculó para cada una de las concentraciones empleadas y se representa como la media de al menos dos replicados biológicos. Se detalla el valor de  $IC_{50}$  calculado con respecto a los macrófagos infectados en ausencia de fármaco. En (C) se muestran dos imágenes de la tinción celular realizada con el kit Diff-Quik™. Se señala con flechas la presencia de amastigotes dentro de los macrófagos. Las diferencias estadísticas entre las distintas concentraciones y la ausencia de tratamiento se evaluaron a través de un test ANOVA y el método post-hoc de Tukey. \*\* ( $p < 0,01$ ) o \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

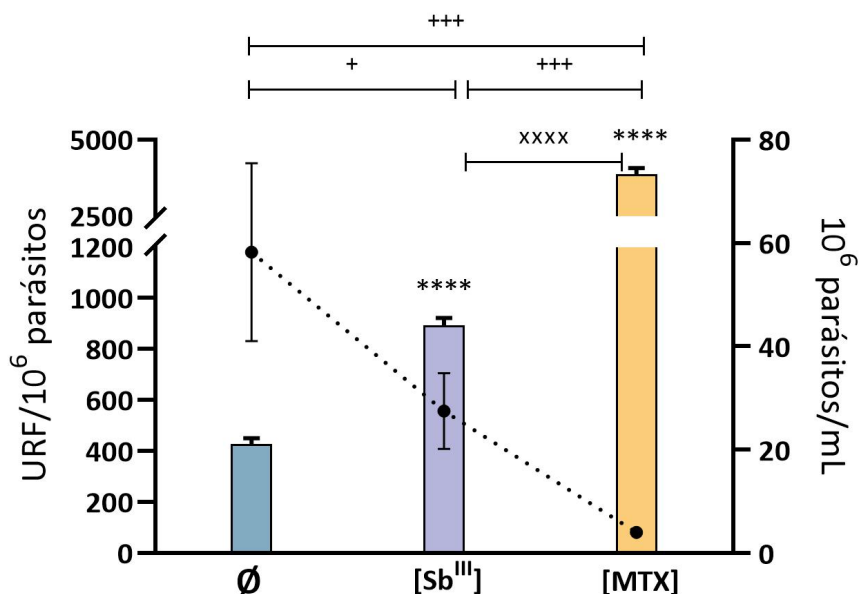
#### I.4. La exposición a MTX produce un estrés oxidativo en promastigotes de *L. infantum* mayor que el generado por el antimonio trivalente.

La presión farmacológica puede conducir a un incremento en el daño oxidativo del parásito, que conlleva situaciones de estrés con un aumento en la producción de ROS. Estas especies reactivas de oxígeno son responsables de conducir a *Leishmania* a un estado apoptótico. Para evaluar el efecto leishmanicida del MTX se determinó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en promastigotes expuestos a este fármaco y se comparó con el efecto que produce el Sb<sup>III</sup> en los mismos. Para apreciar de forma más clara las diferencias entre ambos compuestos, se utilizaron los valores de EC<sub>90</sub> (concentración máxima a la cual un fármaco es capaz de producir el 90 % de su efecto) calculados para cada fármaco. Esta EC<sub>90</sub> fue de 240,65 μM para el Sb<sup>III</sup> y de 78,98 μM para el MTX.

El uso del reactivo DCF-DA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína) permite cuantificar las ROS producidas por el parásito. Esto se debe a que este compuesto se oxida en el interior de los promastigotes por las ROS generadas, emitiendo una señal de fluorescencia. Esta fluorescencia, medida en unidades relativas de fluorescencia (URF), es proporcionalmente dependiente a la cantidad intracelular de ROS presentes en el parásito y, por tanto, al estado apoptótico de los promastigotes.

En la figura 11 se puede observar que la presencia de Sb<sup>III</sup>, duplicó la producción de ROS (892,36 URF/10<sup>6</sup> parásitos;  $p < 0,0001$ ) con respecto al control (427,66 URF/10<sup>6</sup> parásitos). Como consecuencia del daño oxidativo también se observó una reducción estadísticamente significativa del número de promastigotes ( $p = 0,016$ ) al finalizar las 72 h de incubación. De forma similar, la concentración de MTX que corresponde con el EC<sub>90</sub> incrementó 9 veces (3.868,3 URF/10<sup>6</sup> parásitos) la producción de ROS en relación con los promastigotes que fueron cultivados sin presión farmacológica ( $p < 0,0001$ ). Este aumento en la cantidad de ROS también se asoció con la mayor inhibición (93 %) del número de promastigotes con respecto al control ( $p = 0,0008$ ). Es interesante destacar que, aunque el antimonio es el tratamiento leishmanicida clásico, el incremento de ROS como consecuencia de la acción del MTX fue hasta cuatro veces mayor que el ocasionado por el antimonio trivalente ( $p < 0,0001$ ).

Los resultados indican que el inmunosupresor MTX presenta una acción leishmanicida sobre los promastigotes de *L. infantum* debido a un daño oxidativo en el parásito, superior al que produce el tratamiento con antimonio.



**Figura 11. Evaluación de la producción de ROS originada por el antimonio trivalente y el metotrexato.** Mediante el gráfico de barras se representa la cantidad media de ROS producida por promastigotes de *L. infantum* en ausencia de tratamiento (Ø), en presencia del EC<sub>90</sub> del Sb<sup>III</sup> o del EC<sub>90</sub> del MTX, medida en URF por cada 10<sup>6</sup> parásitos (eje Y izquierdo). La línea de puntos corresponde al número de parásitos por ml (eje Y derecho) calculado para cada condición al finalizar las 72 h de incubación. Los resultados se muestran como la media y desviación estándar de al menos tres replicados biológicos. Las diferencias estadísticas entre los grupos se realizaron empleando una prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). Las diferencias de ROS con respecto al grupo sin tratamiento se muestran con \*; las relativas al número de parásitos/ml entre grupos se establecen con + y, la diferencia en ROS entre el MTX y el Sb<sup>III</sup> se determina mediante el símbolo x.

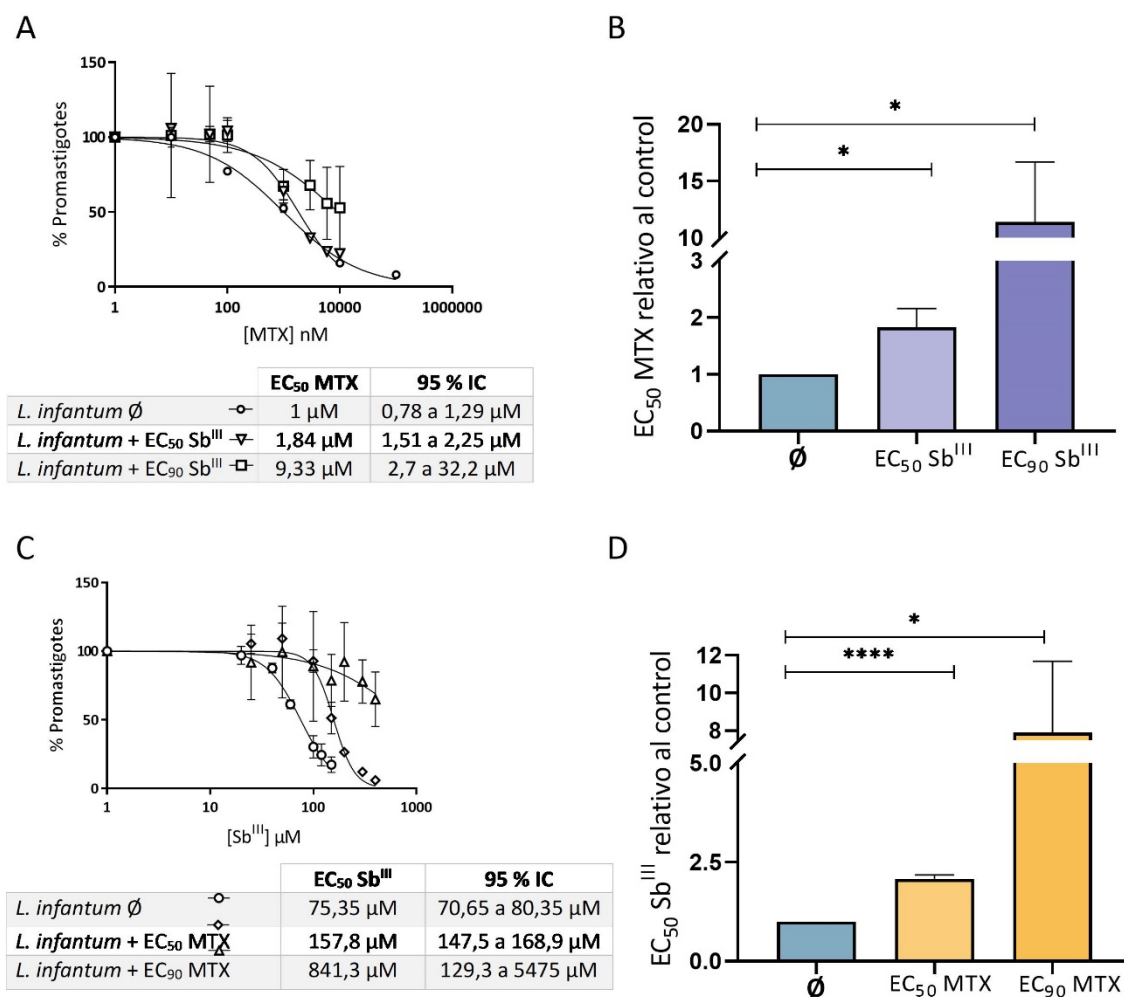
### I.5. Identificación de un perfil de resistencia cruzada entre antimonio y metotrexato.

Los resultados anteriores muestran que el fármaco MTX tiene un efecto antiparasitario basado, en parte, en la producción de un daño oxidativo en el parásito. Este mecanismo es similar al producido por los antimoniales. Además, dado que *Leishmania* es capaz de desarrollar resistencias frente a ambos fármacos (Fernandez-Prada *et al.* 2018; Ubeda *et al.* 2008), se quiso estudiar si pueden existir mecanismos comunes de resistencia entre ambos.

Por un lado, promastigotes de *L. infantum* se incubaron durante cinco días con las concentraciones del EC<sub>50</sub> o del EC<sub>90</sub> de Sb<sup>III</sup>. A continuación, se realizaron curvas de dosis-respuesta con MTX para determinar si la preexposición de los promastigotes al antimonio modifica su susceptibilidad al MTX. Como se puede observar en la figura 12 A, llama la atención que el EC<sub>50</sub> del MTX aumentó de 1 µM a 1,84 µM y a 9,33 µM tras la preexposición de los promastigotes de *L. infantum* al EC<sub>50</sub> y al EC<sub>90</sub> de Sb<sup>III</sup>, respectivamente. La resistencia a MTX se incrementó de forma estadísticamente significativa en 1,84 veces (*p*-valor 0,012) con el EC<sub>50</sub> del Sb<sup>III</sup> y en 11,39 veces (*p*-valor 0,0033) con el EC<sub>90</sub> del Sb<sup>III</sup> (figura 12 B).

Por otro lado, también se evaluó si la preexposición de promastigotes de *L. infantum* al MTX altera su susceptibilidad al antimonio. Tras la incubación de cinco días con MTX, se realizaron curvas de dosis-respuesta al Sb<sup>III</sup>. El valor de EC<sub>50</sub> de este último fármaco aumentó de 75,35 µM a 157,8 µM con el EC<sub>50</sub> del MTX y a 841,3 µM con el EC<sub>90</sub> del MTX (figura 12 C). Por tanto, la preexposición al EC<sub>50</sub> del MTX incrementó 2,07 veces la resistencia de los promastigotes al Sb<sup>III</sup> (*p* < 0,0001). Además, la preexposición a una dosis mayor del MTX, la correspondiente al EC<sub>90</sub>, aumentó hasta 7,89 veces (*p* = 0,040) la resistencia al Sb<sup>III</sup> (figura 12 D).

El fármaco MTX ha mostrado una capacidad inhibitoria del crecimiento de *Leishmania*. No obstante, su acción no se ve potenciada con un posterior cultivo de promastigotes con Sb<sup>III</sup>. Los resultados descritos en este apartado sugieren que existe un perfil de resistencia cruzada entre metotrexato y antimonio ya que la preexposición a uno de ellos incrementa la resistencia al otro.



**Figura 12. Existencia de un perfil de resistencia cruzada entre antimonio y metotrexato.** 10<sup>6</sup> promastigotes de *L. infantum* se cultivaron durante cinco días con la EC<sub>50</sub> (75,35 μM) o la EC<sub>90</sub> (240,65 μM) de Sb<sup>III</sup>. Finalizada esta pre-exposición se realizaron curvas de dosis-respuesta para determinar los valores de sensibilidad al metotrexato (A). En (B) se muestran los incrementos de resistencia asociados al MTX tras la preexposición del cultivo con Sb<sup>III</sup>, en relación a promastigotes de *L. infantum* sin preexposición previa a ningún fármaco (∅, barra azul). De igual modo, 10<sup>6</sup> promastigotes de *L. infantum* se cultivaron previamente con la EC<sub>50</sub> (1 μM) o la EC<sub>90</sub> (78,98 μM) de MTX. Finalizada esta pre-exposición se determinaron mediante curvas de dosis-respuesta los valores de sensibilidad al antimonio (C). En (D) se representa los incrementos de resistencia al antimonio tras la preexposición con metotrexato, en relación con promastigotes sin preexposición previa. Los resultados corresponden a la media y desviación estándar de al menos dos replicados biológicos. Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron mediante una prueba t de Student (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Una vez determinado *in vitro* el efecto que estos compuestos inmunosupresores presentan sobre *L. infantum*, es necesario validar estos resultados en modelos experimentales *in vivo*. Por ello, a continuación, se detalla el efecto que presentan en el

---

desarrollo de una leishmaniasis visceral, durante las primeras semanas de infección con *L. infantum*, en ratones C57BL/6.

## II. Papel de los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX en el modelo ratón de infección aguda causada por *L. infantum*

El siguiente objetivo planteado en esta tesis doctoral fue conocer si la inmunosupresión con antagonistas del TNF o con MTX afectaba al desarrollo de la LV por *L. infantum* en su fase aguda. Para ello, se determinó la carga parasitaria en los órganos diana de la enfermedad, así como el título de anticuerpos desarrollado a lo largo de las primeras cuatro semanas de infección. Además, se estudió la respuesta inmunitaria generada tras la infección, basada tanto en el número de linfocitos circulantes, como en la expresión de citoquinas con perfil Th1 por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, así como en marcadores relacionados con un perfil Th2 de susceptibilidad a la infección. Para ello, se emplearon ratones C57BL/6 ya que, en éstos se desarrolla una infección aguda clara, que acaba resolviéndose de forma natural. Estos ratones fueron inmunosuprimidos con anti-TNF o MTX y posteriormente infectados con promastigotes de *L. infantum* durante cuatro semanas.

### II.1. La carga parasitaria durante la fase aguda de la infección se vio alterada por la inmunosupresión con anti-TNF y MTX.

La inoculación i.v. de  $1 \times 10^7$  promastigotes de *L. infantum* en ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con anti-TNF o MTX produjo una diseminación general de los parásitos en hígado, bazo y médula ósea.

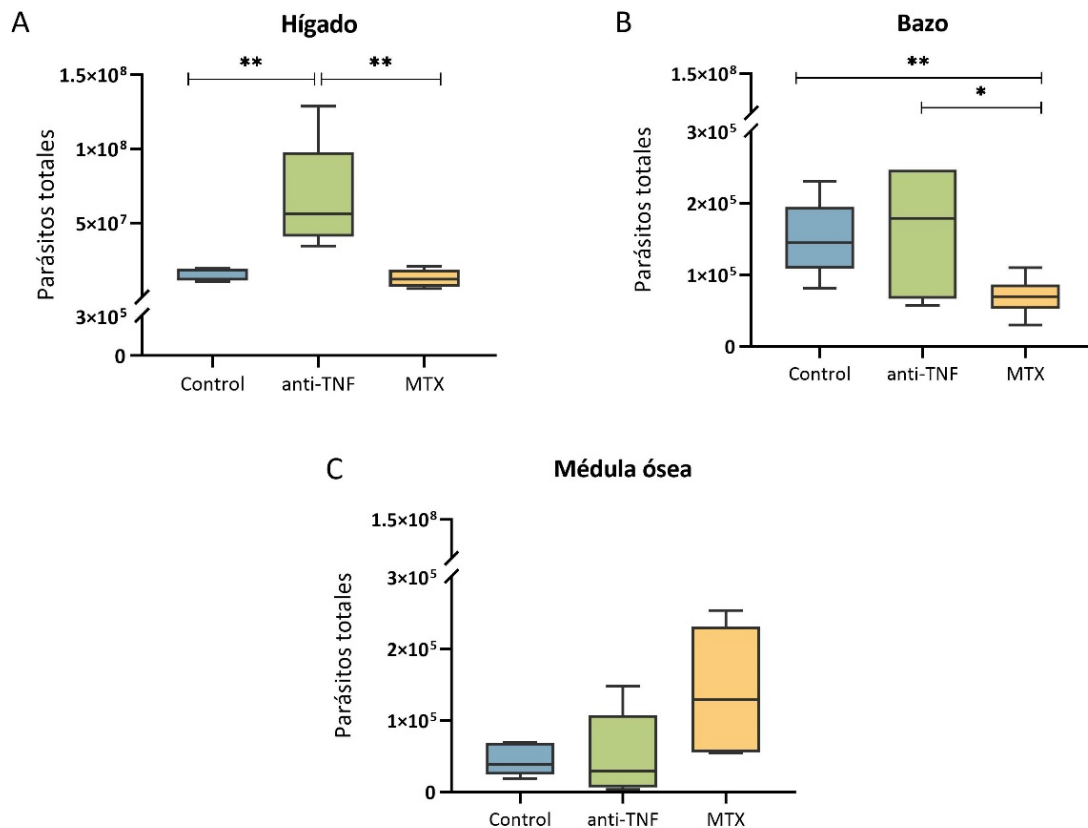
Los resultados de qPCR mostraron que el hígado fue el órgano más parasitado de todos los grupos, tal y como ocurre en el modelo de ratón de leishmaniasis visceral aguda. La inmunosupresión farmacológica conduce a diferencias significativas entre los grupos en la carga parasitaria presente en este órgano tras cuatro semanas de infección (figura 13 A). El número de parásitos totales detectado en el grupo inmunosuprimido con MTX fue  $1,27 \times 10^7$ , no significativamente distinto al del grupo control no inmunosuprimido. El tratamiento con anti-TNF, por su parte, provocó un incremento en la carga parasitaria ( $6,77 \times 10^7$  parásitos totales), que fue estadísticamente significativo

con respecto al grupo control ( $p = 0,0096$ ) y al grupo inmunosuprimido con MTX ( $p = 0,0039$ ).

En este momento de la infección, el bazo experimenta menores cargas parasitarias que el hígado. No obstante, también se encontraron diferencias importantes en el número de parásitos que se relacionan con los distintos tratamientos inmunosupresores (figura 13 B). En el grupo control y en el grupo inmunosuprimido con anti-TNF se observó un número de parásitos similar en este órgano, de  $1,50 \times 10^5$  y de  $1,63 \times 10^5$ , respectivamente. Por otra parte, en el bazo de los animales inmunosuprimidos con MTX fueron detectados  $0,69 \times 10^5$  parásitos totales, lo que supone una disminución de la carga parasitaria con respecto a la del grupo control ( $p = 0,0097$ ) y a la del grupo inmunosuprimido con anti-TNF ( $p = 0,030$ ).

Por último, la médula ósea es otra diana principal de la leishmaniasis visceral (figura 13 C). Tanto el grupo control ( $0,45 \times 10^5$  parásitos totales) como el inmunosuprimido con anti-TNF ( $0,51 \times 10^5$  parásitos totales) presentaron en la médula ósea las menores cargas parasitarias de los tres órganos descritos. Sin embargo, en los ratones inmunosuprimidos con MTX el número total de parásitos en la médula ósea fue de  $1,41 \times 10^5$ , sin diferencias estadísticas con respecto al grupo control ( $p = 0,053$ ).

Los resultados relativos a la carga parasitaria indican que la inmunosupresión farmacológica modifica sustancialmente el curso de la infección por *L. infantum* en la fase inicial de la infección, de forma distinta en función del fármaco inmunosupresor empleado. Es destacable que la inmunosupresión con antagonistas del TNF incrementa la carga parasitaria en el hígado, un órgano en el que la infección aguda se resuelve de forma espontánea en el modelo ratón. Por lo tanto, este resultado parece indicar una evolución más severa de la infección aguda por *L. infantum* en ratones C57BL/6 debido a la inhibición específica de la acción del TNF.



**Figura 13. Carga parasitaria en ratones inmunosuprimidos con anti-TNF y MTX.** Ratones C57BL/6 fueron inmunosuprimidos con anti-TNF o MTX o inoculados con PBS en el caso del grupo control y, una semana después, infectados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *L. infantum*. Tras la eutanasia a las cuatro semanas post infección, el número total de parásitos se determinó por qPCR en el hígado (A), bazo (B) y médula ósea (C) de los animales. Los resultados se muestran mediante un diagrama de cajas y bigotes en el que se representa la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales se determinaron utilizando la prueba t de Student. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

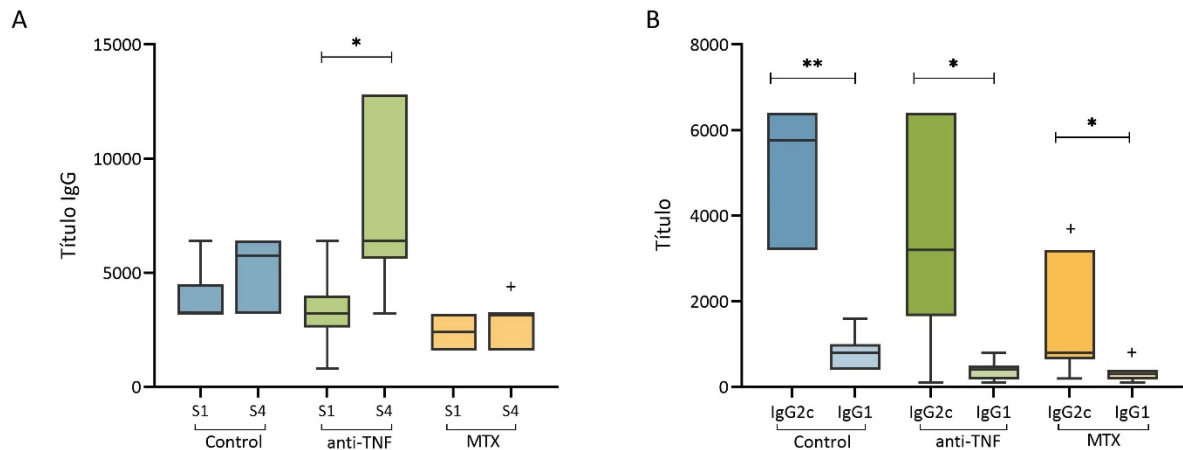
## II.2. La respuesta inmunitaria humoral se vio afectada por los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX.

La hipergammaglobulinemia es uno de los signos de una leishmaniasis visceral activa. Por este motivo se evaluó mediante ELISA la evolución de la presencia de anticuerpos específicos frente a *Leishmania* en el suero de los animales extraído semanalmente. Tras cuatro semanas de infección, se encontraron anticuerpos IgG específicos en todos los grupos (figura 14 A). Sin embargo, solo se detectó un incremento notable y estadísticamente significativo en el título de IgG entre la semana 1 (S1) y cuatro (S4) post-infección en los ratones inmunosuprimidos con anti-TNF ( $p =$

0,024), lo cual puede ser considerado como un signo de infección más grave. En el resto de los grupos el título se mantuvo en niveles más bajos y no se incrementaron significativamente durante las primeras cuatro semanas de infección. Cabe mencionar que el grupo inmunosuprimido con MTX mostró los menores títulos de IgG a lo largo del experimento siendo, en la semana 4 post-infección, estadísticamente inferiores ( $p = 0,032$ ) a los observados en el grupo control no inmunosuprimido.

Debido a que la presencia y abundancia relativa de un determinado subtipo de IgG en el modelo de ratón es indicativo del tipo de respuesta que se está desarrollando contra el parásito, se determinó el título de inmunoglobulinas específicas IgG1 e IgG2c (figura 14 B). Cuatro semanas post-infección se encontró en todos los grupos una respuesta humoral polarizada hacia el subtipo IgG2c, que en ratones C57BL/6 está asociada con una respuesta de tipo Th1. En el grupo inmunosuprimido con MTX tanto el título de IgG1 como el de IgG2c fueron significativamente inferiores a los del grupo control ( $p = 0,02$  y  $p = 0,013$ , respectivamente).

En general, el mayor título de anticuerpos IgG2c en todos los grupos se relaciona con una respuesta inmunitaria celular de tipo Th1. No obstante, la presencia de una mayor cantidad de anticuerpos IgG específicos frente a *Leishmania* indica que la inmunosupresión con el anticuerpo monoclonal antagonista de TNF conduce a una hipergammaglobulinemia asociada con una mayor gravedad de la infección por *L. infantum*. Por el contrario, el tratamiento con MTX parece disminuir la respuesta humoral específica contra *Leishmania*, lo cual estaría relacionado con las menores cargas parasitarias encontradas en el bazo de estos animales.



**Figura 14. Respuesta humoral generada tras la inmunosupresión e infección con *L. infantum*.**

El título de anticuerpos IgG (A) así como de los subtipos IgG1 e IgG2c (B) específicos frente a *L. infantum* fue determinado mediante ELISA en el suero de ratones C57BL/6 extraído de forma semanal. En (A) se detallan la mediana y el rango intercuartílico del título de IgG en las semanas 1 (S1) y 4 (S4) post infección mientras que, en (B) los títulos correspondientes a los subtipos IgG2c e IgG1 en la semana 4 post infección. Las diferencias estadísticas encontradas dentro del mismo grupo (\*) o con respecto al grupo control (+) se determinaron mediante el test Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

### II.3. Los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX reducen el número de linfocitos circulantes en sangre.

Como se ha descrito anteriormente (apartado II.2. de Introducción), los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> desempeñan un papel principal en la respuesta inmunitaria frente a la infección por *Leishmania*. Por tanto, es importante evaluar si el tratamiento inmunosupresor con antagonistas del TNF o metotrexato puede comprometer la presencia de estas células en la respuesta frente al parásito. Una primera aproximación fue determinar semanalmente, mediante citometría de flujo, el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> presentes en la sangre de los animales. Para ello, se realizó una tinción celular de las células de la sangre empleando los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 (apartado II.14. de Materiales y Métodos).

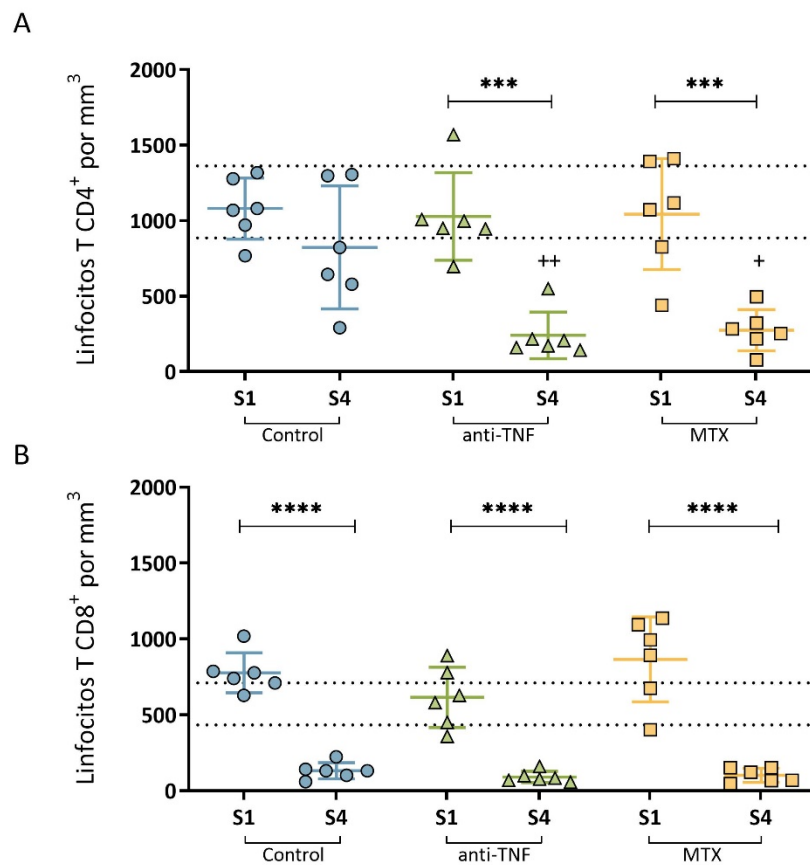
Una semana después de la infección (S1) el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> permaneció, en todos los grupos, dentro de los límites de normalidad ( $1.124 \pm 238/\text{mm}^3$ ), tal y como se observa en la figura 15 A. Después de cuatro semanas de infección (S4), se observó una ligera reducción en el grupo control no inmunosuprimido

(823,3 linfocitos T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>), no significativa ( $p = 0,19$ ). Sin embargo, la administración de anti-TNF durante las 4 primeras semanas de infección sí provocó una reducción drástica del número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> de hasta el 76 % con respecto a la semana 1 ( $p = 0,0002$ ). Además, el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> encontrado en la semana 4 (240,4 linfocitos T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>) fue inferior a los del grupo control en este momento de la infección ( $p = 0,0084$ ). De manera similar, el grupo inmunosuprimido con MTX mostró un descenso significativo del 73,6 % en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> desde el inicio de la infección ( $p = 0,0007$ ). Cuatro semanas post-infección se encontraron 274,7 linfocitos T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, un número también inferior a los valores del grupo control no inmunosuprimido ( $p = 0,010$ ). No se encontraron diferencias significativas 4 semanas post-infección entre los dos grupos inmunosuprimidos.

Por otro lado, se determinó el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, y se comparó con los valores de normalidad de ratones C57BL/6 ( $716 \pm 173$ /mm<sup>3</sup>). En todos los grupos se observó una disminución significativa ( $p < 0,0001$ ) en el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> entre la semana 1 y 4 post-infección que, además, alcanzó niveles por debajo de los límites de normalidad en la semana 4 (figura 15 B). En concreto, 4 semanas post-infección el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> se redujo hasta un 82,98 % en el grupo control (132,3 linfocitos T CD8<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>); un 85,17 % en el caso de los ratones inmunosuprimidos con anti-TNF (91,28 linfocitos T CD8<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>) y un 88,25 % en el grupo inmunosuprimido con MTX (101,8 linfocitos T CD8<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>), sin diferencias estadísticas entre los grupos.

Los resultados correspondientes al número de linfocitos circulantes en sangre descritos en este apartado indican que la inmunosupresión producida por los compuestos antagonistas del TNF y por el metotrexato reduce drásticamente los niveles de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> durante una infección con *L. infantum*, hasta unos niveles por debajo de los límites de normalidad. Esto podría sugerir una menor eficacia del sistema inmunitario durante la fase aguda de la infección por *L. infantum* y, con ello, una menor respuesta frente a la infección en estos grupos inmunosuprimidos farmacológicamente. Por otro lado, debido a que la disminución en el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> también se produjo en el grupo control no inmunosuprimido, puede considerarse que, a diferencia de lo que ocurre con los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, este fenómeno

es consecuencia principalmente de la infección generada por el parásito y no por el tratamiento inmunosupresor.



**Figura 15. Cuantificación del número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> circulantes en sangre.** Semanalmente se realizó una extracción de sangre de la vena submaxilar de los ratones para analizar mediante citometría de flujo la cantidad de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (A) y T CD8<sup>+</sup> (B) por mm<sup>3</sup> presentes en los animales. Se muestran los resultados de la semana 1 (S1) y 4 (S4) post infección, que se representan como la media y desviación estándar de cada grupo. A través de una línea de puntos discontinua se establecen los límites de normalidad de  $1.124 \pm 238$  por mm<sup>3</sup> para los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y de  $716 \pm 173$  por mm<sup>3</sup> para los T CD8<sup>+</sup> establecidos a partir de ratones no infectados ni tratados de la misma edad ( $n = 5$ ). Las diferencias estadísticas se analizaron por medio de un test t de Student ( $p < 0,05$ ) y se representan con \* para las diferencias entre grupos y con + para las diferencias encontradas con respecto a la semana cuatro del grupo no inmunosuprimido.

#### II.4. La respuesta inmunitaria celular frente a *L. infantum* se ve modificada por los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX.

La respuesta inmunitaria celular es clave para inducir un perfil de resistencia o de susceptibilidad frente a la infección por *Leishmania*. Por ello, se caracterizaron en el

bazo tanto las distintas poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productores de citoquinas con perfil Th1, como la población de linfocitos T reguladores y del marcador de agotamiento celular PD-1, relacionados con una respuesta inmunitaria de tipo Th2. Estos análisis se realizaron en los esplenocitos de los animales ya que el bazo no es solamente un sitio de infección, sino que también es un órgano linfoide implicado en el desarrollo de la respuesta inmunitaria contra el parásito (Stanley *et al.* 2007).

○ En primer lugar, se realizó la caracterización de los linfocitos T productores de citoquinas con perfil Th1. Para ello, se estimularon los esplenocitos de los ratones infectados con el antígeno SLA de *L. infantum* durante 6 horas. A continuación, se midió mediante citometría de flujo la frecuencia relativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productores de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2, como marcadores de la respuesta Th1, a través de un marcaje celular con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF y anti-IL-2 (apartado II.17. de Materiales y Métodos). La magnitud de la respuesta Th1 se determinó en función de la frecuencia en la que estas células producen una determinada citoquina (Seder *et al.* 2008). Además, se estudió si las células producen las citoquinas de forma independiente (células monoproductoras) o si, por el contrario, se trata de células capaces de producir dos o tres de estas citoquinas al mismo tiempo (multifuncionalidad). La producción múltiple de las citoquinas pro-inflamatorias frente a la infección por *Leishmania* se ha relacionado con una respuesta más eficaz, con respecto a la síntesis de una sola citoquina (Darrah *et al.* 2007).

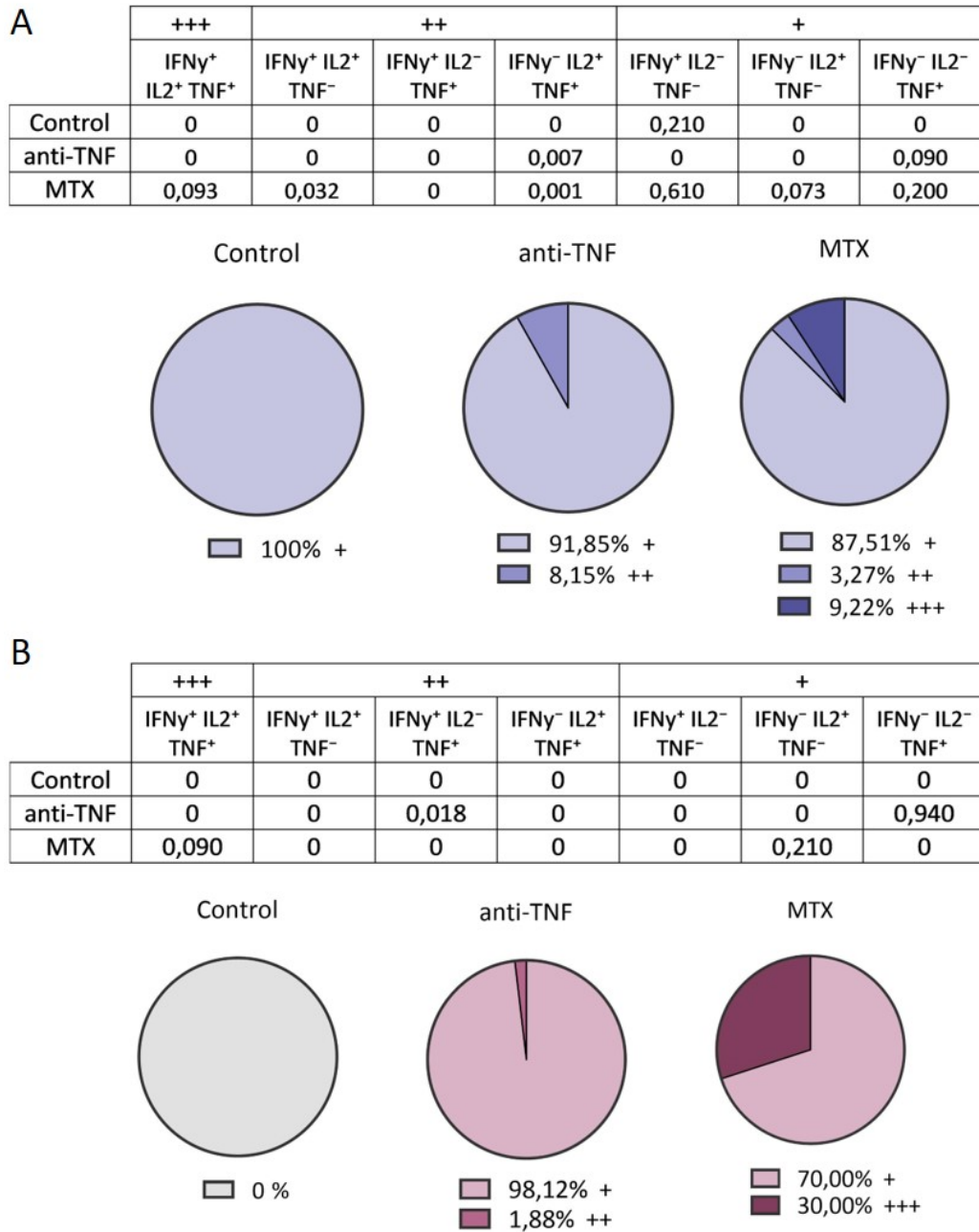
Los resultados obtenidos indican que la capacidad de estos linfocitos de producir citoquinas difiere debido al tipo de tratamiento inmunosupresor. En la figura 16 se describe la frecuencia de cada uno de los fenotipos funcionales de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (A) y T CD8<sup>+</sup> (B) productores de IFN- $\gamma$ , TNF y/o IL-2. En el gráfico en tarta se representa el porcentaje total de células mono, dobles o triples productoras de estas citoquinas. Cuatro semanas después de la infección, la frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de una o varias citoquinas (0,097 %) en el grupo anti-TNF fue la mitad con respecto a la del grupo control (0,21 %). No solo se observaron diferencias en la frecuencia de estos linfocitos, sino que también en la citoquina producida mayoritariamente tras la restimulación con SLA. Mientras que en el grupo control la respuesta celular se basó

únicamente en células monoproductoras de IFN- $\gamma$ , en el grupo anti-TNF las células productoras de TNF fueron precisamente las más abundantes. En concreto, la citoquina TNF fue producida en un 91,85 % por células T CD4<sup>+</sup> monoproductoras, y en un 8,15 % por células dobles productoras TNF<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>. Esta producción mayoritaria de TNF por las células T CD4<sup>+</sup> de este grupo inmunosuprimido podría estar relacionada con una respuesta exacerbada frente a la inactivación de esta molécula por el tratamiento inmunosupresor. Por otra parte, la inmunosupresión con MTX se asoció con una frecuencia 4,76 y 10 veces más elevada de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2, predominantes en la respuesta inmunitaria celular Th1 (1 %), respecto al grupo control y al inmunosuprimido con anti-TNF, respectivamente. Estos datos indican que la inmunosupresión con MTX conduce a una mejor respuesta Th1 durante la infección aguda por *L. infantum* respecto a la producida cuando la inmunosupresión se genera con anti-TNF.

En cuanto a la respuesta producida por los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, los esplenocitos de los grupos inmunosuprimidos fueron capaces de producir citoquinas en respuesta al SLA de *L. infantum*, mientras que no fue así en el caso del grupo control no inmunosuprimido (figura 16 B). La frecuencia total de estos linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de citoquinas en el grupo anti-TNF fue tres veces mayor (0,95 %) que en el grupo MTX (0,3 %). Como ocurría con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> del grupo anti-TNF, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de estos animales basaron su respuesta principalmente en la síntesis de TNF (98,12 % de células monoproductoras), junto con un 1,88 % de linfocitos dobles productores IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup>. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> del grupo MTX que respondieron a SLA expresaron mayoritariamente (70 %) sólo IL-2. Es destacable que los esplenocitos de este grupo produjeron con la misma frecuencia (0,09 %) linfocitos triples productores IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> tanto en CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup>.

Los resultados del análisis de las subpoblaciones de linfocitos T productores de citoquinas con perfil Th1 en el bazo de los animales infectados indican que la inmunosupresión producida por anti-TNF genera una respuesta celular protectora más limitada, en términos de producción de citoquinas pro-inflamatorias. Este hecho podría estar relacionado con las mayores cargas parasitarias encontradas en el hígado de estos animales y con una alta producción de IgG (figura 13 A). Estos datos en conjunto podrían

sugerir una mayor gravedad en el desarrollo de la leishmaniasis visceral aguda en condiciones de inmunosupresión con antagonistas del TNF, con respecto a la inmunosupresión con MTX.



**Figura 16. Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productores de citoquinas pro-inflamatorias tras la estimulación de los esplenocitos de los animales con SLA.** Mediante citometría de flujo se analizó la producción específica de las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 al estimular con el SLA de *L. infantum* los esplenocitos de los animales durante 6 h. La estrategia de análisis booleano permitió la caracterización simultánea de las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup> (B) productores de una (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF<sup>+</sup> o IL-2<sup>+</sup>), dos (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>, TNF<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>) o tres (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>

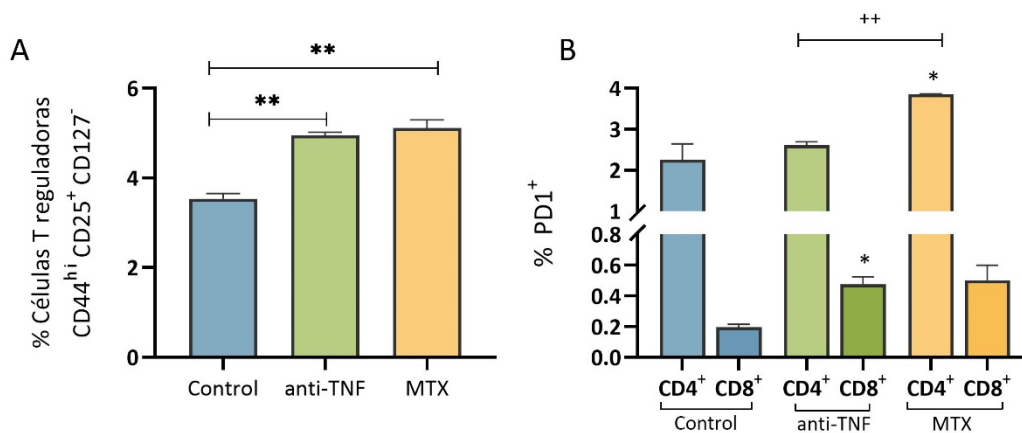
TNF<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>) citoquinas al mismo tiempo. En las tablas se refleja la frecuencia de cada una de estas combinaciones presentadas y los gráficos representan el porcentaje total de estos linfocitos monoproductores (+) de cualquiera de estas citoquinas, dobles productores (++) o triples productores (+++). Los resultados corresponden a la agrupación de esplenocitos de cada grupo de animales.

- En segundo lugar, los esplenocitos de estos animales fueron también analizados para caracterizar las poblaciones asociadas con una respuesta inmunitaria celular de tipo Th2 como la presencia de células T reguladoras (CD44<sup>hi</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup>) productoras de IL-10 o la expresión del marcador de agotamiento celular PD-1.

Los grupos inmunosuprimidos anti-TNF y MTX presentaron valores similares de células T reguladoras (Treg) de 4,95 % y 5,11 %, respectivamente (figura 17 A). En ambos casos, esta frecuencia de células Treg fue estadísticamente superior ( $p = 0,0044$  y  $p = 0,0093$ , respectivamente) a la generada por el grupo control (3,54 %).

Por último, se examinó el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> que expresaban el marcador de agotamiento celular PD-1<sup>+</sup> (figura 17 B). Los linfocitos de los grupos inmunosuprimidos fueron los que produjeron este marcador en mayor medida. Por un lado, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> del grupo inmunosuprimido con MTX expresaron PD-1<sup>+</sup> en un 3,85 %. Este porcentaje fue superior tanto al producido por el grupo control (2,53 % con  $p = 0,027$ ) como por el grupo inmunosuprimido con anti-TNF (2,61 %,  $p = 0,0024$ ). Por otro lado, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> del grupo anti-TNF produjeron en un 0,47 % este marcador de agotamiento celular, porcentaje significativamente mayor ( $p = 0,018$ ) que el presentado por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> del grupo control, quienes lo produjeron en un 0,21 %.

Las mayores frecuencias de células T reguladoras, así como del marcador de agotamiento celular PD-1 en los grupos inmunosuprimidos farmacológicamente, podrían estar relacionadas con una menor respuesta protectora en estos grupos. Especialmente en el caso de la inmunosupresión con antagonistas del TNF, estos altos porcentajes, junto con las menores frecuencias de citoquinas pro-inflamatorias, así como los resultados de la respuesta humoral descrita anteriormente, parecen indicar una respuesta inmunitaria menos eficaz con diseminación de *Leishmania* al hígado de estos animales.



**Figura 17. Determinación de poblaciones celulares mediante un análisis *ex vivo* de los esplenocitos de los animales.** Se realizó una tinción celular en los esplenocitos de los animales con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44, anti-CD25, anti-CD127 y anti-PD1 para conocer el porcentaje de las poblaciones de células T reguladoras (A) y de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productores de PD-1<sup>+</sup> (B). Los resultados se expresan como la media y desviación estándar de cada grupo. Las diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos se analizaron a través de un test t de Student y se representan como \* para las diferencias con el grupo control y con + para las diferencias entre los grupos inmunosuprimidos.

Los resultados descritos en este segundo apartado indican que los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX modulan el curso de la leishmaniasis visceral en su fase aguda. Los dos compuestos generan una carga parasitaria diferente a la del grupo control no inmunosuprimido, en distintos órganos, lo que influye en una evolución de la enfermedad. Además, en ambos grupos se produce una respuesta inmunitaria humoral y celular que difiere de la del grupo control. Mientras que en el grupo anti-TNF esta respuesta está marcada por una mayor presencia de anticuerpos, en el grupo MTX se observa un mayor predominio de células multiproductoras. En ambos casos, la mayor frecuencia de células asociadas con la respuesta Th2 observada podría comprometer la respuesta protectora Th1 en estos grupos, agravando la infección producida por *L. infantum* en las primeras semanas de infección. Si bien estos datos son consecuencia de la utilización de un modelo animal experimental que es capaz de resolver la infección aguda de forma natural, los resultados aquí mostrados presentan una potencial relevancia clínica, ya que en pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente se ha observado una leishmaniasis visceral más severa. Estos pacientes, además, presentan

---

una respuesta al tratamiento de la leishmaniasis visceral más limitada, aunque se desconocen los mecanismos subyacentes que desembocan en este resultado. Por este motivo, a continuación, se estudió el efecto de los compuestos inmunosupresores anti-TNF y MTX en el tratamiento de la infección visceral crónica con antimoniales pentavalentes en el modelo ratón.

### III. Influencia de la inmunosupresión farmacológica con anti-TNF o MTX en el éxito del tratamiento en el modelo experimental de leishmaniasis visceral.

Después de analizar cómo los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX influyen en el inicio de la infección por *L. infantum*, se planteó estudiar su efecto durante el tratamiento de la enfermedad, una vez establecida la infección. Para ello, se utilizaron ratones de la cepa BALB/c ya que, como se mencionó en la Introducción, son susceptibles a la enfermedad y progresan hacia el estadio crónico de la misma. Estos ratones se inmunosuprimieron con anti-TNF o MTX y, posteriormente, se infectaron con promastigotes de *L. infantum*. Seis semanas después de la infección se inició el tratamiento con antimoniales pentavalentes comercializados (Glucantime®). En este estudio se empleó este tratamiento antiparasitario por ser el tratamiento habitual de la leishmaniasis visceral. Tras finalizar el tratamiento leishmanicida se analizaron las posibles diferencias en el número de parásitos en los órganos viscerales, así como en la respuesta inmunitaria específica frente a *Leishmania*.

#### III.1. La eficacia del tratamiento parasitario se ve alterada en condiciones de inmunosupresión farmacológica

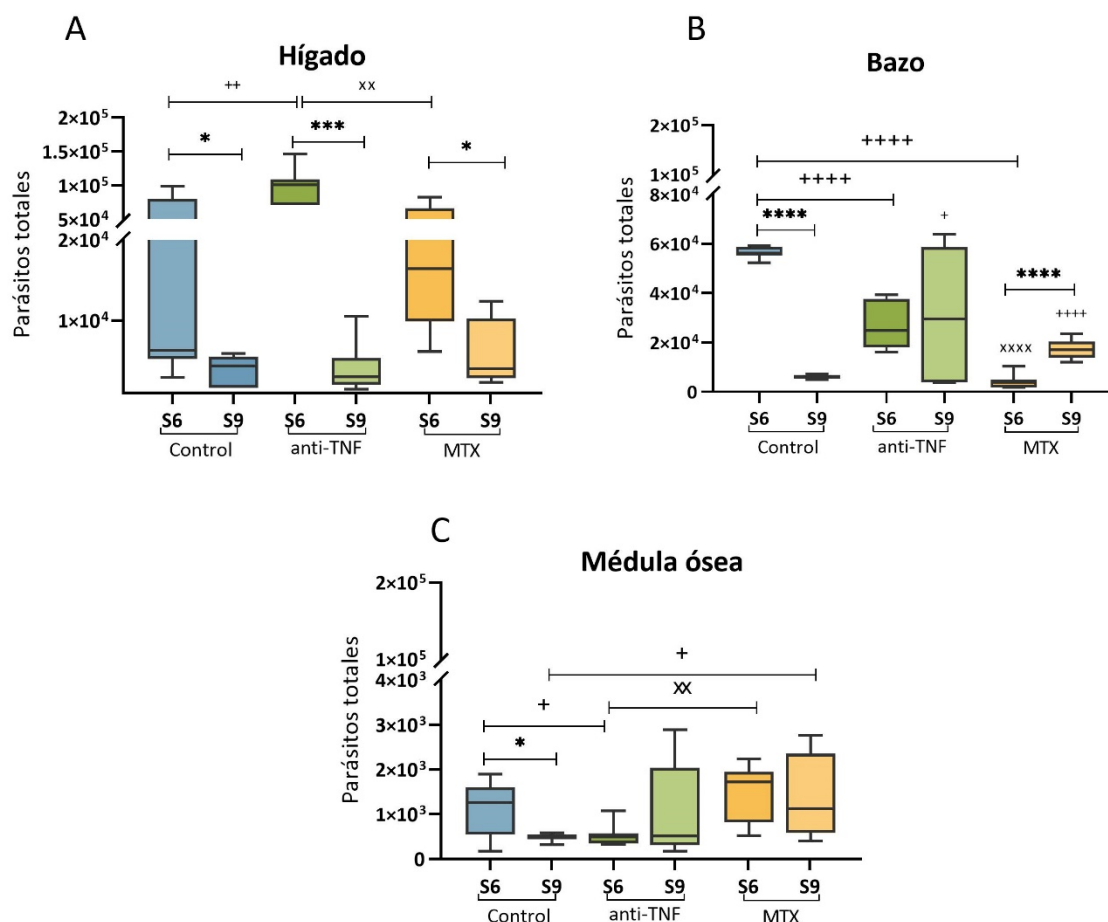
Una semana después del inicio de la inmunosupresión de ratones BALB/c con los inmunosupresores anti-TNF y MTX se procedió a la infección de los animales con promastigotes de *L. infantum*. Seis semanas después (S6), una vez la infección comienza a ser controlada en el hígado, aumenta progresivamente en el bazo hacia la fase crónica. En ese momento (S6), se inició el tratamiento con Glucantime® durante 21 días, hasta alcanzar la semana 9 post infección (S9). Se realizaron análisis parasitológicos en los órganos diana de la leishmaniasis visceral, hígado, bazo y médula ósea (figura 18) en S6 y S9 para evaluar la eficacia del tratamiento de la leishmaniasis visceral con antimoniales pentavalentes y determinar si anti-TNF o MTX afectan a la cura parasitológica.

○ Los resultados de qPCR mostraron que en el hígado en la semana 6 post-infección las mayores cargas parasitarias se encontraron en el grupo inmunosuprimido con anti-TNF ( $9,82 \times 10^4$  parásitos totales) (figura 18 A), al igual que ocurría durante la fase aguda de la infección. El número de parásitos totales en este grupo fue significativamente superior al grupo control ( $p = 0,0099$ ) y al grupo MTX ( $p = 0,0033$ ). Sin embargo, al finalizar las pautas de tratamiento con Glucantime® (S9), se observó una reducción significativa en las cargas parasitarias observadas en el hígado en los tres grupos experimentales, sin diferencias estadísticas entre ellos.

Cuando la infección visceral empieza a controlarse en el hígado, se incrementan las cargas parasitarias en el bazo, tal y como se observa en el caso de la S6 del grupo control no inmunosuprimido (figura 18 B). Sin embargo, la inmunosupresión con anti-TNF parece retrasar este proceso ya que, en este grupo, se determinó en S6 un número total de parásitos ( $2,68 \times 10^4$ ) inferior a los encontrados en el grupo control no inmunosuprimidos ( $5,65 \times 10^4$ ,  $p < 0,0001$ ). El comportamiento observado en el grupo MTX fue diferente al de los otros dos grupos experimentales ya que los animales de este grupo presentaron las menores cargas parasitarias en bazo en la S6 ( $0,41 \times 10^4$  parásitos totales). Durante el establecimiento de la fase crónica de la infección, el tratamiento con Glucantime® en el bazo solamente fue eficaz en el caso del grupo no inmunosuprimido ( $p < 0,0001$ ). Lo más destacable en este órgano fue que la inmunosupresión con MTX condujo a un incremento significativo en el número de parásitos en el bazo, tras el tratamiento leishmanicida ( $1,71 \times 10^4$ ,  $p < 0,0001$ ) que, además, fue superior al presentado por el grupo control ( $p < 0,0001$ ).

Finalmente, en la médula ósea, el número de parásitos en S6 fue similar tanto en el grupo control ( $1,17 \times 10^3$ ) como en el grupo MTX ( $1,49 \times 10^3$ ) (figura 18 C). Sin embargo, en el grupo anti-TNF se observó un número de parásitos ( $0,52 \times 10^3$ ) en este órgano inferior al presentado por el grupo control ( $p = 0,016$ ) y por el grupo MTX ( $p = 0,0013$ ). Una vez finalizado el tratamiento con Glucantime® en S9, al igual que lo ocurrido en el caso del bazo, las cargas parasitarias solamente se redujeron en el caso del grupo control ( $p = 0,011$ ). De igual modo, el número de parásitos en la médula ósea del grupo MTX ( $1,35 \times 10^3$ ) fue significativamente superior ( $p = 0,039$ ) al determinado en el grupo control ( $0,47 \times 10^3$  parásitos totales).

Estos resultados sugieren que los fármacos inmunosupresores anti-TNF y MTX afectan al tratamiento de la leishmaniasis visceral con Glucantime®, lo que se ve reflejado en las mayores cargas parasitarias encontradas en bazo en ambos grupos tras el tratamiento parasitológico y en médula ósea en el grupo MTX. Cabe destacar que el efecto antiparasitario del MTX parece verse revertido en el bazo al finalizar el tratamiento con antimoniales pentavalentes, tal y como se aprecia en el aumento del número de parásitos encontrados en el bazo de este grupo. Este resultado podría relacionarse con la existencia del mecanismo de resistencia cruzada entre MTX y Sb descrito previamente (apartado I.5.).



**Figura 18. Determinación de la carga parasitaria en los órganos diana de la LV tras el tratamiento con Glucantime®.** Ratones BALB/c fueron inmunosuprimidos con anti-TNF o MTX y, una semana más tarde, infectados por vía intravenosa con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *L. infantum*. Tras 6 semanas de infección (S6) se iniciaron las pautas de tratamiento de la enfermedad con Glucantime® durante 21 días, hasta alcanzar la semana 9 post infección (S9). Tanto en la S6 como en la S9 se llevó a cabo la eutanasia de diferentes grupos de animales para determinar mediante qPCR el número de parásitos totales en hígado, bazo y médula ósea. Los

resultados se muestran mediante un diagrama de cajas y bigotes en el que se detalla la mediana y el rango intercuartílico para cada condición. Las diferencias estadísticas entre los grupos se analizaron mediante una prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). Se representan con \* para las diferencias entre la S6 y S9 del mismo grupo; con + para las diferencias con la misma semana del grupo control y, con x para las diferencias semanales entre los grupos inmunosuprimidos.

- Por otro lado, y conociendo que durante la fase crónica de la leishmaniasis visceral se producen alteraciones en la arquitectura y el microambiente del bazo (de Melo *et al.* 2020), se determinaron los pesos de este órgano y se cuantificaron el número de esplenocitos presentes antes y después del tratamiento con Glucantime® (figura 19).

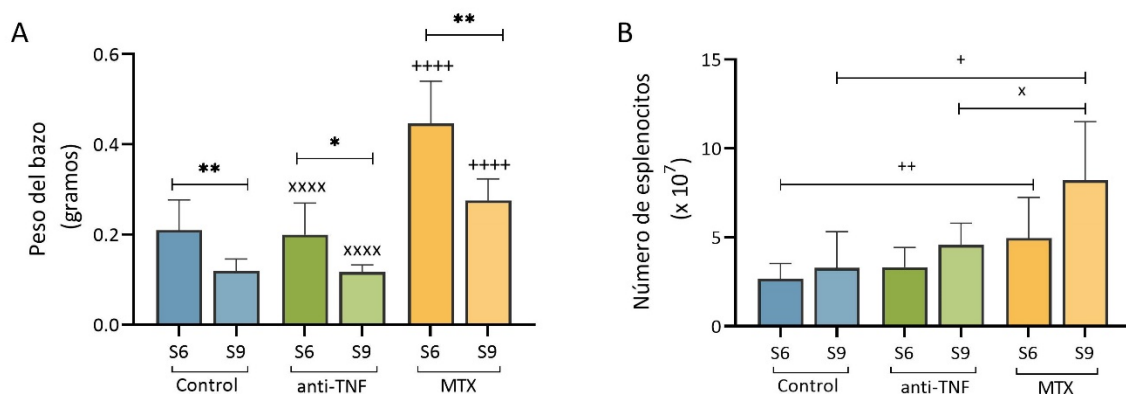
Antes del tratamiento, en la semana 6 post infección, el peso del bazo fue de 0,21, 0,20 y 0,44 gramos para los grupos control, anti-TNF y MTX, respectivamente (figura 19 A). Como consecuencia de la infección, en todos los grupos el peso del bazo fue superior a los 0,1 gramos descritos en el bazo de ratones BALB/c de la misma edad y sin infección (de Melo *et al.* 2020; Sukhumavasi *et al.* 2021). Llama la atención que, el peso del bazo en el grupo MTX fue significativamente mayor ( $p < 0,0001$ ) al de los bazos del grupo control y del grupo inmunosuprimido con anti-TNF.

El tratamiento con Glucantime® redujo de forma significativa el peso del bazo en todos los grupos experimentales. De tal forma que, en la semana 9 post infección, el peso del bazo en el grupo control disminuyó hasta alcanzar una media de 0,12 gramos ( $p = 0,006$ ) y en el grupo anti-TNF a 0,11 gramos ( $p = 0,015$ ). En ambos casos, al finalizar el tratamiento, el peso del bazo recuperó los valores de normalidad establecidos. Sin embargo, la reducción del peso del bazo en el grupo inmunosuprimido con MTX no llegó a estos límites y se mantuvo más elevado, con una media de 0,27 gramos, significativamente mayor al de los otros dos grupos experimentales ( $p < 0,0001$ ).

El aumento en el peso del bazo en el grupo MTX después del tratamiento no pudo relacionarse con la presencia de un mayor número de esplenocitos con respecto a la semana 6 (figura 19 B). No obstante, tras el tratamiento con Glucantime®, el número de esplenocitos fue, en todos los grupos, superior al que presentan ratones BALB/c de la misma edad no infectados (entre  $1,6 \times 10^7$  y  $1,8 \times 10^7$  esplenocitos) (Pinchuk and Filipov 2008). Al finalizar el tratamiento con Glucantime®, el número de esplenocitos en

el grupo MTX ( $8,20 \times 10^7$ ) fue superior tanto al grupo control ( $4,20 \times 10^7$ ;  $p = 0,014$ ) como al grupo inmunosuprimido con anti-TNF ( $4,56 \times 10^7$ ;  $p = 0,032$ ).

La mayor celularidad, así como el peso más elevado en el bazo de los ratones inmunosuprimidos con MTX en la semana 9 post infección, podría estar relacionado con el aumento de células responsables de la respuesta inmunitaria tras el tratamiento de la enfermedad en este grupo inmunosuprimido.



**Figura 19. Peso del bazo y número de esplenocitos en ratones inmunosuprimidos antes y después del tratamiento con Glucantime®.** Ratones BALB/c inmunosuprimidos con anti-TNF o MTX fueron infectados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *L. infantum* durante 6 semanas (S6) y, posteriormente tratados con Glucantime® durante 3 semanas (S9). Tanto en la semana 6 previa al tratamiento como en la semana 9, una vez finalizado el mismo, se procedió a la eutanasia de los animales. Los bazos de cada uno de ellos se pesaron (A) y, tras realizar el procesamiento correspondiente, se determinó el número de esplenocitos (B). Los resultados se muestran en un diagrama de cajas y bigotes en el que se representa la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante una prueba t de Student ( $p < 0,05$ ) y se representan con \* para las diferencias entre la S6 y S9 del mismo grupo; con + para las diferencias con la misma semana del grupo control y, con x para las diferencias semanales entre los grupos inmunosuprimidos.

### III.2. La inmunosupresión con anti-TNF genera una marcada hipergammaglobulinemia después del tratamiento con Glucantime®.

Para determinar si la inmunosupresión con anti-TNF o MTX afecta a la respuesta inmunitaria humoral antes y después del tratamiento con Glucantime®, se analizó mediante ELISA el título de anticuerpos específicos frente al parásito.

La infección en el grupo control produjo un incremento en el título de anticuerpos IgG específicos entre la semana 1 (S1) y la semana 6 (S6) post-infección, aunque este no fue estadísticamente significativo ( $p = 0,33$ ). En el grupo anti-TNF el aumento de la hipergammaglobulinemia fue más acusado, incrementándose el título de IgG desde 228,6 en la semana 1 post-infección a 2.371 en la semana 6 post-infección ( $p = 0,0087$ ) (figura 20 A). En cambio, es destacable que este incremento no se observó en los animales inmunosuprimidos con MTX, en los que se encontraron los títulos más bajos de estos anticuerpos IgG específicos.

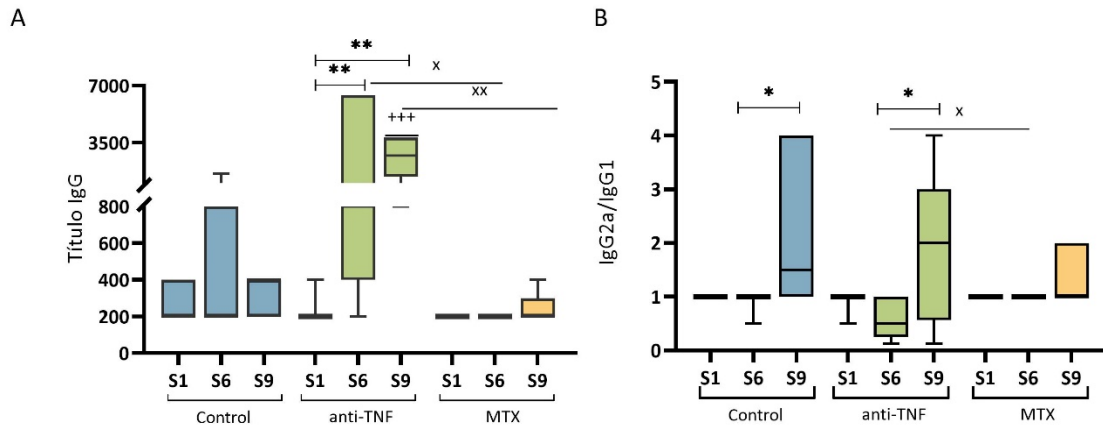
El tratamiento antiparasitario con Glucantime® redujo el título de IgG en el grupo anti-TNF en la semana 9 post-infección (S9). No obstante, los anticuerpos IgG específicos en el grupo anti-TNF permanecieron considerablemente elevados, siendo significativamente mayor que en el grupo control ( $p = 0,0006$ ) y que en el grupo MTX ( $p = 0,0043$ ). Como ya se ha mencionado antes, los animales inmunosuprimidos con MTX no mostraron títulos elevados de IgG específicos de *Leishmania* en ningún momento tras la infección.

Debido a que los subtipos de IgG1 e IgG2a en ratones BALB/c se relacionan con una polarización hacia una respuesta Th2 o Th1, respectivamente, se determinó mediante ELISA los títulos de ambos subtipos de IgG y se calculó la ratio IgG2a/IgG1 entre ambos.

El tratamiento con Glucantime® condujo a un incremento estadísticamente significativo de la ratio IgG2a/IgG1 en los animales no inmunosuprimidos ( $p = 0,049$ ) y en los inmunosuprimidos con anti-TNF ( $p = 0,041$ ). La misma tendencia se observó en el grupo inmunosuprimido con MTX, aunque no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,44$ ), quizás por la escasa respuesta humoral detectada en este grupo. Es importante destacar que antes del tratamiento con Glucantime® se encontró en el grupo anti-TNF una ratio polarizada hacia el subtipo IgG1, asociado con una mayor respuesta de tipo Th2 en este grupo y, por lo tanto, una mayor severidad de la infección.

Estos resultados sugieren que a pesar de la hipergammaglobulinemia detectada durante las seis primeras semanas de infección en el grupo anti-TNF, el tratamiento de la leishmaniasis visceral con antimoniales redujo el título de IgG específicos frente al

parásito, a la vez que incrementó la abundancia relativa del subtipo IgG2 en este grupo. No obstante, esta mejoría en el perfil inmunológico del grupo anti-TNF no va a ser suficiente para controlar la infección.



**Figura 20. Determinación del título de anticuerpos IgG y de la ratio IgG2a/IgG1.** El título de anticuerpos IgG (A) así como de los subtipos IgG1 e IgG2a (B) específicos frente al SLA de *L. infantum* fueron determinados mediante ELISA en el suero de los ratones BALB/c extraído semanalmente. En (A) se detallan la mediana y el rango intercuartílico del título de IgG. En (B) la ratio IgG2a/IgG1 en las semanas 1 (S1), 6 (S6) y 9 (S9) post infección. Las diferencias estadísticas encontradas dentro del mismo grupo (\*), con respecto al grupo control (+) o entre los grupos inmunosuprimidos (x) se determinaron mediante el test Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

### III.3. La inmunosupresión farmacológica reduce el número de las poblaciones de linfocitos circulantes en sangre antes y después del tratamiento antiparasitario.

Anteriormente se describió que los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX reducen los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> circulantes en sangre (apartado II.3.). Para determinar si el tratamiento leishmanicida con antimoniales era capaz de reestablecer los niveles normales de los linfocitos circulantes en sangre, se analizaron semanalmente y mediante citometría de flujo las poblaciones circulantes de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> y de células B CD19<sup>+</sup>. Para ello, se realizó una tinción celular con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD19 (apartado II.14. de Materiales y Métodos).

Por un lado, en lo que respecta al número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (figura 21 A) tanto en la semana 1 como en la semana 6 post-infección del grupo control permanecieron dentro de los límites de normalidad determinados a partir de ratones no infectados de la misma cepa y edad ( $2.059,38 \pm 720.18/\text{mm}^3$ ). Al finalizar el tratamiento

con Glucantime® en la semana 9 post-infección, el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> aumentó drásticamente, alcanzando una media de 2.949/mm<sup>3</sup>.

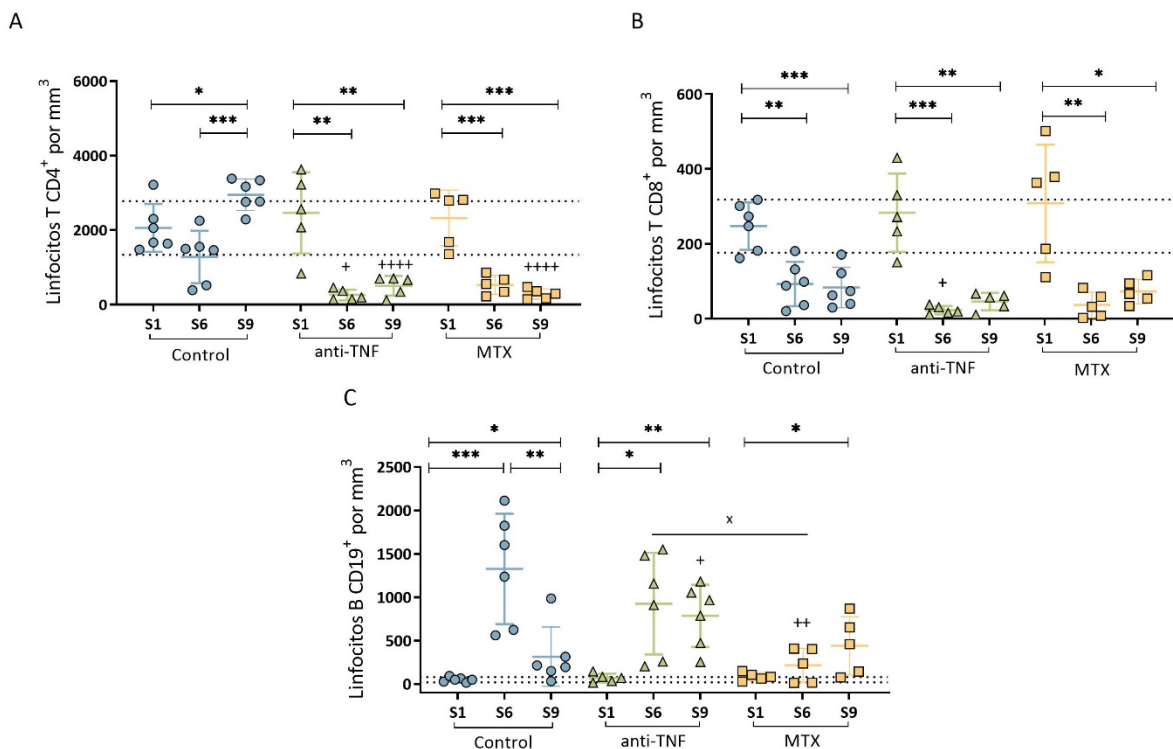
Sin embargo, en los grupos inmunosuprimidos se encontró una reducción estadísticamente significativa ( $p = 0,0021$  en el grupo anti-TNF y  $p = 0,0010$  en el grupo MTX) en la semana 6 post-infección del número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, quedando por debajo de los límites de normalidad. A diferencia de lo que ocurre en el grupo control, en los animales inmunosuprimidos los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en sangre no se recuperaron tras el tratamiento con antimoniales (figura 21 A). Este resultado sugiere que la inmunosupresión farmacológica lleva asociada una ausencia en la restauración de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> circulantes tras el tratamiento con antimoniales y, por lo tanto, hay un menor número de linfocitos necesarios para hacer frente a infecciones intracelulares como la ocasionada por *Leishmania*.

Por otro lado, en todos los grupos experimentales se detectó, en la semana 6 post-infección, una disminución significativa de los niveles de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, llevándolos a niveles inferiores a los de los límites de normalidad ( $247,11 \pm 70,94/\text{mm}^3$ ) (figura 21 B). Cabe destacar que, el recuento celular en el grupo anti-TNF en la semana 6 post-infección fue el menor de todos, con valores de 22,96 linfocitos T CD8<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> que fueron inferiores a los del grupo control no inmunosuprimido ( $p = 0,030$ ). A diferencia de lo que ocurrió con los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, tras el tratamiento con Glucantime® (S9) no se recuperaron los niveles normales de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, sino que permanecieron por debajo de los límites de normalidad en todos los grupos experimentales. Tal y como se observó en la infección aguda, este resultado vendría a indicar que los niveles de linfocitos T CD8<sup>+</sup> disminuyen principalmente debido a la infección por *L. infantum* y presentan una recuperación más lenta. El tratamiento leishmanicida con antimoniales pentavalentes parece influir de forma limitada en el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> circulantes en sangre durante el establecimiento de la fase crónica de la infección por *L. infantum*.

Por último, en la figura 21 C se muestra la evolución de los linfocitos B detectados en sangre a través de su marcador de membrana CD19<sup>+</sup>. En todos los grupos experimentales se observó un incremento significativo de estos valores debido al

desarrollo de la infección, superando los límites de normalidad ( $51,13 \pm 30,70$ ). Además, es importante señalar que el número de células CD19<sup>+</sup> en sangre fue significativamente superior en el grupo inmunosuprimido con anti-TNF con respecto al grupo MTX ( $p = 0,029$ ). Después del tratamiento con Glucantime<sup>®</sup>, se redujo el número de células CD19<sup>+</sup> en sangre solamente en el grupo control. En los grupos inmunosuprimidos, los niveles de células CD19<sup>+</sup> no se redujeron tras el tratamiento con Glucantime<sup>®</sup>. Este resultado podría relacionarse con la mayor carga parasitaria encontrada en el bazo y la médula ósea en los ratones del grupo anti-TNF y, con la mayor presencia de anticuerpos en este grupo en las semanas 6 y 9 post-infección.

Estos resultados parecen indicar que en condiciones de inmunosupresión farmacológica con antagonistas del TNF o metotrexato, y después del tratamiento con antimoniales pentavalentes, las poblaciones de linfocitos en sangre de ratones BALB/c infectados con *L. infantum* varían significativamente con respecto a las de los animales no inmunosuprimidos. En concreto, los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en sangre no recuperan valores normales en los grupos anti-TNF y MTX. El número de linfocitos B no se reduce hasta los límites de normalidad en los grupos inmunosuprimidos, como sí que ocurre en el grupo control.



**Figura 21. Determinación semanal de los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup> en sangre periférica.** Se extrajo sangre de la vena submaxilar de los ratones semanalmente para el análisis de las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (A), T CD8<sup>+</sup> (B) y células CD19<sup>+</sup> (C) circulantes mediante citometría de flujo. Se representan la media y desviación estándar de cada uno de los grupos. Mediante líneas de puntos discontinuas se detallan los límites de normalidad calculados para cada población:  $2.059 \pm 720,18$  T CD4<sup>+</sup> por mm<sup>3</sup> (A);  $247,11 \pm 70,94$  T CD8<sup>+</sup> por mm<sup>3</sup> (B) y  $51,13 \pm 30,70$  CD19<sup>+</sup> por mm<sup>3</sup> (C). Las diferencias estadísticas se calcularon a partir de una prueba t de Student ( $p$  valor < 0,05) y se detallan mediante \* para las diferencias semanales dentro del mismo grupo; con + para aquellas diferencias encontradas con respecto a la misma semana del grupo control y con x para establecer distinciones entre los grupos inmunosuprimidos.

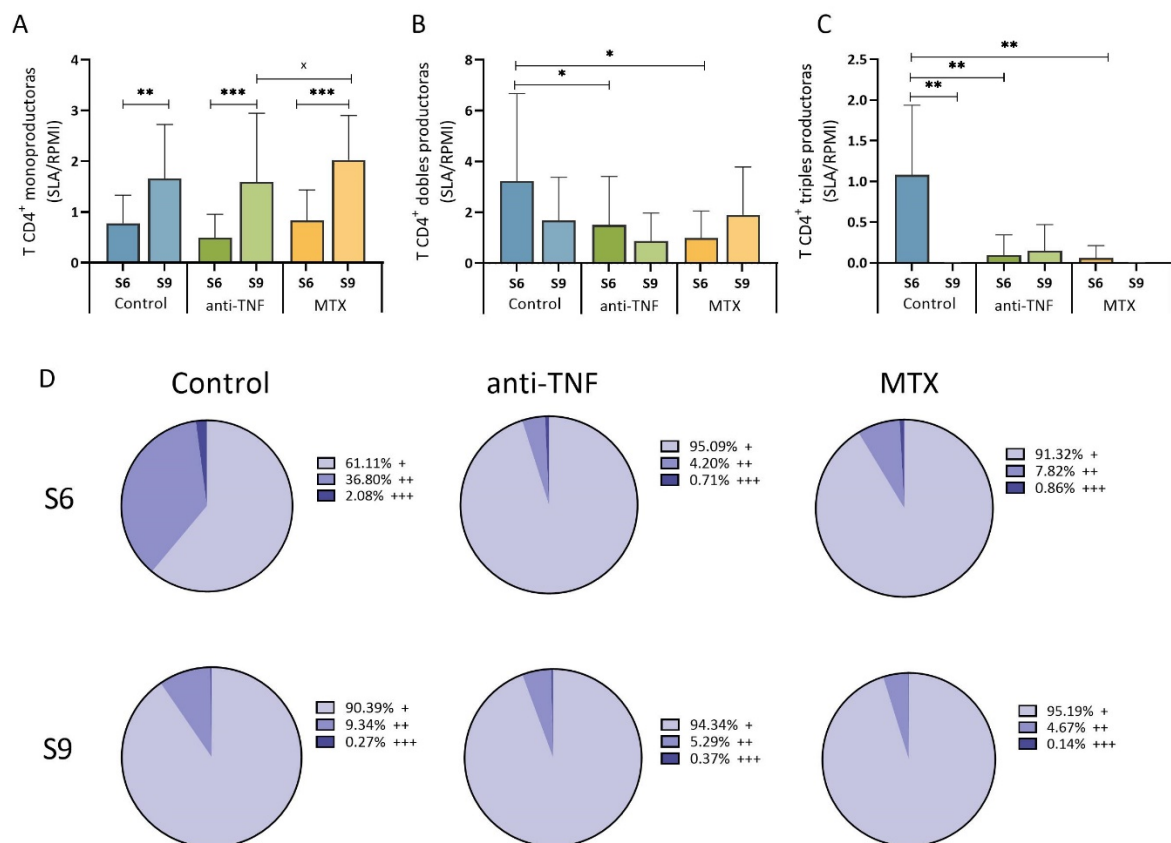
#### III.4. La funcionalidad de los linfocitos T implicados en la respuesta celular tras el tratamiento con antimoniales pentavalentes se ve alterada por la inmunosupresión.

La producción de citoquinas de tipo Th1 es clave para hacer frente a la infección por *Leishmania* y, además, como se ha descrito anteriormente, la expresión de dos o tres de estas citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2) por la misma célula se ha asociado con una respuesta más eficaz contra el parásito y con la resolución de la enfermedad tras el tratamiento. Para conocer si la inmunosupresión farmacológica influye en la respuesta inmunitaria celular generada tras el tratamiento antiparasitario, los esplenocitos de los ratones BALB/c en estudio se estimularon durante 72 h con el antígeno SLA de *L. infantum*. Para establecer el grado de estimulación debido al SLA sobre las condiciones basales, se calculó la proporción SLA (estímulo específico) / RPMI (control negativo).

○ En primer lugar, se determinó la frecuencia de las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de una o varias citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2) de forma simultánea (figura 22). En la semana 6 post-infección la frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> monoproductoras fue similar en todos los grupos experimentales, observándose en todos ellos un aumento significativo al finalizar el tratamiento con Glucantime®. Además, este incremento en S9 fue mayor en el grupo inmunosuprimido con MTX que en el grupo anti-TNF ( $p = 0,048$ ). En cuanto a las células T CD4<sup>+</sup> productoras de dos citoquinas en respuesta al SLA, en la semana 6 post infección los animales inmunosuprimidos con anti-TNF o MTX mostraron un menor porcentaje que el grupo control ( $p = 0,032$  y  $0,018$ , respectivamente). Esta frecuencia de las células dobles productoras no se vio alterada en ninguno de los grupos experimentales por el tratamiento antiparasitario.

Por último, el 2,08 % de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> del grupo control no inmunosuprimido produjeron las tres citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 simultáneamente en respuesta al SLA tras seis semanas de infección (figura 22 C). Esta multiproducción no se observó en los grupos inmunosuprimidos, lo que podría sugerir una respuesta celular de menor calidad en los animales inmunosuprimidos con anti-TNF o MTX. Es interesante destacar que al finalizar el tratamiento con Glucantime<sup>®</sup>, se produjo en el grupo control una disminución significativa ( $p = 0,0061$ ) de las células T CD4<sup>+</sup> triples productoras, de forma que los tres grupos mostraron porcentajes similares de linfocitos T CD4<sup>+</sup> triples productores tras el tratamiento.

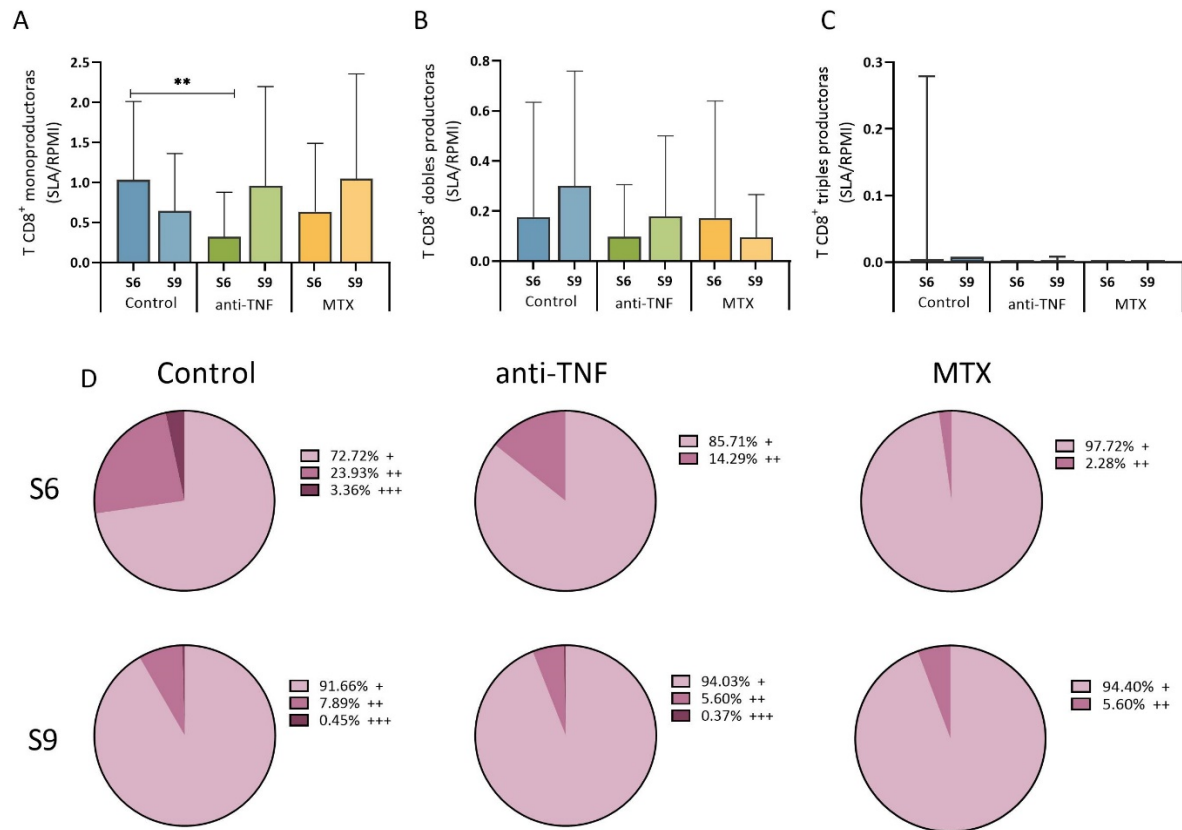
En el anexo III se desglosan las proporciones SLA/RPMI de estos linfocitos productores de cada una de las citoquinas de forma independiente, así como de todas las combinaciones de células dobles productoras.



**Figura 22. Diferencias en la producción de citoquinas inflamatorias por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en ratones inmunosuprimidos farmacológicamente.** Ratones BALB/c inmunosuprimidos e infectados con *L. infantum* fueron eutanasiados antes (S6) y después (S9) del tratamiento con Glucantime<sup>®</sup>. Los esplenocitos obtenidos en ambas situaciones fueron estimulados durante 72

h con el SLA de *L. infantum* para determinar por citometría de flujo la producción individual o combinada de las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La estrategia de análisis booleano permitió definir las poblaciones celulares multiproductoras de estas citoquinas. Se representan las proporciones SLA/RPMI de la agrupación de células monoproductoras (A), dobles (B) o triples productoras (C). Además, en (D) se detallan los porcentajes totales de estas células tanto en S6 como en S9. Las diferencias estadísticas encontradas se determinaron mediante un test Mann-Whitney ( $p$  valor < 0,05).

- En segundo lugar, se realizó un análisis booleano para caracterizar a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 tanto de forma individual como combinada (figura 23). En la semana 6 post-infección la frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> monoproductoras en el grupo inmunosuprimido con anti-TNF fue estadísticamente inferior a la del grupo control ( $p$  valor 0,0023). Además, en este momento, el grupo control fue el único que presentó, con un 3,36 %, linfocitos T CD8<sup>+</sup> triples productores. Además, tras el tratamiento (S9), no se apreciaron diferencias significativas en las células T CD8<sup>+</sup> multiproductoras entre la semana 6 y 9 post-infección, en ninguno de los grupos experimentales. Estos resultados de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> indican una respuesta menos multifuncional tras la estimulación de los esplenocitos con antígenos de *Leishmania* después de finalizar el tratamiento con Glucantime® en los animales inmunosuprimidos con anti-TNF o MTX, con respecto al grupo control.



**Figura 23. Diferencias en la producción de citoquinas inflamatorias por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en ratones inmunosuprimidos farmacológicamente.** Tras la estimulación de los esplenocitos de los animales durante 72 h con el SLA de *L. infantum*, se analizó mediante citometría de flujo y un análisis booleano, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 de forma independiente o en combinaciones de dos o tres de ellas. Los resultados se representan como la media y desviación estándar de la ratio SLA/RPMI para las células monoproductoras (A), dobles productoras (B) o triples productoras (C). Las diferencias estadísticas entre grupos se determinaron a través de un test no paramétrico de Mann-Whitney. \*\*  $p < 0,01$ . En (D) se detallan los porcentajes totales de estas células tanto en S6 como en S9.

○ De forma independiente, para conocer la capacidad de las citoquinas secretadas al medio de forma temprana se estimularon los esplenocitos de forma no específica con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28. Mediante el kit comercial CBA Th1/Th2/Th17 se determinó la concentración de citoquinas en el sobrenadante, observándose diferencias significativas entre los grupos inmunosuprimidos y el grupo control (figura 24).

Es de destacar que en el grupo anti-TNF, después del tratamiento con Glucantime®, la estimulación no provocó la secreción de ninguna de las citoquinas pro-inflamatorias, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2. Esto supone la ausencia de una respuesta Th1 tras el

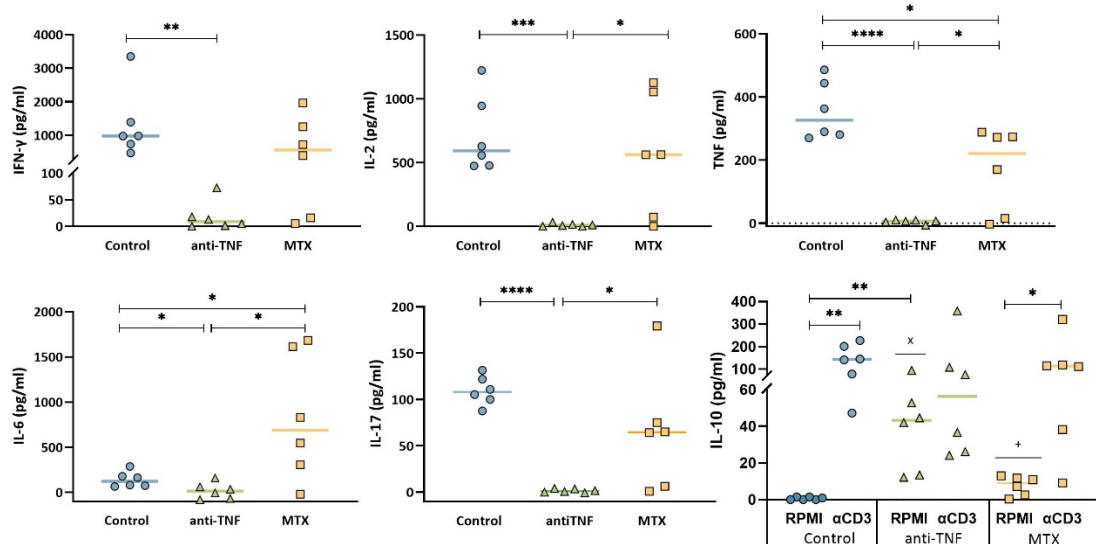
tratamiento en caso de inmunosupresión con anti-TNF. Además, este grupo presentó las menores concentraciones de la citoquina IL-17, las cuales fueron inferiores a las del grupo control ( $p < 0,0001$ ) y a las del grupo MTX ( $p = 0,036$ ). La citoquina IL-17 desempeña un papel importante en el reclutamiento de neutrófilos y actúa sinérgicamente con el IFN- $\gamma$  (Jawed *et al.* 2019). Cabe recordar que este grupo anti-TNF presentaba las mayores cargas parasitarias, así como el mayor título de anticuerpos específicos IgG, lo que podría indicar que la inmunosupresión con anti-TNF genera una disminución de la respuesta inmunitaria, que no se ve recuperada al finalizar el tratamiento leishmanicida.

Por otro lado, en el grupo inmunosuprimido con MTX se observaron concentraciones similares al control de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$  e IL-2, al finalizar el tratamiento antiparasitario. En relación con la citoquina TNF, en este grupo se produjo una disminución estadísticamente significativa con respecto al grupo control ( $p = 0,026$ ). En lo referente a las citoquinas con perfil Th2, el grupo MTX presentó los mayores niveles de IL-6, superiores a los del control ( $p = 0,037$ ) y a los del grupo anti-TNF ( $p = 0,018$ ). La disminución de la concentración de la citoquina pro-inflamatoria TNF, así como el aumento de citoquinas con potencial anti-inflamatorio, como la IL-6, podrían dificultar el tratamiento de la leishmaniasis visceral con antimoniales pentavalentes en condiciones de inmunosupresión con MTX.

Finalmente, en lo que respecta a la IL-10, principal citoquina relacionada con el fenotipo Th2 de susceptibilidad, a pesar del incremento observado en todos los grupos al realizar la estimulación, los niveles basales (RPMI) en el grupo anti-TNF (43,32 pg/ml) fueron superiores a los otros grupos ( $p = 0,0022$  con el grupo control y  $p = 0,017$  con el grupo MTX). La existencia de niveles basales de esta citoquina sugiere que la propia inmunosupresión con antagonistas del TNF supone un incremento de esta citoquina IL-10, lo que conllevará una disminución de la respuesta inflamatoria necesaria para hacer frente a infecciones intracelulares como la leishmaniasis.

Los resultados relativos a la producción de citoquinas pro-inflamatorias por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> sugieren una menor respuesta inmunitaria tras el tratamiento

con Glucantime® en situaciones de inmunosupresión farmacológica, especialmente en el caso de la inmunosupresión con antagonistas del TNF.



**Figura 24. Producción de citoquinas en el bazo de ratones inmunosuprimidos y tratados con Glucantime®.** Ratones BALB/c fueron inmunosuprimidos y, posteriormente infectados con promastigotes de *L. infantum*. Tras seis semanas de infección, se procedió al tratamiento de los mismos con Glucantime® hasta alcanzar la semana 9 post infección. En este momento el bazo de los ratones fue procesado y los esplenocitos resultantes estimulados con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 durante 24 h. Pasado este tiempo, los sobrenadantes fueron recolectados para evaluar la cantidad de citoquinas secretada mediante el kit comercial CBA Th1/Th2/Th17 de BD. Los resultados corresponden a la diferencia entre el estímulo y el medio sin estimular (RPMI), mostrándose los valores individuales para cada ratón, así como la media del grupo. En el caso de la IL-10 se representan los valores brutos sin sustracción previa. Las diferencias estadísticas se realizaron mediante una prueba Mann-Whitney ( $p$  valor < 0,05). Se señalan con x las diferencias entre los grupos inmunosuprimidos y con + las referidas a la misma condición del grupo control.

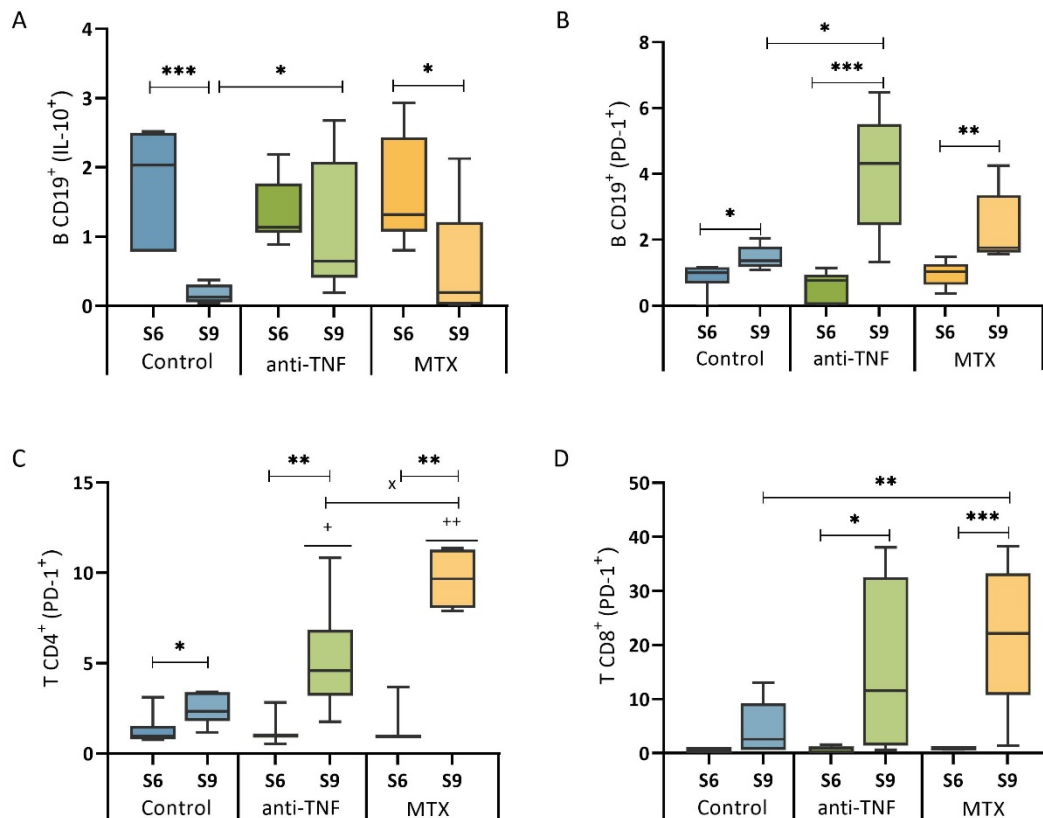
### III.5. La inmunosupresión farmacológica conduce a un incremento del agotamiento celular al finalizar el tratamiento antiparasitario.

Para concluir con el estudio de la respuesta inmunitaria celular antes y después del tratamiento con antimoniales pentavalentes, se analizaron mediante citometría de flujo las poblaciones de linfocitos B CD19<sup>+</sup> productores de IL-10 así como el marcador de agotamiento celular PD-1 producido por estos y por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (figura 25). Tanto la citoquina IL-10 como el marcador de agotamiento celular PD-1 son

característicos del fenotipo Th2 de susceptibilidad a la infección y, por lo tanto, su incremento se relaciona con una leishmaniasis visceral más grave. Para su análisis, los esplenocitos de los ratones se estimularon durante 72 h con el SLA de *L. infantum* y se calculó la proporción SLA/RPMI para ver la intensidad de la respuesta frente al antígeno.

En lo referente a las células B, se observó una reducción en la producción de IL-10<sup>+</sup> al finalizar el tratamiento de la enfermedad con Glucantime® en todos los grupos experimentales (figura 25 A). Sin embargo, hay que destacar que esta disminución en la frecuencia de células B productoras de IL-10<sup>+</sup> solamente fue estadísticamente significativa en el caso del grupo control ( $p = 0,0006$ ) y del grupo MTX ( $p = 0,036$ ). El grupo anti-TNF, al contrario, presentó en la semana 9 post-infección una mayor frecuencia de linfocitos B IL-10<sup>+</sup> tras la estimulación con el SLA que el grupo control ( $p = 0,041$ ). Además, las células B del grupo anti-TNF también fueron las que más expresaron el marcador de agotamiento celular PD-1<sup>+</sup> al finalizar el tratamiento, superior al grupo control ( $p = 0,015$ ) (figura 25 B). Por tanto, los resultados indican que la inmunosupresión con antagonistas del TNF incrementa estos marcadores relacionados con el fenotipo Th2, disminuyendo la capacidad de desarrollar respuestas eficaces contra el parásito después del tratamiento de la leishmaniasis visceral con antimoniales pentavalentes.

Por otro lado, tal como se ha descrito anteriormente, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> producen PD-1<sup>+</sup> en situaciones de anergia celular. Como se puede observar en las figuras 25 C y D, los mayores valores de PD-1<sup>+</sup> producidos por estas células tras el tratamiento con Glucantime® corresponden a los grupos inmunosuprimidos. Esta característica de los linfocitos T, junto con las menores frecuencias de células productoras de citoquinas pro-inflamatorias, sugieren la existencia de una menor eficacia del tratamiento con Glucantime® en la recuperación de la respuesta inmunitaria celular, tras la infección con *L. infantum*, en animales bajo inmunosupresión farmacológica. Esta situación se relacionaría con una menor capacidad para hacer frente a una nueva infección o potencial recaída en el tiempo en los grupos inmunosuprimidos farmacológicamente.



**Figura 25. Determinación de IL-10<sup>+</sup> y PD-1<sup>+</sup> por los linfocitos CD19<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>.** Al estimular los esplenocitos de los ratones durante 72 h con el SLA de *L. infantum*, se analizó mediante citometría de flujo la frecuencia de células CD19<sup>+</sup> productoras de IL-10<sup>+</sup> (A), así como de la producción del marcador de agotamiento celular PD-1<sup>+</sup> por los linfocitos CD19<sup>+</sup> (B), T CD4<sup>+</sup> (C) y T CD8<sup>+</sup> (D). Los resultados corresponden a la ratio SLA/RPMI y se representan mediante un diagrama de cajas y bigotes en el que se detalla la mediana y el rango intercuartílico. Para establecer diferencias significativas se realizó una prueba t de Student (*p* valor < 0,05). Las diferencias entre los grupos inmunosuprimidos se marcan con el símbolo x y aquellas encontradas con respecto al grupo control con el símbolo +.

### III.6. Las poblaciones de células dendríticas tras el tratamiento con antimoniales pentavalentes se alteran en condiciones de inmunosupresión farmacológica.

Las células dendríticas presentan un papel clave en la organización de la respuesta inmunitaria frente a la infección por *Leishmania* (Feijoo *et al* 2016). Por este motivo, es importante determinar si la inmunosupresión con antagonistas del TNF o metotrexato puede influir en la frecuencia de las distintas poblaciones de células dendríticas en el bazo de ratones BALB/c durante la infección con *L. infantum* y después del tratamiento antiparasitario con Glucantime®.

○ Por un lado, se caracterizaron las poblaciones de las células dendríticas convencionales (cDCs). Además, se diferenciaron en función de su expresión del marcador CD11b como cDCs CD8<sup>-</sup> asociadas a la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (CD11b<sup>+</sup>, figura 26 A) o como cDCs CD8<sup>+</sup> relacionadas con la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (CD11b<sup>-</sup>, figura 26 B).

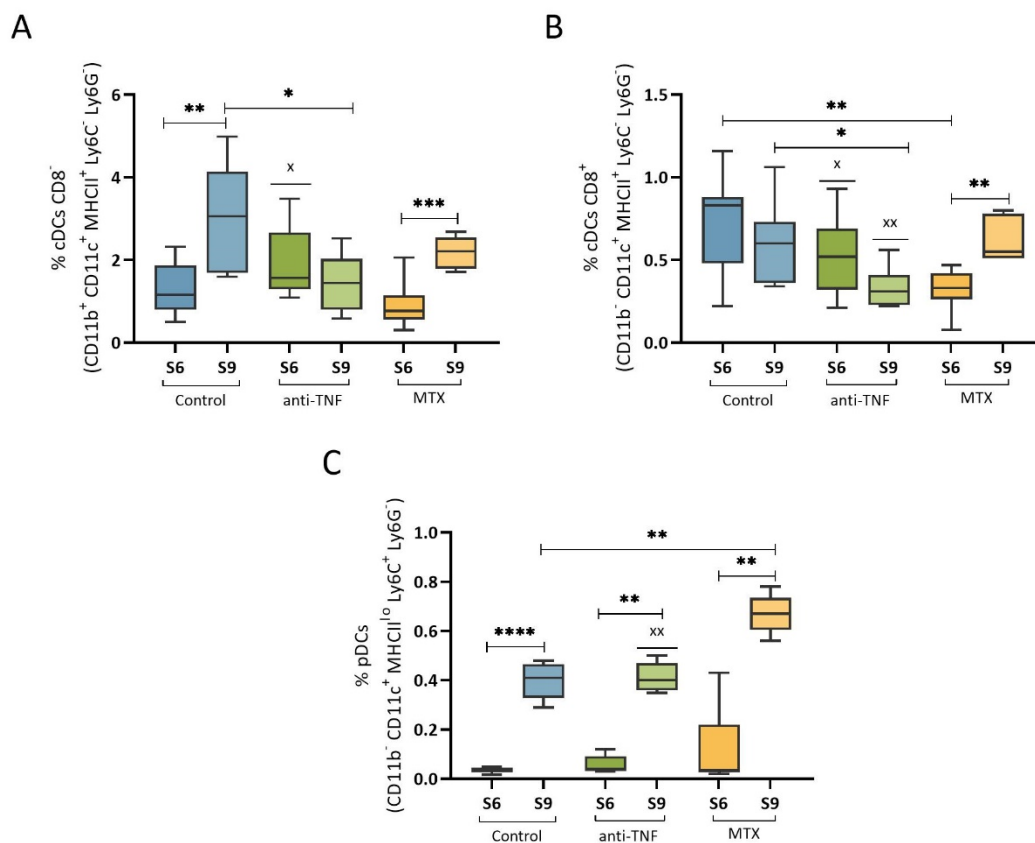
Tras finalizar el tratamiento con Glucantime<sup>®</sup> el porcentaje de células cDCs CD8<sup>-</sup> aumentó de manera estadísticamente significativa ( $p = 0,0052$ ) un 3,06 % en el grupo control y un 2,17 % en el grupo inmunosuprimido con MTX ( $p = 0,0009$ ). Sin embargo, en el grupo inmunosuprimido con anti-TNF no se encontraron diferencias en la frecuencia de cDCs CD8<sup>-</sup> antes y después del tratamiento con Glucantime<sup>®</sup>. De hecho, el porcentaje de cDCs CD8<sup>-</sup> en los esplenocitos del grupo anti-TNF fue inferior a lo observado en el grupo control ( $p = 0,016$ ). Este resultado podría indicar una menor activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en este grupo inmunosuprimido con anti-TNF y, con ello, una menor respuesta celular.

En cuanto a la abundancia relativa de cDCs CD8<sup>+</sup> hay que destacar que fue significativamente menor en el grupo MTX antes del tratamiento con Glucantime<sup>®</sup>, en la semana 6 post-infección, ( $p = 0,0038$ ). Sin embargo, después del tratamiento antiparasitario los animales del grupo MTX experimentaron un aumento significativo ( $p = 0,0017$ ) en el porcentaje de cDCs CD8<sup>+</sup>, hasta alcanzar los mismos valores que el grupo control (0,60 %, figura 26 B). La administración de anti-TNF produjo un efecto distinto al del MTX, observándose después del tratamiento con Glucantime<sup>®</sup> una disminución en la frecuencia de este tipo celular con respecto al grupo control ( $p = 0,033$ ) y al grupo MTX ( $p = 0,0051$ ). De nuevo, en este grupo anti-TNF se observó una menor activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que, podría estar implicada en la generación de una menor respuesta celular frente al parásito.

Por otro lado, se analizó mediante citometría de flujo la población de células dendríticas plasmacitoides (pDCs), productoras de interferones de tipo I (figura 26 C). En todos los grupos experimentales se observó un incremento estadísticamente significativo de estas pDCs tras el tratamiento con Glucantime<sup>®</sup>. Este aumento fue más

notable en el grupo inmunosuprimido con MTX cuya frecuencia fue mayor que la del grupo control ( $p = 0,0043$ ).

Estos resultados sugieren que en el bazo de los ratones BALB/c infectados con *L. infantum* se produce después del tratamiento con antimoniales pentavalentes un aumento, de forma general, de las poblaciones de células dendríticas plasmacitoides y convencionales CD8<sup>-</sup> y CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, la administración continuada de antagonistas del TNF cambia esta situación y conlleva una disminución de los subtipos de células dendríticas convencionales, lo que podría estar asociado con una menor presentación antigénica y activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por estas células dendríticas.



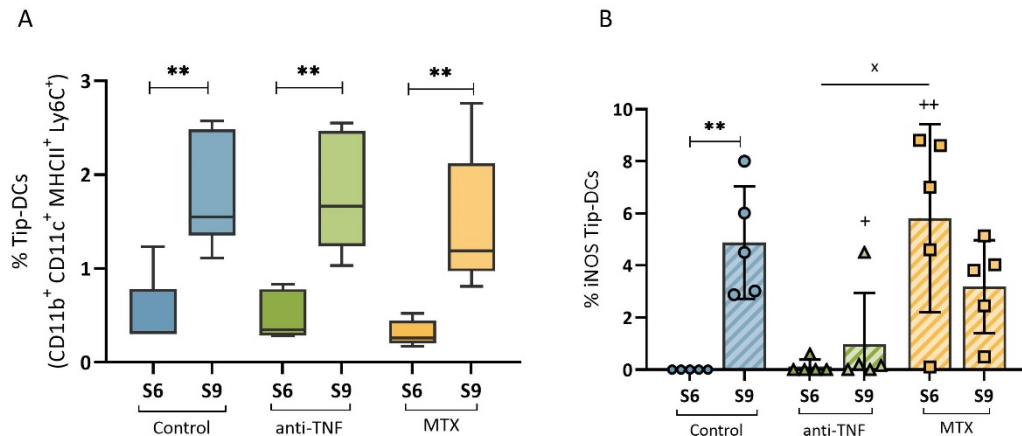
**Figura 26. Evolución de las poblaciones de células dendríticas tras la infección con *L. infantum* en animales inmunosuprimidos y su posterior tratamiento con Glucantime®.** Los esplenocitos de ratones BALB/c inmunosuprimidos con anti-TNF o MTX e infectados con *L. infantum* durante 6 semanas (S6) fueron posteriormente tratados con antimoniales pentavalentes durante 21 días (S9). Los esplenocitos de los animales fueron analizados *ex vivo* para la determinación mediante citometría de flujo de las distintas poblaciones de células dendríticas: células dendríticas convencionales CD8<sup>-</sup> (A) CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> Ly6C<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup>, células dendríticas convencionales CD8<sup>+</sup> (B) CD11b<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> Ly6C<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> y células dendríticas plasmacitoides (C) CD11b<sup>+</sup>

CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>lo</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup>. Los resultados se representan a través de un diagrama de cajas y bigotes en el que se observa la media y el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticas se calcularon realizando una prueba t de Student ( $p$  valor < 0,05). Aquellas diferencias encontradas entre los grupos inmunosuprimidos se detallan con el símbolo <sup>x</sup>.

- Otro tipo de células dendríticas de gran interés en la infección por *Leishmania* son las Tip-dendríticas (Tip-DCs). Estas células se caracterizan por la producción de óxido nítrico (NO), compuesto leishmanicida. Para evaluar, en condiciones de inmunosupresión, su participación en la respuesta celular frente a *Leishmania* tras el tratamiento antiparasitario y su capacidad de producir iNOS, se realizó una tinción celular de los esplenocitos con los anticuerpos anti-CD11b, anti-CD11c, anti-MHCII, anti-Ly6C y anti-iNOS (apartado II.17. de Materiales y Métodos).

Después del tratamiento con Glucantime<sup>®</sup> se observó un aumento significativo en la frecuencia de estas células Tip-DCs en todos los grupos experimentales (figura 27 A). Sin embargo, mientras que en el grupo control el aumento en la frecuencia de esta población después del tratamiento con Glucantime<sup>®</sup> se acompañó de un incremento significativo en la producción de iNOS ( $p = 0,0079$ ), en los animales inmunosuprimidos con anti-TNF estas células dendríticas produjeron menos iNOS ( $p = 0,015$ ) que el grupo control (figura 23 B). Tampoco se observó un aumento en la producción de iNOS en el grupo MTX después del tratamiento antiparasitario con respecto al grupo control.

Por tanto, a pesar de que el tratamiento con antimoniales pentavalentes conduce a un aumento de la frecuencia de las células Tip-DCs en todos los grupos experimentales, la inmunosupresión farmacológica, especialmente con antagonistas del TNF, dificulta la generación de iNOS por este tipo de células y, por lo tanto, la eliminación del parásito. Por el contrario, en el grupo MTX se encontraron los mayores porcentajes de Tip-DCs iNOS<sup>+</sup> antes del tratamiento antiparasitario, lo que podría relacionarse con las menores cargas parasitarias encontradas en ese momento en el bazo de los animales de este grupo.



**Figura 27. Caracterización de células Tip-DCs productoras de óxido nítrico.** Al finalizar el tratamiento con Glucantime®, los esplenocitos de ratones BALB/c inmunosuprimidos e infectados con *L. infantum* fueron estimulados durante 24 h con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28. Mediante citometría de flujo se determinó la frecuencia de células Tip-DCs (A) CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> productoras de iNOS (B). En (A) se representa mediante un diagrama de cajas y bigotes la mediana y el rango intercuartílico de las células Tip dendríticas en la semana 6 (S6) y 9 (S9) post infección. Las diferencias encontradas se analizaron mediante una prueba t de Student. \*\*  $p < 0,01$ . En (B) se muestra la media y desviación estándar de la producción de iNOS asociada a las Tip-DCs de cada uno de los grupos. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante un test Mann-Whitney ( $p$  valor  $< 0,05$ ). Mediante  $\times$  se señalan las diferencias existentes entre los grupos inmunosuprimidos y con  $+$  las diferencias con respecto al grupo control.

Finalmente, los resultados descritos en este tercer apartado indican que, el tratamiento de la leishmaniasis visceral con antimoniales pentavalentes puede ser igualmente eficaz en condiciones de inmunosupresión farmacológica con antagonistas del TNF y metotrexato. No obstante, existen importantes diferencias en la respuesta celular generada tras el tratamiento leishmanicida en estos grupos con respecto al grupo control no inmunosuprimido. Estas diferencias, en general, apuntan hacia una respuesta inmunitaria más limitada, con menor producción de citoquinas pro-inflamatorias y con una mayor expresión de marcadores relacionados con la respuesta Th2 de susceptibilidad a la infección. Esto podría estar relacionado con las recaídas que sufren los pacientes inmunosuprimidos tras la reintroducción del fármaco inmunosupresor.

A modo de resumen de los resultados descritos en esta tesis doctoral se puede establecer que los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX modulan de diferente manera el curso natural de la infección por *L. infantum*. Por un lado, estos

resultados muestran que la inmunosupresión con MTX conduce a un efecto leishmanicida al reducir tanto el número de promastigotes y amastigotes en cultivo como las cargas parasitarias en el bazo de los animales. Sin embargo, este fármaco produciría en las cepas de *L. infantum* una resistencia intrínseca en el parásito que le lleva a responder de forma discreta al tratamiento farmacológico con antimonio. Esta situación lleva a que haya una respuesta inmunitaria más limitada al tratamiento, a pesar de la existencia de una respuesta inmunitaria de tipo Th1/Th2 en este grupo, lo que conduciría a una cura parasitológica no estéril y, por tanto, a un riesgo más elevado de sufrir recaídas de la enfermedad que en pacientes inmunocompetentes.

Por otro lado, la inmunosupresión con anti-TNF incrementa de forma drástica el número de parásitos tanto en cultivo como en el hígado de los modelos experimentales tanto en la fase aguda como en la crónica. Además, en este grupo se observaron las respuestas inmunitarias celulares más limitadas de todos los grupos experimentales, en base a la menor producción de citoquinas pro-inflamatorias. Tras el tratamiento con antimoniales pentavalentes, la ausencia de citoquinas pro-inflamatorias junto con la mayor frecuencia de células productoras de IL-10 y PD-1 en el grupo anti-TNF, condujo a una mayor polarización de las respuestas efectoras hacia el fenotipo Th2 de susceptibilidad a la infección. Por lo tanto, si se evaluaran y compararan estos parámetros en pacientes, se podría relacionar con el mayor riesgo de recaídas que sufren los pacientes inmunosuprimidos con anti-TNF, comparado con la población inmunocompetente general y con los pacientes inmunosuprimidos con MTX.

# DISCUSIÓN

A decorative graphic consisting of several horizontal lines of varying lengths and colors (blue and grey) extending from the left side of the page towards the right, positioned below the title.

La leishmaniasis es una enfermedad global cuya prevalencia e incidencia está afectada por factores ambientales, sociales, económicos y sanitarios que tienen un efecto directo en la distribución y expansión de la infección. El calentamiento global, las migraciones o la pandemia del VIH hacen que la leishmaniasis se expanda globalmente, pero existe la paradoja de que otros factores como la alta frecuencia actual de viajes a zonas endémicas o el desarrollo de la sanidad con fármacos capaces de modular el sistema inmunitario, también promueven el aumento de la incidencia de la leishmaniasis.

### **Nuevos tratamientos que incrementan el riesgo de leishmaniasis.**

El aumento en la práctica clínica actual del uso de fármacos inmunosupresores ha mejorado enormemente las condiciones de vida de los pacientes que presentan enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide o la psoriasis. Estos tratamientos son claramente beneficiosos para el manejo clínico de estas enfermedades, sin embargo, al mismo tiempo conducen al paciente a un estado de inmunosupresión que aumenta el riesgo de enfermedades infecciosas (Keyser 2011; Furst 2010). Se conoce que la inmunosupresión es el principal factor de riesgo individual para desarrollar una leishmaniasis visceral severa y, además, conlleva una menor respuesta al tratamiento farmacológico. Esto supone una limitación importante en el manejo de la práctica clínica de pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral. Aunque la distribución de las enfermedades autoinmunes es global, estas son más frecuentemente diagnosticadas en los países desarrollados y, por tanto, es en estas zonas donde hay un mayor consumo de los tratamientos inmunosupresores (Jorg *et al.* 2016; Lerner *et al.* 2015). De hecho, el 76 % de los casos de leishmaniasis reportados en pacientes bajo inmunosupresión farmacológica ocurren en países europeos endémicos de leishmaniasis, siendo España actualmente el país con mayor prevalencia (Kurizky *et al.* 2020). Por este motivo, la leishmaniasis en pacientes con inmunosupresión farmacológica constituye un problema creciente de salud pública en zonas endémicas de la enfermedad (Kurizky *et al.* 2020).

Entre los fármacos inmunosupresores más recientes y de mayor uso en la actualidad para tratar enfermedades autoinmunes destacan los tratamientos biológicos

---

antagonistas del TNF (anti-TNF) y el tratamiento no biológico metotrexato (MTX) (Xynos *et al.* 2009; Braun 2011). El riesgo de sufrir infecciones intracelulares es dos veces mayor tras la inmunosupresión con anti-TNF que, con MTX, aunque ambos fármacos generan un riesgo de contraerlas mayor que en la población inmunocompetente (Curtis *et al.* 2007). Hay indicios recientes de que los diferentes fármacos inmunosupresores podrían desencadenar una leishmaniasis visceral incluso de manera diferente. Por ejemplo, se ha descrito que el desarrollo de la leishmaniasis en pacientes inmunosuprimidos por anti-TNF aparece de forma más temprana (tras 18 meses de tratamiento) que con el uso de otras terapias inmunosupresoras (entre 60 y 74 meses de terapia) (Xynos *et al.* 2009; Garcia-Vidal *et al.* 2009). Se desconoce si este patrón está relacionado con el tipo de inmunosupresión que generan, ya que presentan diferente mecanismo de acción farmacológica.

La principal acción de los fármacos anti-TNF consiste en bloquear la citoquina TNF, por lo que se disminuyen los mecanismos inflamatorios de las enfermedades autoinmunes, mejorando así la clínica de los pacientes. De este mecanismo de acción se deriva la baja actividad que presentan estos pacientes frente a infecciones intracelulares que requieren para su resolución de una respuesta celular de tipo Th1. Esto es el caso de la leishmaniasis, en la que se conoce que los tratamientos anti-TNF modulan la respuesta inmunitaria hacia un menor control de la infección, permitiendo la multiplicación y diseminación del parásito por el organismo tanto en pacientes como en modelos experimentales (Fromm *et al.* 2016; Bosch-Nicolau *et al.* 2019; Bongartz *et al.* 2006).

Los datos mostrados en esta tesis doctoral señalan que la aplicación directa de inhibidores del TNF sobre el cultivo de macrófagos infectados con *L. infantum*, disminuye drásticamente la acción leishmanicida de estas células. El bloqueo de esta citoquina por el compuesto anti-TNF impide la activación autocrina del macrófago y, por consiguiente, se observó una multiplicación de los amastigotes en el interior de estas células. Estos resultados indican la importancia de esta molécula en la adquisición de la resistencia frente a la infección, ya que su bloqueo condiciona la persistencia de *Leishmania* (Singh *et al.* 2016). Al actuar esta citoquina sobre los macrófagos, el mecanismo de acción del inmunosupresor anti-TNF solamente es efectivo en la forma

amastigote del parásito. Este hecho explica que el cultivo de promastigotes de *L. infantum* no se viese alterado por la presencia del compuesto anti-TNF. De forma excepcional, la última concentración de anti-TNF utilizada en nuestros estudios produjo una disminución en el número de amastigotes por macrófago infectado. Esta disminución no se explica por una reducción del número de amastigotes sino que se debió a la apoptosis de las células del cultivo, inducida por la toxicidad generada por esa concentración del fármaco en los macrófagos.

Se ha descrito que la administración del fármaco MTX produce una supresión de las funciones de la médula ósea por lo que, en consecuencia, se ve disminuida la proliferación de las células efectoras necesarias para la defensa frente a enfermedades oportunistas como la leishmaniasis (Gaies *et al.* 2012; Reina *et al.* 2017; Winthrop 2006). Sin embargo, la acción directa de este fármaco sobre el parásito produce *in vitro* un efecto inhibitorio del crecimiento de *Leishmania* tanto en su forma promastigote como en la amastigote. Esto podría estar relacionado con la reducción de los niveles de folatos y pteridinas, necesarios para el crecimiento de *Leishmania*, mediante la inhibición de las enzimas DHFR y PTR1 (Ouellette *et al.* 2002; Vickers and Beverley 2011). Los folatos, además de ser cofactores necesarios para el correcto desarrollo de *Leishmania*, protegen al parásito del daño oxidativo (Bhattacharya *et al.* 2021; Moreira *et al.* 2009). Al bloquear la acción de estas enzimas, el MTX interfiere en la síntesis del ADN de *Leishmania*, lo que explica la inhibición del crecimiento del parásito. Además, aumenta el daño oxidativo en el mismo, tal y como se ha demostrado en los resultados que describen el incremento de ROS asociado al cultivo de promastigotes con MTX. Por lo tanto, la intensificación de estas especies reactivas de oxígeno, como consecuencia de la acción del MTX sobre el parásito, desencadena un estado apoptótico que se traduce en la reducción del número de parásitos viables.

### **Mecanismos celulares asociados a la leishmaniasis visceral en condiciones de inmunosupresión.**

Dado el mayor riesgo de leishmaniasis visceral en pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente, existe la necesidad real de conocer los mecanismos implicados en

---

el desarrollo de la leishmaniasis visceral producida por *L. infantum* tras la administración de los inmunosupresores anti-TNF o MTX a las dosis usadas en la práctica clínica.

Los resultados obtenidos en el modelo de infección *in vivo* mostraron que los tratamientos inmunosupresores anti-TNF y MTX modulan el curso de la leishmaniasis visceral, alterando la carga parasitaria y la respuesta inmunitaria generada, cuando se compara con los animales no inmunosuprimidos. La administración continuada de anti-TNF produjo un incremento del número de parásitos en hígado durante la fase aguda de la infección. Como se conoce, el hígado es el órgano que experimenta las mayores cargas parasitarias en las primeras semanas de desarrollo de la leishmaniasis visceral en el modelo ratón, aunque posteriormente, este órgano es capaz de resolver la infección de forma espontánea, sin generar daño tisular (Engwerda *et al.* 2004; Stanley *et al.* 2007). En ausencia del gen que codifica para la citoquina TNF, ratones TNF<sup>-/-</sup> mostraron que se produce una rápida diseminación de los parásitos por el organismo, lo que desemboca en una necrosis hepática generalizada (Kaye *et al.* 2004; Wilhelm *et al.* 2001; Murray, Jungbluth, *et al.* 2000). En consecuencia, en la resolución de la infección hepática el papel del TNF es primordial ya que está implicado en la formación activa de granulomas, capaces de controlar la infección visceral (Loria-Cervera and Andrade-Narvaez 2014; Manna *et al.* 2010). Esto estaría relacionado con nuestros hallazgos en los que la mayor carga parasitaria observada en el hígado fue en los ratones del grupo anti-TNF. De forma contraria, los ratones del grupo MTX mostraron unas cargas parasitarias en hígado similares a las del grupo control. Sorprendentemente, en este momento de la infección aguda, las cargas parasitarias en el bazo de estos animales inmunosuprimidos con MTX fueron las menores encontradas. La acción leishmanicida del fármaco MTX *in vivo* podría estar relacionada con estas cargas parasitarias más reducidas.

La mayor severidad de la infección observada en las primeras semanas de desarrollo de la leishmaniasis visceral en el grupo anti-TNF se refleja, además, en el incremento pronunciado de anticuerpos específicos frente al parásito en este grupo. Conforme avanzó la infección visceral hacia el estado crónico, el subtipo de anticuerpos IgG1 fue el predominante en el grupo anti-TNF. Este subtipo IgG1 se relaciona con una respuesta celular Th2 y, por lo tanto, con una leishmaniasis visceral más grave. Como se conoce, la hipergammaglobulinemia es un signo característico de leishmaniasis visceral

severa, tanto en pacientes como en modelos animales (Miles *et al.* 2005; Perez-Cabezas *et al.* 2019).

La inmunosupresión producida tanto por los compuestos anti-TNF como por el fármaco MTX impide la diferenciación y proliferación de las células efectoras, lo que se traduce en una leucopenia característica de los pacientes inmunosuprimidos (Azevedo *et al.* 2012; Winthrop 2006). Tal y como se muestra en nuestros resultados, el número de linfocitos circulantes se reduce drásticamente en los ratones de los grupos inmunosuprimidos. Esta reducción linfocitaria observada en las primeras semanas de infección podría dificultar la eliminación del parásito, ya que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son esenciales para hacer frente a la infección por *Leishmania*.

La respuesta inmunitaria celular de tipo Th1 es clave para resolver eficazmente la infección por *Leishmania*. La presencia de linfocitos productores de las tres citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 al mismo tiempo, está relacionada con una respuesta inmunitaria más eficaz y duradera frente a la infección por *Leishmania* (Seder *et al.* 2008). Se ha confirmado que las vacunas efectivas contra el parásito son aquellas capaces de inducir la generación de estos linfocitos triples productores de citoquinas pro-inflamatorias (Sanchez-Sampedro *et al.* 2012; Macedo *et al.* 2012). Se podría pensar que la disminución en el número de linfocitos circulantes en los grupos inmunosuprimidos podría conllevar la generación de una respuesta inmunitaria más limitada. Sin embargo, el grupo MTX presentó el mayor número de linfocitos T multiproductores de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2. Esta respuesta celular de mayor intensidad en el grupo MTX podría relacionarse con la acción leishmanicida del fármaco. De hecho, los ratones de este grupo mostraron las menores cargas parasitarias en las primeras semanas de infección, así como la menor producción de anticuerpos. Esta sería la primera vez que la acción leishmanicida del MTX ha sido demostrada *in vivo* en un modelo de infección experimental.

En cambio, en el grupo anti-TNF se observó la ausencia tanto de linfocitos triples productores, como en la producción de IFN- $\gamma$ , lo que se relaciona con una respuesta celular más limitada, cuando se compara tanto con el grupo MTX como con el grupo no inmunosuprimido. Se ha descrito que, en su proceso de diferenciación hacia células de

---

memoria, los linfocitos multiproductores de citoquinas desembocan en células productoras de IFN- $\gamma$ , las cuales son consideradas como células efectoras terminales, responsables de una rápida respuesta frente a un segundo contacto con el antígeno (Rodrigues *et al.* 2021). Cuando incrementa la frecuencia de estos linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  en reinfecciones o recaídas, las respuestas celulares frente a la leishmaniasis visceral son más efectivas (Rodrigues *et al.* 2016; Singh and Sundar 2018).

La efectividad de una respuesta protectora de tipo Th1 se ve comprometida por el aumento de respuestas celulares con perfil Th2 de susceptibilidad a la infección por *Leishmania* y por la presencia de un mayor número de células T reguladoras (Treg). Estas células Treg favorecen la persistencia del parásito ya que se ha visto que, en infecciones activas, producen IL-10 (Yasmin *et al.* 2022). En este trabajo hemos encontrado la existencia de una mayor frecuencia de células Treg en los grupos inmunosuprimidos anti-TNF y MTX, lo que podría influir en las respuestas celulares descritas previamente en estos animales. La supresión de las funciones efectoras Th1 de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por las células Treg ha sido demostrada previamente tanto en modelos experimentales como en pacientes (Rodrigues *et al.* 2021; Diehl *et al.* 2017). Esto es debido a que se ha reportado que estas células permanecen en órganos viscerales como la médula ósea incluso después de la finalización del tratamiento de la leishmaniasis (Rai *et al.* 2012; Kumar *et al.* 2018), favoreciendo la persistencia del parásito. Por lo tanto, la mayor presencia de estas Treg productoras de IL-10 en los grupos inmunosuprimidos farmacológicamente podría influir en la generación de una respuesta de memoria poco eficaz.

De igual modo, el aumento de la expresión del marcador de agotamiento celular PD-1 en los linfocitos se asocia con una respuesta Th2 de susceptibilidad a la infección por *Leishmania*. Este marcador suprime la respuesta celular inhibiendo la proliferación de los linfocitos T y aumentando la expansión de las células Treg (Jafarzadeh *et al.* 2022). El incremento en la expresión de este marcador por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de los grupos MTX y anti-TNF, respectivamente, se relaciona con una mayor gravedad de la infección. En el grupo anti-TNF, este hecho, junto con las menores frecuencias de citoquinas pro-inflamatorias y el aumento en la producción de células Treg, podría agravar aún más la situación, favoreciendo la diseminación del parásito por el

organismo. De hecho, es este grupo el que presentó las mayores cargas parasitarias y el mayor título de anticuerpos IgG1.

Si trasladamos el conjunto de los resultados obtenidos a pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral, se podría explicar la recuperación más lenta desarrollada tras el tratamiento, así como las frecuentes recaídas en estos pacientes. En la literatura se ha descrito que en pacientes con una leishmaniasis visceral crónica se produce un incremento en la expresión de este marcador de agotamiento celular PD-1 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Garcia de Moura *et al.* 2021; Esch *et al.* 2013). Esto podría suponer una polarización hacia las respuestas Th2 en pacientes bajo terapia farmacológica inmunosupresora que desarrollen una leishmaniasis visceral. Por todo ello, sería interesante estudiar en los pacientes bajo terapia farmacológica inmunosupresora estos marcadores (PD-1, células Treg e IL-10) relacionados con la respuesta Th2, así como la multifuncionalidad celular, con el fin de establecer la capacidad de la respuesta específica frente a *Leishmania* y determinar los mecanismos relacionados con el riesgo real de recaídas.

### **Eficacia del tratamiento leishmanicida y generación de resistencias en condiciones de inmunosupresión por fármacos.**

En relación con los anteriores resultados descritos en los que se muestra que los tratamientos inmunosupresores modulan la infección por *L. infantum*, y dado que una respuesta inmunitaria deficiente pone en riesgo la resolución completa de la infección, se planteó el estudio de la influencia de estos inmunosupresores en el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Se ha visto que en pacientes bajo inmunosupresión farmacológica el tratamiento de la enfermedad visceral se complica, ya que, para conseguir un tratamiento eficaz frente a la leishmaniasis, es necesario la retirada del fármaco inmunosupresor durante dicho tratamiento, con el consiguiente riesgo de recaídas tras su reintroducción (Botana *et al.* 2021; Ponte-Sucre *et al.* 2017).

Para realizar el estudio *in vivo* del efecto de la inmunosupresión en el tratamiento de la leishmaniasis visceral se emplearon antimoniales pentavalentes, ya que continúan siendo un tratamiento de primera línea de elección frente a la leishmaniasis visceral. El antimoniato de meglumina (Glucantime®) es el antimonial pentavalente recomendado

---

por la OMS para el tratamiento de todas las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis (Moreira *et al.* 2017). Su mecanismo de acción se basa fundamentalmente en el bloqueo del metabolismo del tiol, al inhibir a la enzima tripanotión reductasa, necesaria para la supervivencia de los tripanosomátidos como *Leishmania* (Wyllie and Fairlamb 2006; Baiocco *et al.* 2009). Esta inhibición enzimática conduce a una alteración del sistema antioxidante del parásito, con el consiguiente aumento de las concentraciones intracelulares de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que, desembocan en un estado apoptótico del parásito y en su eliminación (Moreira *et al.* 2017; Mehta and Shaha 2006).

A pesar de la duración de la terapia y los efectos adversos, los antimoniales han demostrado un 90 % de eficacia (Murray and Delph-Etienne 2000). Esta eficacia, no obstante, se ha reducido en zonas como la India en las que existe un elevado número de resistencias en *L. donovani*, especie causante de la leishmaniasis visceral en la zona (Murray 2001).

Los pacientes inmunosuprimidos, en general, juegan un papel clave en el desarrollo de la resistencia frente a los antimicrobianos (DeNegre *et al.* 2019). De forma particular, los pacientes coinfectados VIH/*Leishmania* constituyen una fuente natural de resistencia a los antimoniales ya que, debido a su baja respuesta inmunitaria celular, responden de forma poco efectiva al tratamiento (Croft *et al.* 2006; Berry *et al.* 2013; de Moura *et al.* 2016). De igual modo, los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente responden en menor medida al tratamiento de la leishmaniasis, por lo que necesitan de tratamientos más largos que la población inmunocompetente general, y similares a los de los pacientes VIH. Esta situación conlleva un contacto más prolongado del parásito con los tratamientos inmunosupresores y con los antimoniales administrados.

La continua administración de terapias inmunosupresoras a las que están sometidos los pacientes, junto con los largos tratamientos y la profilaxis secundaria con antimoniales pentavalentes, hace que los parásitos puedan desarrollar resistencias múltiples frente a estos fármacos. Esta situación reduciría el ya de por sí pequeño abanico de fármacos eficaces disponibles para el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Se conoce que *Leishmania*, además de desarrollar resistencia frente a los antimoniales, es capaz de generar de forma independiente resistencias a MTX (Gazanion

*et al.* 2016; Ubeda *et al.* 2008). No obstante, hay pocos estudios que aborden esta problemática. Por este motivo, en este trabajo se abordó de forma preliminar, el estudio de las resistencias entre ambos fármacos.

Nuestros resultados señalan la existencia de una resistencia cruzada entre MTX y Sb<sup>III</sup> tanto *in vitro* como *in vivo*. En cultivos de promastigotes de *L. infantum* se observó que la preexposición de estos parásitos a cualquiera de los dos compuestos incrementaba la resistencia de *Leishmania* al otro compuesto. Por otro lado, en el modelo *in vivo* estudiado observamos que el tratamiento de los animales con Glucantime<sup>®</sup> redujo significativamente las cargas parasitarias en el hígado, así como el peso del bazo en todos los grupos experimentales, lo que confirma la eficacia del tratamiento (Romero *et al.* 2017). La eficacia del tratamiento leishmanicida se confirma además con la reducción observada en la carga parasitaria del bazo en el grupo control, pero no así en los grupos inmunosuprimidos. En el grupo anti-TNF, las cargas parasitarias del bazo permanecieron constantes antes y después del tratamiento con Glucantime<sup>®</sup>. Por otro lado, el efecto leishmanicida del MTX, observado en las cargas parasitarias más bajas en el bazo de este grupo en la semana 6 post-infección, se altera al finalizar el tratamiento con Glucantime<sup>®</sup>. El mayor número de parásitos totales encontrados en el bazo y la médula ósea de los animales del grupo MTX, así como el peso más elevado del bazo, con respecto al grupo control tras el tratamiento, apoyan la premisa de un menor aclaramiento parasitológico con antimoniales pentavalentes tras la inmunosupresión generada por el fármaco MTX. La menor eficacia del tratamiento con Glucantime<sup>®</sup> en este grupo podría relacionarse con la generación de una resistencia cruzada entre MTX y Sb, ya que se ha descrito que los parásitos resistentes conducen a un aumento de las cargas parasitarias con respecto a los parásitos sensibles al tratamiento (Faraut-Gambarelli *et al.* 1997). Esto es consecuencia de la alta plasticidad que presenta *Leishmania* para responder a la presión farmacológica, lo que le permite adaptarse a las condiciones del medio. En un estudio previo se ha determinado que en cepas de *L. donovani* resistentes al antimonio hay una presencia de 2,7 veces más del gen DHFR en estos parásitos resistentes, cuando se compara con la cepa control (Rastrojo *et al.* 2018). Como ya se ha mencionado, la enzima DHFR es la diana principal del MTX, por lo que el

---

incremento de este gen en cepas resistentes al antimonio apoya nuestros resultados de resistencia cruzada entre ambos fármacos.

La co-existencia de una resistencia intrínseca al MTX en cepas de *Leishmania* resistentes al antimonio, podría explicar tanto la dificultad añadida en el tratamiento como el mayor riesgo de recaídas de la enfermedad visceral que sufren estos pacientes tras la reintroducción del tratamiento inmunosupresor, comparados con la población general inmunocompetente. Para confirmar la repercusión de este hallazgo en la práctica clínica es necesario aislar las cepas de *Leishmania* de pacientes inmunosuprimidos con MTX para determinar su susceptibilidad al fármaco.

#### **Tratamiento con Glucantime® y respuesta inmunitaria.**

La eficacia del Glucantime® para reducir las cargas parasitarias en todos los grupos experimentales viene dado por su mecanismo de acción. Esta reducción en los pacientes no se observa hasta los 40 días posteriores al inicio de las pautas de tratamiento, a diferencia de lo que ocurre con otros fármacos leishmanicidas como la anfotericina B liposomal, en la que estas reducciones ya se empiezan a observar a los 7 días post-tratamiento (Banduwardene *et al.* 1997; Sudarshan *et al.* 2011). No obstante, el tratamiento con antimoniales es capaz de disminuir las cargas parasitarias mientras activa al sistema inmunitario durante un tiempo prolongado, y es capaz de producir respuestas protectoras de tipo Th1 (Murray, Jungbluth, *et al.* 2000). Esta situación hace que el tratamiento de la leishmaniasis visceral con antimoniales resulte eficaz en la cura de entre el 90 y el 95 % de los casos producidos en pacientes inmunocompetentes. No obstante, este tratamiento leishmanicida resulta menos eficaz en pacientes inmunosuprimidos debido a la deficiente respuesta inmunológica que presentan a corto plazo (Murray 2001; Murray and Delph-Etienne 2000).

La leucopenia es un signo característico de la leishmaniasis visceral, por lo que el restablecimiento del número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> es un marcador de recuperación (Kuschnir *et al.* 2021). Uno de los efectos adversos de los tratamientos inmunosupresores es precisamente esta leucopenia, lo que agrava de forma progresiva la enfermedad visceral en estos pacientes (Azevedo *et al.* 2012; Montane *et al.* 2007). En nuestro ensayo en el modelo animal, se observó que el grupo que no estuvo sometido

a ninguna inmunosupresión farmacológica presentó una recuperación clara en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> circulantes en sangre tras el tratamiento con Glucantime<sup>®</sup>, contrariamente a lo que se produjo en los animales inmunosuprimidos con anti-TNF o MTX. Este resultado indica que el grupo control fue el que experimentó una recuperación más temprana de la leishmaniasis visceral tras el tratamiento con antimoniales pentavalentes. En cambio, la no recuperación del número de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, en ninguno de los grupos experimentales tras el tratamiento, incluido el control, está relacionado con la infección visceral y no directamente con la inmunosupresión generada. De hecho, se ha descrito en pacientes tratados con antimoniales pentavalentes, que los niveles de linfocitos T CD8<sup>+</sup> incrementan de forma paulatina hasta 6 meses post-tratamiento (Rodrigues *et al.* 2021; Kuschnir *et al.* 2021).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el tratamiento con antimoniales pentavalentes permite la estimulación progresiva del sistema inmunitario. Se ha visto que el aumento de células multiproductoras de citoquinas pro-inflamatorias, relacionadas con una mejor respuesta efectora frente a la infección por *Leishmania*, empieza a incrementarse 60 días después del inicio del tratamiento, asegurando una inmunidad más duradera en el tiempo (Rodrigues *et al.* 2021). Por este motivo, no es sorprendente que, en este estudio, 21 días después del tratamiento leishmanicida, no se aprecien cambios con respecto a las poblaciones de células triples y dobles productoras. En todos los grupos experimentales aumentó la frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> monoproductores de citoquinas pro-inflamatorias al finalizar el tratamiento de la infección visceral con Glucantime<sup>®</sup>.

Para conocer la capacidad de las células de responder de forma genérica a infecciones intracelulares, los esplenocitos de los animales se estimularon con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28. Se observó una concentración diferente de cada una de las citoquinas pro-inflamatorias en el sobrenadante de los cultivos de los esplenocitos, lo que indicaría que existe una variación en la capacidad del tratamiento de generar una respuesta inmunitaria en los tres grupos de estudio. En el caso de los animales tratados con el inmunosupresor anti-TNF, se observó una ausencia total en la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2. Además, de forma basal, sin estimulación previa, en este grupo se observaron los mayores niveles de la citoquina IL-10, lo que

---

indica que el tratamiento farmacológico con anti-TNF predispone *per se* a una respuesta de tipo Th2. Este resultado indicaría una respuesta inmunológica más debilitada para luchar contra infecciones intracelulares como la leishmaniasis. Se observó, además, en este grupo, la menor producción de la citoquina IL-17. Se ha descrito que esta citoquina está relacionada con una mayor atracción de neutrófilos, capaces de hacer frente a la entrada de promastigotes, y con una rápida recuperación de la infección producida por *L. donovani* (Jawed *et al.* 2019). La reducción de los niveles de esta citoquina IL-17 dificultaría la respuesta temprana frente a nuevas infecciones intracelulares.

Los animales que recibieron inmunosupresión con MTX exhibieron un patrón de comportamiento mixto con respuestas de tipo Th1 y Th2. En este grupo se observaron concentraciones de IFN- $\gamma$  e IL-2 en el sobrenadante similares a las del grupo control, lo que sugiere una adecuada respuesta protectora de tipo Th1. Sin embargo, lo más significativo en este grupo MTX fue el aumento de los niveles de IL-6 con respecto a los otros grupos experimentales, así como un incremento en la citoquina IL-10 tras la reestimulación de los esplenocitos. Además, se observó una disminución de la citoquina pro-inflamatoria TNF en comparación con el grupo no inmunosuprimido. Los cambios observados en la carga parasitaria de los ratones de este grupo podrían asociarse con los altos niveles de IL-6 encontrados. Esta citoquina, entre otras citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10, presenta un papel central en la patogénesis de la leishmaniasis visceral al estar asociada con un amplio rango de manifestaciones clínicas, propias de los pacientes con una enfermedad visceral activa, como son la neutropenia o el daño hepático (Costa *et al.* 2013). Además, está asociada con los casos más severos de leishmaniasis visceral, ya que inhibe la producción de TNF al mismo tiempo que polariza la diferenciación de los linfocitos T CD4 hacia el perfil Th2 con producción de citoquinas anti-inflamatorias (Dos Santos *et al.* 2016; Diehl and Rincon 2002).

Para una caracterización más adecuada de la respuesta inmunitaria es importante estudiar otras células relacionadas con el perfil Th2. Entre estas células se encuentran las células B, las cuales aumentan durante el progreso de la leishmaniasis visceral, incrementando la presencia de anticuerpos y polarizando las respuestas T adaptativas hacia el perfil Th2 de susceptibilidad a la infección (Bankoti *et al.* 2012). El tratamiento realizado con Glucantime® fue capaz de reducir los niveles de estas células

solamente en los animales que no recibieron tratamiento inmunosupresor. Por lo tanto, este grupo inmunocompetente tendría una respuesta inmunitaria más polarizada hacia el fenotipo Th1 de resistencia a la infección y, con ello, sería el grupo que presenta una mayor eficacia frente al tratamiento leishmanicida. De los grupos bajo inmunosupresión farmacológica, los animales del grupo anti-TNF fueron los que presentaron un mayor número de células B tras el tratamiento. Además, estas células B del grupo anti-TNF expresaron las mayores frecuencias de IL-10 y de PD-1 al restimular los esplenocitos con el antígeno SLA de *L. infantum*. El aumento del marcador de agotamiento celular PD-1 de forma específica por las células B contribuye a la producción de anticuerpos y, con ello, al aumento de las cargas parasitarias en el bazo (Jafarzadeh *et al.* 2022). Como se ha comentado antes, este marcador de agotamiento celular es responsable de la supresión de la producción de IFN- $\gamma$ , lo que facilita el progreso de la infección visceral, polarizando aún más las respuestas hacia el fenotipo Th2 de susceptibilidad. Por otro lado, se ha descrito que la producción de la citoquina IL-10 por las células B, estimula a los linfocitos T a producir tanto IL-10 como el marcador de agotamiento celular PD-1 (Silva-Barrios *et al.* 2016; Jafarzadeh *et al.* 2022). Por este motivo, no es sorprendente encontrar en estos resultados un incremento en la expresión de PD-1 tanto por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como por los CD8<sup>+</sup> del grupo anti-TNF. Esta situación indicaría que bajo condiciones de inmunosupresión farmacológica con anti-TNF la estimulación de la respuesta inmunitaria efectiva por el Glucantime<sup>®</sup> se ve reducida considerablemente.

Asimismo, se observó en el grupo MTX un aumento de la expresión de PD-1 por los linfocitos T al finalizar el tratamiento con Glucantime<sup>®</sup>. Este resultado, junto con los otros mecanismos celulares descritos en este grupo, refuerza la existencia de una respuesta inmunitaria mixta de tipo Th1/Th2 en el grupo MTX. La respuesta inmunitaria mixta conduciría a una mayor eficacia del tratamiento antiparasitario que las observadas en el grupo anti-TNF, pero más limitada que las generadas por el grupo control no inmunosuprimido.

Para el mantenimiento de las respuestas efectoras a largo plazo es importante la presencia de células dendríticas, ya que se conoce que estas células juegan un papel en la regulación de las respuestas celulares específicas frente a *Leishmania*, al realizar una presentación antigénica eficaz (Feijo *et al.* 2016). Estudios previos han demostrado que

---

el tratamiento eficiente de pacientes con antimoniales pentavalentes incrementa la frecuencia de células dendríticas ya que estimula la activación de factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B, implicados en la maduración de estas células (Haldar *et al.* 2010; Ouaz *et al.* 2002). Por ese motivo, se evaluaron los cambios producidos en la frecuencia de células dendríticas antes y después del tratamiento con Glucantime®. En el grupo anti-TNF tras el tratamiento con antimoniales no se apreció un cambio en la frecuencia de estas células. No obstante, sí que se observó un incremento en estas células en los otros grupos experimentales. Esto podría estar relacionado con la generación de una respuesta más limitada en el caso de la inmunosupresión producida por el compuesto anti-TNF.

Entre las poblaciones de células dendríticas, las Tip-DCs son responsables de mantener e iniciar las respuestas inflamatorias por medio de la secreción de iNOS, constituyendo una importante defensa frente a la leishmaniasis. Además, se ha visto que también son responsables de las respuestas inflamatorias causantes de las enfermedades autoinmunes como la psoriasis, por lo que son una diana clave de los tratamientos inmunosupresores como el metotrexato (Wilsman-Theis *et al.* 2013). Por este motivo, uno de los mecanismos del MTX consiste en el bloqueo de las Tip-DCs, constituyendo una premisa beneficiosa para los pacientes con enfermedades autoinmunes. Sin embargo, este bloqueo desemboca en una menor respuesta inmunitaria de tipo Th1 necesaria para resolver la infección por *Leishmania*, agravando así la enfermedad en estos pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente. Aunque no hay estudios previos que reporten que los fármacos anti-TNF bloqueen estas células Tip-DCs de la misma forma que el MTX, nuestros resultados en el modelo ratón, muestran que aun incrementándose la frecuencia de Tip-DCs tras el tratamiento con Glucantime®, se observa en los grupos anti-TNF y MTX una reducción en la expresión de iNOS por estas células. Esto, por lo tanto, sugiere una menor polarización hacia el fenotipo Th1 de resistencia a la infección en ambos grupos inmunosuprimidos.

### Repercusión clínica.

Todos los resultados descritos en esta tesis doctoral muestran por primera vez que el uso de tratamientos inmunosupresores, a las dosis clínicas en modelos animales de experimentación, modula el curso de la leishmaniasis visceral y afecta negativamente

a la respuesta inmunitaria generada tras la infección. Aunque estos compuestos anti-TNF y MTX alteran los mecanismos de defensa de diferente manera, en ambas situaciones se produce una mayor polarización hacia el perfil Th2 de susceptibilidad a la infección por *L. infantum* con respecto a una situación de inmunocompetencia. Además, tras el tratamiento de la leishmaniasis visceral con antimoniales pentavalentes se ha demostrado en este trabajo que, a pesar de que se genera una disminución de la carga parasitaria, la respuesta inmunológica generada varía según el compuesto inmunosupresor desde una respuesta mixta Th1/Th2 en el caso del MTX, a una respuesta Th2 en el grupo anti-TNF. Esta situación no solo podría estar relacionada con una enfermedad más grave en pacientes que se encuentren bajo esta terapia inmunosupresora, sino que también podría conllevar a una recuperación clínica más lenta en estos casos.

Es necesario profundizar, por otro lado, en el estudio de las resistencias existentes entre el fármaco inmunosupresor MTX y el tratamiento leishmanicida con antimoniales. El análisis de la existencia de esta resistencia cruzada entre ambos debe ampliarse también a otros fármacos inmunosupresores, así como a otros tratamientos frente al parásito, ya que la existencia actual de escasos fármacos leishmanicidas podría dificultar el tratamiento de estos pacientes en casos de resistencias.

Los resultados descritos en el modelo ratón tienen una importante repercusión ya que pueden trasladarse a la situación clínica que experimentan los pacientes inmunosuprimidos con anti-TNF o MTX. Los pacientes bajo terapia inmunosupresora con fármacos anti-TNF experimentan una leishmaniasis visceral más severa que los inmunocompetentes, no solo por las mayores cargas parasitarias, sino también por la respuesta inmunitaria más limitada que presentan tras la infección. El hecho de que este tratamiento inmunosupresor polarice las respuestas inmunitarias, antes y después del tratamiento de la leishmaniasis visceral, hacia el subtipo Th2 podría explicar esta situación. Además, como se ha descrito anteriormente, las células Treg permanecen tras el tratamiento en la médula ósea de los pacientes, lo que conlleva un incremento de la gravedad clínica al incrementar la expresión de la citoquina IL-10. Del mismo modo, estos pacientes estarían expuestos a un riesgo mayor de experimentar recaídas de la enfermedad al reintroducir el tratamiento inmunosupresor. El hecho de que presenten

---

menores frecuencias de células dendríticas, junto con la polarización de las respuestas celulares al perfil Th2, indicaría una menor actividad defensiva frente al parásito.

Los pacientes inmunosuprimidos con MTX presentan un riesgo de infección severa mayor que el de los inmunocompetentes. A pesar del efecto beneficioso que podría generar en las primeras etapas de desarrollo de la leishmaniasis visceral al presentar una acción leishmanicida, el hecho de que se generen resistencias al mismo, así como las posibles resistencias cruzadas con los antimoniales, dificulta en gran medida el tratamiento de estos pacientes.

Una vez identificados los mecanismos celulares implicados en la menor respuesta inmunitaria frente a la infección por *Leishmania* en casos de inmunosupresión farmacológica inducida, y conociendo el desarrollo de resistencias que pueden producirse en las cepas de estos pacientes, en el futuro se debe prestar especial atención a los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente que viven en zonas endémicas de leishmaniasis. Así mismo, se debe estudiar en estos casos si los mecanismos celulares y los factores implicados en la respuesta inmunitaria más debilitada y en las mayores recaídas que presentan estos pacientes son similares a los descritos en este trabajo de tesis doctoral.

# CONCLUSIONES

---

---

---

---

---

1. La evaluación *in vitro* de la susceptibilidad de los compuestos inmunosupresores ensayados mostró que los promastigotes y amastigotes de *L. infantum* son susceptibles a metotrexato, al inhibir el crecimiento de los parásitos. Por el contrario, el compuesto antagonista del TNF promovió la multiplicación y persistencia de los amastigotes por su efecto inhibitor sobre la actividad leishmanicida del macrófago.
2. El metotrexato produjo un aumento de las especies reactivas de oxígeno en promastigotes de *L. infantum*, mayor incluso que el producido por el antimonio trivalente. El estrés oxidativo generado afectó a la viabilidad de los parásitos al inducir su estado apoptótico y muerte celular.
3. El estudio de los valores de EC<sub>50</sub> del metotrexato y del antimonio en promastigotes de *L. infantum* mostró, por primera vez, que existe resistencia cruzada entre ambos compuestos. Aunque actualmente no constan estudios al respecto en pacientes, este hallazgo es relevante porque explicaría, en parte, la menor eficacia de los tratamientos antimoniales en individuos inmunosuprimidos tratados de forma crónica con metotrexato.
4. Los ensayos realizados en el modelo ratón de leishmaniasis aguda mostraron que la inmunosupresión con antagonistas del TNF condujo a una leishmaniasis visceral severa, con un incremento acentuado de las cargas parasitarias en el hígado, así como del título de anticuerpos totales específicos frente a *Leishmania*. Por el contrario, el metotrexato presentó un efecto leishmanicida significativo sobre *L. infantum* al reducir la carga parasitaria en el bazo.
5. La inmunosupresión farmacológica en el modelo ratón de leishmaniasis aguda produjo un desequilibrio de las respuestas celulares específicas. La administración de antagonistas del TNF generó una respuesta inmunitaria de baja calidad, con una producción limitada de citoquinas pro-inflamatorias y escasa presencia de células multiproductoras. Por otro lado, la respuesta inmunitaria en los ratones tratados con metotrexato fue de mayor calidad, con

- altos niveles de citoquinas Th1 expresadas por células multiproductoras. Además, en ambos grupos se observó una mayor presencia de células T reguladoras y del factor de agotamiento celular PD-1, con respecto al grupo control.
6. Los ensayos realizados en el modelo ratón de leishmaniasis crónica mostraron que el tratamiento de la leishmaniasis visceral con Glucantime® tuvo una eficacia menor en condiciones de inmunosupresión farmacológica. Aunque el metotrexato mostró capacidad leishmanicida durante las primeras semanas de infección, observamos sorprendentemente un aumento de la carga parasitaria en el bazo durante el tratamiento con Glucantime®, lo que podría estar relacionado con la resistencia cruzada demostrada *in vitro*. Al contrario de lo observado en el grupo control, los animales inmunosuprimidos con antagonistas del TNF no mostraron una disminución de la carga parasitaria en el bazo después del tratamiento antiparasitario, lo que cabe asociar con la respuesta inmunitaria específica frente al parásito.
  7. En el modelo de leishmaniasis crónica, el tratamiento leishmanicida no fue capaz de estimular las respuestas protectoras de tipo Th1 en los animales inmunosuprimidos, sino que aumentó la expresión de moléculas con perfil Th2 como la citoquina IL-10 y el factor de agotamiento celular PD-1, al contrario de lo observado en el grupo control. Además, los ratones del grupo tratado con antagonistas del TNF presentaron bajas frecuencias de células dendríticas convencionales y una menor producción de iNOS por las células Tip-DCs.
  8. Este trabajo ha demostrado que la inmunosupresión con metotrexato y antagonistas del TNF modula de forma diferente el curso natural de la leishmaniasis visceral, alterando la respuesta inmunitaria y la respuesta al tratamiento farmacológico. Ambos factores pueden tener repercusión directa en la práctica clínica de la leishmaniasis visceral en pacientes inmunosuprimidos, ya que nos ayudan a entender las causas de la mayor severidad y riesgo de recaídas que se han observado en estos casos.

1. During the *in vitro* susceptibility assessment of the immunosuppressive compounds, *L. infantum* promastigotes and amastigotes were found to be susceptible to methotrexate, due to its ability to inhibit the parasite's growth. Contrary to this, the anti-TNF compound acted as an inhibitor of macrophage leishmanicidal activity, allowing amastigotes to multiply and persist.
2. Methotrexate induced an increase in the production of reactive oxygen species in *L. infantum* promastigotes, even greater than that produced by trivalent antimony. The oxidative stress generated affected parasite's viability by inducing their apoptotic state and cell death.
3. The study of the EC<sub>50</sub> values of methotrexate and antimony in *L. infantum* promastigotes showed, for the first time, that there is a cross-resistance between them. Although there are currently no studies on patients in this regard, this finding is relevant because it would partially explain why antimonial therapy is less effective in chronically immunosuppressed individuals undergoing methotrexate treatment.
4. Our studies conducted in the mouse model of acute leishmaniasis showed that immunosuppression with TNF antagonists led to a severe visceral leishmaniasis, characterized by a marked increase in the liver parasite load as well as in the titre of total *Leishmania*-specific antibodies. On the other hand, methotrexate had a significant leishmanicidal effect on *L. infantum* by reducing the spleen parasite load.
5. Pharmacological immunosuppression carried out in a mouse model of acute leishmaniasis produced an imbalance in the specific cellular responses. TNF antagonist administration generated a low-quality immune response, with limited production of pro-inflammatory cytokines and lower presence of multiproducer cells. MTX-treated animals, however, displayed a higher quality immune response, characterized by the expression of high levels of Th1-type cytokines by multiproducer cells. Furthermore, both immunosuppressed groups

- exhibited a higher presence of T regulatory cells and the cell exhaustion marker PD-1, when compared to the control group.
6. According to the studies performed in the mouse model of chronic leishmaniasis, Glucantime® treatment exhibited a reduced efficacy under pharmacological immunosuppressive conditions. Although methotrexate had a leishmanicidal activity during the first weeks of infection, we surprisingly observed an increase in the parasite load of the spleen during Glucantime® treatment, which could be related with the cross-resistance demonstrated *in vitro*. Contrary to what was observed in the control group, TNF antagonist-treated mice did not show a reduction in the spleen parasite load after Glucantime® treatment, which can be associated with the specific immune response against *Leishmania*.
  7. As observed in the chronic leishmaniasis model, leishmanicidal treatment did not stimulate Th1-type protective immune responses in the immunosuppressed groups, but rather increased the expression of Th2-type molecules such as IL-10 cytokine and cell exhaustion marker PD-1, in contrast to what was observed in the control group. Moreover, TNF antagonist-treated mice showed low frequencies of conventional dendritic cells and a lower iNOS production by Tip-DCs.
  8. This work had shown that immunosuppression with methotrexate and TNF antagonist modulates the natural course of visceral leishmaniasis in a different way, by altering the immune response and treatment response. Both of these factors may have a direct impact on the clinical practise of visceral leishmaniasis in immunosuppressed patients, since they provide insight into the causes of greater severity and the higher relapse risk associated with these cases.

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

---

- Abadias-Granado**, I., Diago, A., Cerro, P. A., Palma-Ruiz, A. M. and Gilaberte, Y. 2021. 'Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis', *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*.
- Adriaensen**, W., Dorlo, T. P. C., Vanham, G., Kestens, L., Kaye, P. M. and van Griensven, J. 2017. 'Immunomodulatory Therapy of Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients', *Front Immunol*, 8: 1943.
- Akuffo**, H., Costa, C., van Griensven, J., Burza, S., Moreno, J. and Herrero, M. 2018. 'New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed', *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12: e0006375.
- Al-Salem**, W., Herricks, J. R. and Hotez, P. J. 2016. 'A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries', *Parasit Vectors*, 9: 460.
- Alexander**, J. and Brombacher, F. 2012. 'T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to leishmania infection: is this paradigm still relevant?', *Front Immunol*, 3: 80.
- Alvar**, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R. and Moreno, J. 2008. 'The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years', *Clin Microbiol Rev*, 21: 334-59, table of contents.
- Alvar**, J., den Boer, M. and Dagne, D. A. 2021. 'Towards the elimination of visceral leishmaniasis as a public health problem in east Africa: reflections on an enhanced control strategy and a call for action', *Lancet Glob Health*, 9: e1763-e69.
- Andreani**, G., Lodge, R., Richard, D. and Tremblay, M. J. 2012. 'Mechanisms of interaction between protozoan parasites and HIV', *Curr Opin HIV AIDS*, 7: 276-82.
- Antinori**, S., Cascio, A., Parravicini, C., Bianchi, R. and Corbellino, M. 2008. 'Leishmaniasis among organ transplant recipients', *Lancet Infect Dis*, 8: 191-9.
- Antinori**, S., Schifanella, L. and Corbellino, M. 2012. 'Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31: 109-18.
- Arce**, A., Estirado, A., Ordoñas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez, A. M., Pérez, A. M., Aránguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J. and Vilas, F. 2013. 'Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012', *Eurosurveillance*, 18: 20546.
- Atia**, A. M., Mumina, A., Tayler-Smith, K., Boule, P., Alcoba, G., Elhag, M. S., Alnour, M., Shah, S., Chappuis, F., van Griensven, J. and Zachariah, R. 2015. 'Sodium stibogluconate and paromomycin for treating visceral leishmaniasis under routine conditions in eastern Sudan', *Trop Med Int Health*, 20: 1674-84.
- Azevedo**, V. F., Silva, M. B., Marinello, D. K., Santos, F. D. and Silva, G. B. 2012. 'Leukopenia and thrombocytopenia induced by etanercept: two case reports and literature review', *Rev Bras Reumatol*, 52: 110-2.
- Baiocco**, P., Colotti, G., Franceschini, S. and Ilari, A. 2009. 'Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis', *J Med Chem*, 52: 2603-12.
- Banduwardene**, R., Mullen, A. B. and Carter, K. C. 1997. 'Immune responses of *Leishmania donovani* infected BALB/c mice following treatment with free and vesicular sodium stibogluconate formulations', *Int J Immunopharmacol*, 19: 195-203.
- Bankoti**, R., Gupta, K., Levchenko, A. and Stager, S. 2012. 'Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection', *J Immunol*, 188: 3961-71.
- Barnhart**, K., Coutifaris, C. and Esposito, M. 2001. 'The pharmacology of methotrexate', *Expert Opin Pharmacother*, 2: 409-17.
- Beattie**, L., Peltan, A., Maroof, A., Kirby, A., Brown, N., Coles, M., Smith, D. F. and Kaye, P. M. 2010. 'Dynamic imaging of experimental *Leishmania donovani*-induced hepatic granulomas detects Kupffer cell-restricted antigen presentation to antigen-specific CD8 T cells', *PLoS Pathog*, 6: e1000805.

- Bern, C., Maguire, J. H. and Alvar, J.** 2008. 'Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis', *PLoS Negl Trop Dis*, 2: e313.
- Berry, C. E., Tsai, J., Tierney, A. and Pickles, R.** 2013. 'Visceral leishmaniasis in a patient taking adalimumab for rheumatoid arthritis', *Med J Aust*, 198: 331-3.
- Bhattacharya, A., Leprohon, P. and Ouellette, M.** 2021. 'Combined gene deletion of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase and pteridine reductase in *Leishmania infantum*', *PLoS Negl Trop Dis*, 15: e0009377.
- Bigbee, C. L., Gonchoroff, D. G., Vratsanos, G., Nadler, S. G., Haggerty, H. G. and Flynn, J. L.** 2007. 'Abatacept treatment does not exacerbate chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice', *Arthritis Rheum*, 56: 2557-65.
- Bongartz, T., Sutton, A. J., Sweeting, M. J., Buchan, I., Matteson, E. L. and Montori, V.** 2006. 'Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials', *JAMA*, 295: 2275-85.
- Bosch-Nicolau, P., Ubals, M., Salvador, F., Sanchez-Montalva, A., Aparicio, G., Erra, A., Martinez de Salazar, P., Sulleiro, E. and Molina, I.** 2019. 'Leishmaniasis and tumor necrosis factor alpha antagonists in the Mediterranean basin. A switch in clinical expression', *PLoS Negl Trop Dis*, 13: e0007708.
- Botana, L., Ibarra-Meneses, A. V., Sanchez, C., Matia, B., San Martin, J. V., Moreno, J. and Carrillo, E.** 2021. 'Leishmaniasis: A new method for confirming cure and detecting asymptomatic infection in patients receiving immunosuppressive treatment for autoimmune disease', *PLoS Negl Trop Dis*, 15: e0009662.
- Braun, J.** 2011. 'Methotrexate: optimizing the efficacy in rheumatoid arthritis', *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 3: 151-8.
- Burza, S., Croft, S. L. and Boelaert, M.** 2018. 'Leishmaniasis', *Lancet*, 392: 951-70.
- Carrillo, E., Carrasco-Anton, N., Lopez-Medrano, F., Salto, E., Fernandez, L., San Martin, J. V., Alvar, J., Aguado, J. M. and Moreno, J.** 2015. 'Cytokine Release Assays as Tests for Exposure to *Leishmania*, and for Confirming Cure from Leishmaniasis, in Solid Organ Transplant Recipients', *PLoS Negl Trop Dis*, 9: e0004179.
- Carrillo, E., Moreno, J. and Cruz, I.** 2013. 'What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid?', *Trends Parasitol*, 29: 579-80.
- Chakravarty, J. and Sundar, S.** 2019. 'Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis', *Expert Opin Pharmacother*, 20: 1251-65.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J. and Boelaert, M.** 2007. 'Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?', *Nat Rev Microbiol*, 5: 873-82.
- Charmoy, M., Auderset, F., Allenbach, C. and Tacchini-Cottier, F.** 2010. 'The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites', *J Biomed Biotechnol*, 2010: 719361.
- Costa, D. L., Rocha, R. L., Carvalho, R. M., Lima-Neto, A. S., Harhay, M. O., Costa, C. H., Barral-Neto, M. and Barral, A. P.** 2013. 'Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar', *Pathog Glob Health*, 107: 78-87.
- Croft, S. L., Sundar, S. and Fairlamb, A. H.** 2006. 'Drug resistance in leishmaniasis', *Clin Microbiol Rev*, 19: 111-26.
- Cruz, I., Canavate, C., Rubio, J. M., Morales, M. A., Chicharro, C., Laguna, F., Jimenez-Mejias, M., Sirera, G., Videla, S., Alvar, J. and Spanish, H. I. V. L. S. G.** 2002. 'A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96 Suppl 1: S185-9.
- Cunha, J., Carrillo, E., Sanchez, C., Cruz, I., Moreno, J. and Cordeiro-da-Silva, A.** 2013. 'Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and

- dermotropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis', *Parasit Vectors*, 6: 122.
- Cunningham**, A. C. 2002. 'Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania', *Exp Mol Pathol*, 72: 132-41.
- Curtis**, J. R., Patkar, N., Xie, A., Martin, C., Allison, J. J., Saag, M., Shatin, D. and Saag, K. G. 2007. 'Risk of serious bacterial infections among rheumatoid arthritis patients exposed to tumor necrosis factor alpha antagonists', *Arthritis Rheum*, 56: 1125-33.
- Darrah**, P. A., Patel, D. T., De Luca, P. M., Lindsay, R. W., Davey, D. F., Flynn, B. J., Hoff, S. T., Andersen, P., Reed, S. G., Morris, S. L., Roederer, M. and Seder, R. A. 2007. 'Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*', *Nat Med*, 13: 843-50.
- de Melo**, C. V. B., Hermida, M. D., Mesquita, B. R., Fontes, J. L. M., Koning, J. J., Solca, M. D. S., Benevides, B. B., Mota, G. B. S., Freitas, L. A. R., Mebius, R. E. and Dos-Santos, W. L. C. 2020. 'Phenotypical Characterization of Spleen Remodeling in Murine Experimental Visceral Leishmaniasis', *Front Immunol*, 11: 653.
- de Moura**, T. R., Santos, M. L., Braz, J. M., Santos, L. F., Aragao, M. T., de Oliveira, F. A., Santos, P. L., da Silva, A. M., de Jesus, A. R. and de Almeida, R. P. 2016. 'Cross-resistance of *Leishmania infantum* isolates to nitric oxide from patients refractory to antimony treatment, and greater tolerance to antileishmanial responses by macrophages', *Parasitol Res*, 115: 713-21.
- de Oliveira**, C. I. and Brodskyn, C. I. 2012. 'The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection', *Front Immunol*, 3: 145.
- de Souza**, W. and Rodrigues, J. C. 2009. 'Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Antitrypanosomatid Drugs', *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009: 642502.
- De Trez**, C., Magez, S., Akira, S., Ryffel, B., Carlier, Y. and Muraille, E. 2009. 'iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice', *PLoS Pathog*, 5: e1000494.
- DeNegre**, A. A., Ndeffo Mbah, M. L., Myers, K. and Fefferman, N. H. 2019. 'Emergence of antibiotic resistance in immunocompromised host populations: A case study of emerging antibiotic resistant tuberculosis in AIDS patients', *PLoS One*, 14: e0212969.
- Desjeux**, P. 2001. 'The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95: 239-43.
- Diehl**, R., Ferrara, F., Muller, C., Dreyer, A. Y., McLeod, D. D., Fricke, S. and Boltze, J. 2017. 'Immunosuppression for in vivo research: state-of-the-art protocols and experimental approaches', *Cell Mol Immunol*, 14: 146-79.
- Diehl**, S. and Rincon, M. 2002. 'The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation', *Mol Immunol*, 39: 531-6.
- Dos Santos**, P. L., de Oliveira, F. A., Santos, M. L., Cunha, L. C., Lino, M. T., de Oliveira, M. F., Bomfim, M. O., Silva, A. M., de Moura, T. R., de Jesus, A. R., Duthie, M. S., Reed, S. G. and de Almeida, R. P. 2016. 'The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14', *PLoS Negl Trop Dis*, 10: e0004375.
- Douanne**, N., Wagner, V., Roy, G., Leprohon, P., Ouellette, M. and Fernandez-Prada, C. 2020. 'MRPA-independent mechanisms of antimony resistance in *Leishmania infantum*', *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 13: 28-37.
- Engwerda**, C. R., Ato, M. and Kaye, P. M. 2004. 'Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis', *Trends Parasitol*, 20: 524-30.
- Esch**, K. J., Juelsgaard, R., Martinez, P. A., Jones, D. E. and Petersen, C. A. 2013. 'Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function', *J Immunol*, 191: 5542-50.
- Faleiro**, R. J., Kumar, R., Hafner, L. M. and Engwerda, C. R. 2014. 'Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis', *PLoS Negl Trop Dis*, 8: e2914.

- Faraut-Gambarelli, F., Piarroux, R., Deniau, M., Giusiano, B., Marty, P., Michel, G., Faugere, B. and Dumon, H.** 1997. 'In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis', *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 827-30.
- Feijo, D., Tiburcio, R., Ampuero, M., Brodskyn, C. and Tavares, N.** 2016. 'Dendritic Cells and *Leishmania* Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease', *J Immunol Res*, 2016: 3967436.
- Fernandez-Prada, C., Sharma, M., Plourde, M., Bresson, E., Roy, G., Leprohon, P. and Ouellette, M.** 2018. 'High-throughput Cos-Seq screen with intracellular *Leishmania infantum* for the discovery of novel drug-resistance mechanisms', *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 8: 165-73.
- Fernandez, L., Solana, J. C., Sanchez, C., Jimenez, M. A., Requena, J. M., Coler, R., Reed, S. G., Valenzuela, J. G., Kamhawi, S., Oliveira, F., Fichera, E., Glueck, R., Bottazzi, M. E., Gupta, G., Cecilio, P., Perez-Cabezas, B., Cordeiro-da-Silva, A., Gradoni, L., Carrillo, E. and Moreno, J.** 2021. 'Protective Efficacy in a Hamster Model of a Multivalent Vaccine for Human Visceral Leishmaniasis (MuLeVaClin) Consisting of the KMP11, LEISH-F3+, and LJL143 Antigens in Virosomes, Plus GLA-SE Adjuvant', *Microorganisms*, 9.
- Fotoohi, A. K. and Albertioni, F.** 2008. 'Mechanisms of antifolate resistance and methotrexate efficacy in leukemia cells', *Leuk Lymphoma*, 49: 410-26.
- Fromm, P. D., Kling, J. C., Remke, A., Bogdan, C. and Körner, H.** 2016. 'Fatal Leishmaniasis in the Absence of TNF Despite a Strong Th1 Response', *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Furst, D. E.** 2010. 'The risk of infections with biologic therapies for rheumatoid arthritis', *Semin Arthritis Rheum*, 39: 327-46.
- Gaies, E. and Jebabli, N.** 2012. 'Methotrexate Side Effects: Review Article', *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, 3.
- Garcia-Vidal, C., Rodriguez-Fernandez, S., Teijon, S., Esteve, M., Rodriguez-Carballeira, M., Lacasa, J. M., Salvador, G. and Garau, J.** 2009. 'Risk factors for opportunistic infections in infliximab-treated patients: the importance of screening in prevention', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28: 331-7.
- Garcia de Moura, R., Covre, L. P., Fantecelle, C. H., Gajardo, V. A. T., Cunha, C. B., Stringari, L. L., Belew, A. T., Daniel, C. B., Zeidler, S. V. V., Tadokoro, C. E., de Matos Guedes, H. L., Zanotti, R. L., Mosser, D., Falqueto, A., Akbar, A. N. and Gomes, D. C. O.** 2021. 'PD-1 Blockade Modulates Functional Activities of Exhausted-Like T Cell in Patients With Cutaneous Leishmaniasis', *Front Immunol*, 12: 632667.
- Gazanion, E., Fernandez-Prada, C., Papadopoulou, B., Leprohon, P. and Ouellette, M.** 2016. 'Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: E3012-21.
- Glans, H., Dotevall, L., Sobirk, S. K., Farnert, A. and Bradley, M.** 2018. 'Cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis in Sweden from 1996-2016: a retrospective study of clinical characteristics, treatments and outcomes', *BMC Infect Dis*, 18: 632.
- Gradoni, L., Lopez-Velez, R. and Mokni, M.** 2017. *Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region.* (World Health Organisation: Geneva, Switzerland).
- Gueirard, P., Laplante, A., Rondeau, C., Milon, G. and Desjardins, M.** 2008. 'Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages', *Cell Microbiol*, 10: 100-11.
- Haldar, A. K., Yadav, V., Singhal, E., Bisht, K. K., Singh, A., Bhaumik, S., Basu, R., Sen, P. and Roy, S.** 2010. '*Leishmania donovani* isolates with antimony-resistant but not -sensitive phenotype inhibit sodium antimony gluconate-induced dendritic cell activation', *PLoS Pathog*, 6: e1000907.
- Horrillo, L., Castro, A., Matia, B., Molina, L., Garcia-Martinez, J., Jaqueti, J., Garcia-Arata, I., Carrillo, E., Moreno, J., Ruiz-Giardin, J. M. and San Martin, J.** 2019. 'Clinical aspects of

- visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned?', *Parasit Vectors*, 12: 359.
- Hotez**, P. J., Pecoul, B., Rijal, S., Boehme, C., Aksoy, S., Malecela, M., Tapia-Conyer, R. and Reeder, J. C. 2016. 'Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies', *PLoS Negl Trop Dis*, 10: e0003895.
- Humanes-Navarro**, A. M., Herrador, Z., Redondo, L., Cruz, I. and Fernandez-Martinez, B. 2021. 'Estimating human leishmaniasis burden in Spain using the capture-recapture method, 2016-2017', *PLoS One*, 16: e0259225.
- Iqbal**, M. P., Sultana, F., Mehboobali, N. and Pervez, S. 2001. 'Folinic acid protects against suppression of growth by methotrexate in mice', *Biopharm Drug Dispos*, 22: 169-78.
- Jafarzadeh**, A., Kumar, S., Bodhale, N., Jafarzadeh, S., Nemati, M., Sharifi, I., Sarkar, A. and Saha, B. 2022. 'The expression of PD-1 and its ligands increases in *Leishmania* infection and its blockade reduces the parasite burden', *Cytokine*, 153: 155839.
- Jawed**, J. J., Dutta, S. and Majumdar, S. 2019. 'Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis', *Biomed Pharmacother*, 117: 109098.
- Jorg**, S., Grohme, D. A., Erzler, M., Binsfeld, M., Haghikia, A., Muller, D. N., Linker, R. A. and Kleinewietfeld, M. 2016. 'Environmental factors in autoimmune diseases and their role in multiple sclerosis', *Cell Mol Life Sci*, 73: 4611-22.
- Kaye**, P. M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., Zubairi, S. and Engwerda, C. R. 2004. 'The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis', *Immunol Rev*, 201: 239-53.
- Keyser**, F. D. 2011. 'Choice of Biologic Therapy for Patients with Rheumatoid Arthritis: The Infection Perspective', *Curr Rheumatol Rev*, 7: 77-87.
- Kumar**, P., Misra, P., Thakur, C. P., Saurabh, A., Rishi, N. and Mitra, D. K. 2018. 'T cell suppression in the bone marrow of visceral leishmaniasis patients: impact of parasite load', *Clin Exp Immunol*, 191: 318-27.
- Kurizky**, P. S., Marianelli, F. F., Cesetti, M. V., Damiani, G., Sampaio, R. N. R., Goncalves, L. M. T., Sousa, C. A. F., Martins, S. S., Vernal, S., Mota, L. and Gomes, C. M. 2020. 'A comprehensive systematic review of leishmaniasis in patients undergoing drug-induced immunosuppression for the treatment of dermatological, rheumatological and gastroenterological diseases', *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 62: e28.
- Kuschnir**, R. C., Pereira, L. S., Dutra, M. R. T., de Paula, L., Silva-Freitas, M. L., Correa-Castro, G., da Costa Cruz Silva, S., Cota, G., Santos-Oliveira, J. R. and Da-Cruz, A. M. 2021. 'High levels of anti-*Leishmania* IgG3 and low CD4(+) T cells count were associated with relapses in visceral leishmaniasis', *BMC Infect Dis*, 21: 369.
- Lerner**, A., Jeremias, P. and Matthias, T. 2015. 'The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing', *International Journal of Celiac Disease*, 3: 151-55.
- Liu**, D. and Uzonna, J. E. 2012. 'The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response', *Front Cell Infect Microbiol*, 2: 83.
- Loarce-Martos**, J., Garrote-Corral, S., Gioia, F. and Bachiller-Corral, J. 2019. 'Visceral leishmaniasis in a patient with rheumatoid arthritis treated with methotrexate', *Reumatol Clin*, 15: e130-e32.
- Loeuillet**, C., Banuls, A. L. and Hide, M. 2016. 'Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations', *Parasit Vectors*, 9: 144.
- Lopez-Velez**, R., Videla, S., Marquez, M., Boix, V., Jimenez-Mejias, M. E., Gorgolas, M., Arribas, J. R., Salas, A., Laguna, F., Sust, M., Canavate, C., Alvar, J. and Spanish, H. I. V. L. S. G. 2004. 'Amphotericin B lipid complex versus no treatment in the secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients', *J Antimicrob Chemother*, 53: 540-3.
- Loria-Cervera**, E. N. and Andrade-Narvaez, F. J. 2014. 'Animal models for the study of leishmaniasis immunology', *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 56: 1-11.

- Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D. and Opperdoes, F. R. 2000. 'Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in Leishmania', *Mol Biochem Parasitol*, 111: 1-14.
- Maarouf, M., Lawrence, F., Brown, S. and Robert-Gero, M. 1997. 'Biochemical alterations in paromomycin-treated Leishmania donovani promastigotes', *Parasitol Res*, 83: 198-202.
- Macedo, A. B., Sanchez-Arcila, J. C., Schubach, A. O., Mendonca, S. C., Marins-Dos-Santos, A., de Fatima Madeira, M., Gagini, T., Pimentel, M. I. and De Luca, P. M. 2012. 'Multifunctional CD4(+) T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis', *Clin Exp Immunol*, 167: 505-13.
- Mahmoudvand, H., Kheirandish, F., Mirbadie, S. R., Kayedi, M. H., Rezaei Riabi, T., Ghasemi, A. A., Bamorovat, M. and Sharifi, I. 2017. 'The Potential Use of Methotrexate in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: In Vitro Assays against Sensitive and Meglumine Antimoniate-resistant Strains of Leishmania tropica', *Iran J Parasitol*, 12: 339-47.
- Makau-Barasa, L. K., Ochol, D., Yotebieng, K. A., Adera, C. B. and de Souza, D. K. 2022. 'Moving from control to elimination of Visceral Leishmaniasis in East Africa', *Frontiers in Tropical Diseases*, 3.
- Manna, P. P., Chakrabarti, G. and Bandyopadhyay, S. 2010. 'Innate immune defense in visceral leishmaniasis: cytokine mediated protective role by allogeneic effector cell', *Vaccine*, 28: 803-10.
- Manna, P. P., Hira, S. K., Basu, A. and Bandyopadhyay, S. 2014. 'Cellular therapy by allogeneic macrophages against visceral leishmaniasis: Role of TNF- $\alpha$ ', *Cellular Immunology*, 290: 152-63.
- Marie, I., Menard, J. F., Hachulla, E., Cherin, P., Benveniste, O., Tiev, K. and Hatron, P. Y. 2011. 'Infectious complications in polymyositis and dermatomyositis: a series of 279 patients', *Semin Arthritis Rheum*, 41: 48-60.
- Martin, R. M., Brady, J. L. and Lew, A. M. 1998. 'The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice', *J Immunol Methods*, 212: 187-92.
- Mehta, A. and Saha, C. 2006. 'Mechanism of metalloloid-induced death in Leishmania spp.: role of iron, reactive oxygen species, Ca<sup>2+</sup>, and glutathione', *Free Radic Biol Med*, 40: 1857-68.
- Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M. and Mosser, D. M. 2005. 'A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania', *J Exp Med*, 201: 747-54.
- Monge-Maillo, B. and Lopez-Velez, R. 2013. 'Therapeutic options for visceral leishmaniasis', *Drugs*, 73: 1863-88.
- Montane, E., Salles, M., Barriocanal, A., Riera, E., Costa, J. and Tena, X. 2007. 'Antitumor necrosis factor-induced neutropenia: a case report with double positive rechallenges', *Clin Rheumatol*, 26: 1527-9.
- Moreira, V. R., de Jesus, L. C. L., Soares, R. P., Silva, L. D. M., Pinto, B. A. S., Melo, M. N., Paes, A. M. A. and Pereira, S. R. F. 2017. 'Meglumine Antimoniate (Glucantime) Causes Oxidative Stress-Derived DNA Damage in BALB/c Mice Infected by Leishmania (Leishmania) infantum', *Antimicrob Agents Chemother*, 61.
- Moreira, W., Leblanc, E. and Ouellette, M. 2009. 'The role of reduced pterins in resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates in the protozoan parasite Leishmania', *Free Radic Biol Med*, 46: 367-75.
- Moser, M. and Murphy, K. M. 2000. 'Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development', *Nat Immunol*, 1: 199-205.
- Mpofu, S., Fatima, F. and Moots, R. J. 2005. 'Anti-TNF-alpha therapies: they are all the same (aren't they?)', *Rheumatology (Oxford)*, 44: 271-3.
- Murray, H. W. 2001. 'Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis', *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 2185-97.

- Murray**, H. W. and Delph-Etienne, S. 2000. 'Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis', *Infect Immun*, 68: 288-93.
- Murray**, H. W., Jungbluth, A., Ritter, E., Montelibano, C. and Marino, M. W. 2000. 'Visceral leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment', *Infect Immun*, 68: 6289-93.
- Musa**, A., Khalil, E., Hailu, A., Olobo, J., Balasegaram, M., Omollo, R., Edwards, T., Rashid, J., Mbui, J., Musa, B., Abuzaid, A. A., Ahmed, O., Fadlalla, A., El-Hassan, A., Mueller, M., Mucee, G., Njoroge, S., Manduku, V., Mutuma, G., Apadet, L., Lodenyo, H., Mutea, D., Kirigi, G., Yifru, S., Mengistu, G., Hurissa, Z., Hailu, W., Weldegebreal, T., Tafes, H., Mekonnen, Y., Makonnen, E., Ndegwa, S., Sagaki, P., Kimutai, R., Kesusu, J., Owiti, R., Ellis, S. and Wasunna, M. 2012. 'Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial', *PLoS Negl Trop Dis*, 6: e1674.
- Muxel**, S. M., Aoki, J. I., Fernandes, J. C. R., Laranjeira-Silva, M. F., Zampieri, R. A., Acuna, S. M., Muller, K. E., Vanderlinde, R. H. and Floeter-Winter, L. M. 2017. 'Arginine and Polyamines Fate in Leishmania Infection', *Front Microbiol*, 8: 2682.
- Neumayr**, A. L., Morizot, G., Visser, L. G., Lockwood, D. N., Beck, B. R., Schneider, S., Bellaud, G., Cordoliani, F., Foulet, F., Laffitte, E. A., Buffet, P. and Blum, J. A. 2013. 'Clinical aspects and management of cutaneous leishmaniasis in rheumatoid patients treated with TNF-alpha antagonists', *Travel Med Infect Dis*, 11: 412-20.
- Nieto**, A., Dominguez-Bernal, G., Orden, J. A., De La Fuente, R., Madrid-Elena, N. and Carrion, J. 2011. 'Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model', *Vet Res*, 42: 39.
- Novais**, F. O. and Scott, P. 2015. 'CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly', *Semin Immunopathol*, 37: 251-9.
- Nylen**, S. and Sacks, D. 2007. 'Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis', *Trends Immunol*, 28: 378-84.
- Okwor**, I. and Uzonna, J. 2008. 'Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies', *Immunol Res*, 41: 123-36.
- Ouaaz**, F., Arron, J., Zheng, Y., Choi, Y. and Beg, A. A. 2002. 'Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits', *Immunity*, 16: 257-70.
- Ouellette**, M., Drummelsmith, J., El-Fadili, A., Kundig, C., Richard, D. and Roy, G. 2002. 'Pterin transport and metabolism in Leishmania and related trypanosomatid parasites', *Int J Parasitol*, 32: 385-98.
- Ouellette**, M., Drummelsmith, J. and Papadopoulou, B. 2004. 'Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments', *Drug Resist Updat*, 7: 257-66.
- Perez-Cabezas**, B., Cecilio, P., Gaspar, T. B., Gartner, F., Vasconcellos, R. and Cordeiro-da-Silva, A. 2019. 'Understanding Resistance vs. Susceptibility in Visceral Leishmaniasis Using Mouse Models of Leishmania infantum Infection', *Front Cell Infect Microbiol*, 9: 30.
- Peters**, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N. and Sacks, D. 2008. 'In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies', *Science*, 321: 970-4.
- Pinchuk**, L. M. and Filipov, N. M. 2008. 'Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice', *Immun Ageing*, 5: 1.
- Pintado**, V., Martin-Rabadan, P., Rivera, M. L., Moreno, S. and Bouza, E. 2001. 'Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study', *Medicine (Baltimore)*, 80: 54-73.
- Ponte-Sucre**, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., Lopez-Velez, R., Garcia-Hernandez, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R. and Papadopoulou, B. 2017. 'Drug resistance and

- treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge', *PLoS Negl Trop Dis*, 11: e0006052.
- Rai, A. K., Thakur, C. P., Singh, A., Seth, T., Srivastava, S. K., Singh, P. and Mitra, D. K.** 2012. 'Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis', *PLoS One*, 7: e31551.
- Rai, S., Bhaskar, Goel, S. K., Nath Dwivedi, U., Sundar, S. and Goyal, N.** 2013. 'Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of *Leishmania donovani*', *PLoS One*, 8: e74862.
- Rastrojo, A., Garcia-Hernandez, R., Vargas, P., Camacho, E., Corvo, L., Imamura, H., Dujardin, J. C., Castanys, S., Aguado, B., Gamarro, F. and Requena, J. M.** 2018. 'Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs', *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 8: 246-64.
- Ready, P.** 2010. 'Leishmaniasis emergence in Europe', *Euro Surveill*, 15: 19505.
- Ready, P. D.** 2008. 'Leishmaniasis emergence and climate change', *Rev Sci Tech*, 27: 399-412.
- Reina, D., Cerda, D., Guell, E., Martinez Montauti, J., Pineda, A. and Corominas, H.** 2017. 'Visceral leishmaniasis in a rheumatoid arthritis patient receiving methotrexate', *Reumatol Clin*, 13: 354-56.
- Rijal, S., Sundar, S., Mondal, D., Das, P., Alvar, J. and Boelaert, M.** 2019. 'Eliminating visceral leishmaniasis in South Asia: the road ahead', *BMJ*, 364: k5224.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J. and Minor, L.** 2004. 'Cell Viability Assays.' in S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. P. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, M. D. Hall, J. V. Haas, S. R. J. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. C. Kales, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, G. S. Sittampalam, M. Tarselli, O. J. Trask, Jr., Y. Wang, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, M. Xia and X. Xu (eds.), *Assay Guidance Manual* (Bethesda (MD)).
- Rodrigues, L. S., Barreto, A. S., Bomfim, L. G. S., Gomes, M. C., Ferreira, N. L. C., da Cruz, G. S., Magalhaes, L. S., de Jesus, A. R., Palatnik-de-Sousa, C. B., Correa, C. B. and de Almeida, R. P.** 2021. 'Multifunctional, TNF-alpha and IFN-gamma-Secreting CD4 and CD8 T Cells and CD8(High) T Cells Are Associated With the Cure of Human Visceral Leishmaniasis', *Front Immunol*, 12: 773983.
- Rodrigues, O. R., Marques, C., Soares-Clemente, M., Ferronha, M. H. and Santos-Gomes, G. M.** 2009. 'Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection', *Immunobiology*, 214: 101-11.
- Rodrigues, V., Cordeiro-da-Silva, A., Laforge, M., Silvestre, R. and Estaquier, J.** 2016. 'Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection', *Parasit Vectors*, 9: 118.
- Romero, G. A. S., Costa, D. L., Costa, C. H. N., de Almeida, R. P., de Melo, E. V., de Carvalho, S. F. G., Rabello, A., de Carvalho, A. L., Sousa, A. Q., Leite, R. D., Lima, S. S., Amaral, T. A., Alves, F. P., Rode, J. and Collaborative, L. G.** 2017. 'Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial', *PLoS Negl Trop Dis*, 11: e0005706.
- Rostamian, M., Sohrabi, S., Kavosifard, H. and Niknam, H. M.** 2017. 'Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice', *J Microbiol Immunol Infect*, 50: 160-66.
- Sacks, D. L. and Melby, P. C.** 2015. 'Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis', *Curr Protoc Immunol*, 108: 19 2 1-19 2 24.
- Sambrook, J. and Russell, D.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York, USA).
- Sanchez-Sampedro, L., Gomez, C. E., Mejias-Perez, E., Sorzano, C. O. and Esteban, M.** 2012. 'High quality long-term CD4+ and CD8+ effector memory populations stimulated by DNA-LACK/MVA-LACK regimen in *Leishmania major* BALB/c model of infection', *PLoS One*, 7: e38859.

- Sangenis**, L. H., Lima, S. R., de Mello, C. X., Cardoso, D. T., Mello, J. N., Santo, M. C. and Tavares, W. 2014. 'Expansion of visceral leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil: report of the first autochthonous case in the municipality of Volta Redonda and the difficulty of diagnosis', *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 56: 271-4.
- Saporito**, L., Giammanco, G. M., De Grazia, S. and Colomba, C. 2013. 'Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host', *Int J Infect Dis*, 17: e572-6.
- Sasidharan**, S. and Saudagar, P. 2021. 'Leishmaniasis: where are we and where are we heading?', *Parasitol Res*, 120: 1541-54.
- Schmid**, M., Wege, A. K. and Ritter, U. 2012. 'Characteristics of "Tip-DCs and MDSCs" and Their Potential Role in Leishmaniasis', *Front Microbiol*, 3: 74.
- Schmidt**, A. and Krauth-Siegel, R. L. 2002. 'Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development', *Curr Top Med Chem*, 2: 1239-59.
- Schwartz**, T., Jensenius, M., Blomberg, B., Fladeby, C., Maeland, A. and Pettersen, F. O. 2019. 'Imported visceral leishmaniasis and immunosuppression in seven Norwegian patients', *Trop Dis Travel Med Vaccines*, 5: 16.
- Seder**, R. A., Darrah, P. A. and Roederer, M. 2008. 'T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design', *Nat Rev Immunol*, 8: 247-58.
- Shaked-Mishan**, P., Ulrich, N., Ephros, M. and Zilberstein, D. 2001. 'Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*', *J Biol Chem*, 276: 3971-6.
- Shortman**, K. and Liu, Y. J. 2002. 'Mouse and human dendritic cell subtypes', *Nat Rev Immunol*, 2: 151-61.
- Silva-Barrios**, S., Smans, M., Duerr, C. U., Qureshi, S. T., Fritz, J. H., Descoteaux, A. and Stager, S. 2016. 'Innate Immune B Cell Activation by *Leishmania donovani* Exacerbates Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia', *Cell Rep*, 15: 2427-37.
- Singh**, N., Kumar, R., Engwerda, C., Sacks, D., Nysten, S. and Sundar, S. 2016. 'Tumor necrosis factor alpha neutralization has no direct effect on parasite burden, but causes impaired IFN-gamma production by spleen cells from human visceral leishmaniasis patients', *Cytokine*, 85: 184-90.
- Singh**, N. and Sundar, S. 2018. 'Combined neutralization of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha induces IL-4 production but has no direct additive impact on parasite burden in splenic cultures of human visceral leishmaniasis', *PLoS One*, 13: e0199817.
- Sisto**, M., Brandonisio, O., Panaro, M. A., Acquafredda, A., Leogrande, D., Fasanella, A., Trotta, T., Fumarola, L. and Mitolo, V. 2001. 'Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages', *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 24: 247-54.
- Stager**, S. and Rafati, S. 2012. 'CD8(+) T cells in leishmania infections: friends or foes?', *Front Immunol*, 3: 5.
- Stanley**, A. C. and Engwerda, C. R. 2007. 'Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis', *Immunol Cell Biol*, 85: 138-47.
- Sudarshan**, M., Weirather, J. L., Wilson, M. E. and Sundar, S. 2011. 'Study of parasite kinetics with antileishmanial drugs using real-time quantitative PCR in Indian visceral leishmaniasis', *J Antimicrob Chemother*, 66: 1751-5.
- Sukhumavasi**, W., Kaewamatawong, T., Somboonpoonpol, N., Jiratanh, M., Wattanamethanont, J., Kaewthamasorn, M., Leelayoova, S. and Tiwananthagorn, S. 2021. 'Liver- and Spleen-Specific Immune Responses in Experimental *Leishmania martiniquensis* Infection in BALB/c Mice', *Front Vet Sci*, 8: 794024.
- Sundar**, S., Mondal, D., Rijal, S., Bhattacharya, S., Ghalib, H., Kroeger, A., Boelaert, M., Desjeux, P., Richter-Airijoki, H. and Harms, G. 2008. 'Implementation research to support the

- initiative on the elimination of kala azar from Bangladesh, India and Nepal--the challenges for diagnosis and treatment', *Trop Med Int Health*, 13: 2-5.
- Sundar, S.,** More, D. K., Singh, M. K., Singh, V. P., Sharma, S., Makharia, A., Kumar, P. C. and Murray, H. W. 2000. 'Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic', *Clin Infect Dis*, 31: 1104-7.
- Sundar, S.** and Rai, M. 2002. 'Advances in the treatment of leishmaniasis', *Curr Opin Infect Dis*, 15: 593-8.
- Sundar, S.,** Singh, A., Rai, M., Prajapati, V. K., Singh, A. K., Ostyn, B., Boelaert, M., Dujardin, J. C. and Chakravarty, J. 2012. 'Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use', *Clin Infect Dis*, 55: 543-50.
- Sundar, S.** and Singh, B. 2018. 'Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis', *Expert Opin Ther Targets*, 22: 467-86.
- Thomas, S.,** Fisher, K. H., Snowden, J. A., Danson, S. J., Brown, S. and Zeidler, M. P. 2015. 'Methotrexate is a JAK/STAT Pathway Inhibitor', *PLoS One*, 10: e0130078.
- Tian, H.** and Cronstein, B. N. 2007. 'Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis', *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 65: 168-73.
- Ubeda, J. M.,** Legare, D., Raymond, F., Ouameur, A. A., Boisvert, S., Rigault, P., Corbeil, J., Tremblay, M. J., Olivier, M., Papadopoulou, B. and Ouellette, M. 2008. 'Modulation of gene expression in drug resistant Leishmania is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy', *Genome Biol*, 9: R115.
- Uliana, S. R. B.,** Trinconi, C. T. and Coelho, A. C. 2018. 'Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges', *Parasitology*, 145: 464-80.
- van der Veen, M. J.,** van der Heide, A., Kruize, A. A. and Bijlsma, J. W. 1994. 'Infection rate and use of antibiotics in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate', *Ann Rheum Dis*, 53: 224-8.
- van Griensven, J.,** Carrillo, E., López-Vélez, R., Lynen, L. and Moreno, J. 2014. 'Leishmaniasis in immunosuppressed individuals', *Clinical Microbiology and Infection*, 20: 286-99.
- van Griensven, J.** and Diro, E. 2012. 'Visceral leishmaniasis', *Infect Dis Clin North Am*, 26: 309-22.
- Vickers, T. J.** and Beverley, S. M. 2011. 'Folate metabolic pathways in Leishmania', *Essays Biochem*, 51: 63-80.
- Wherry, E. J.** and Kurachi, M. 2015. 'Molecular and cellular insights into T cell exhaustion', *Nat Rev Immunol*, 15: 486-99.
- WHO.** 2010. 'Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010', *WHO technical report series* 949.
- WHO.** 2017. "Global Leishmaniasis Update, 2006–2015: A Turning Point in Leishmaniasis Surveillance." In *Weekly epidemiological record*, n38, 557-72.
- Wilhelm, P.,** Ritter, U., Labbow, S., Donhauser, N., Rollinghoff, M., Bogdan, C. and Korner, H. 2001. 'Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF', *J Immunol*, 166: 4012-9.
- Wilsman-Theis, D.,** Koch, S., Mindnich, C., Bonness, S., Schnautz, S., von Bubnoff, D. and Bieber, T. 2013. 'Generation and functional analysis of human TNF-alpha/iNOS-producing dendritic cells (Tip-DC)', *Allergy*, 68: 890-8.
- Winthrop, K. L.** 2006. 'Serious infections with antirheumatic therapy: are biologicals worse?', *Ann Rheum Dis*, 65 Suppl 3: iii54-7.
- Wyllie, S.,** Cunningham, M. L. and Fairlamb, A. H. 2004. 'Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen Leishmania donovani', *J Biol Chem*, 279: 39925-32.
- Wyllie, S.** and Fairlamb, A. H. 2006. 'Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line', *Biochem Pharmacol*, 71: 257-67.

- Xynos, I. D., Tektonidou, M. G., Pikazis, D. and Sipsas, N. V.** 2009. 'Leishmaniasis, autoimmune rheumatic disease, and anti-tumor necrosis factor therapy, Europe', *Emerg Infect Dis*, 15: 956-9.
- Yang, J., Wang, L., Xu, D., Tang, D., Li, S., Du, F., Wang, L., Zhao, J. and Fang, R.** 2018. 'Risk Assessment of Etanercept in Mice Chronically Infected With *Toxoplasma gondii*', *Front Microbiol*, 9: 2822.
- Yasmin, H., Adhikary, A., Al-Ahdal, M. N., Roy, S. and Kishore, U.** 2022. 'Host-Pathogen Interaction in Leishmaniasis: Immune Response and Vaccination Strategies', *Immuno 2*: 218-54.
- Zanger, P., Kotter, I., Kremsner, P. G. and Gabrysch, S.** 2012. 'Tumor necrosis factor alpha antagonist drugs and leishmaniasis in Europe', *Clin Microbiol Infect*, 18: 670-6.
- Zijlstra, E. E.** 2016. 'The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL)', *Parasit Vectors*, 9: 464.

# ANEXO I

The text 'ANEXO I' is positioned in the upper right quadrant of the page. Below it, there are several horizontal lines of varying lengths and colors (light blue and dark blue) that extend to the left, creating a decorative underline effect.

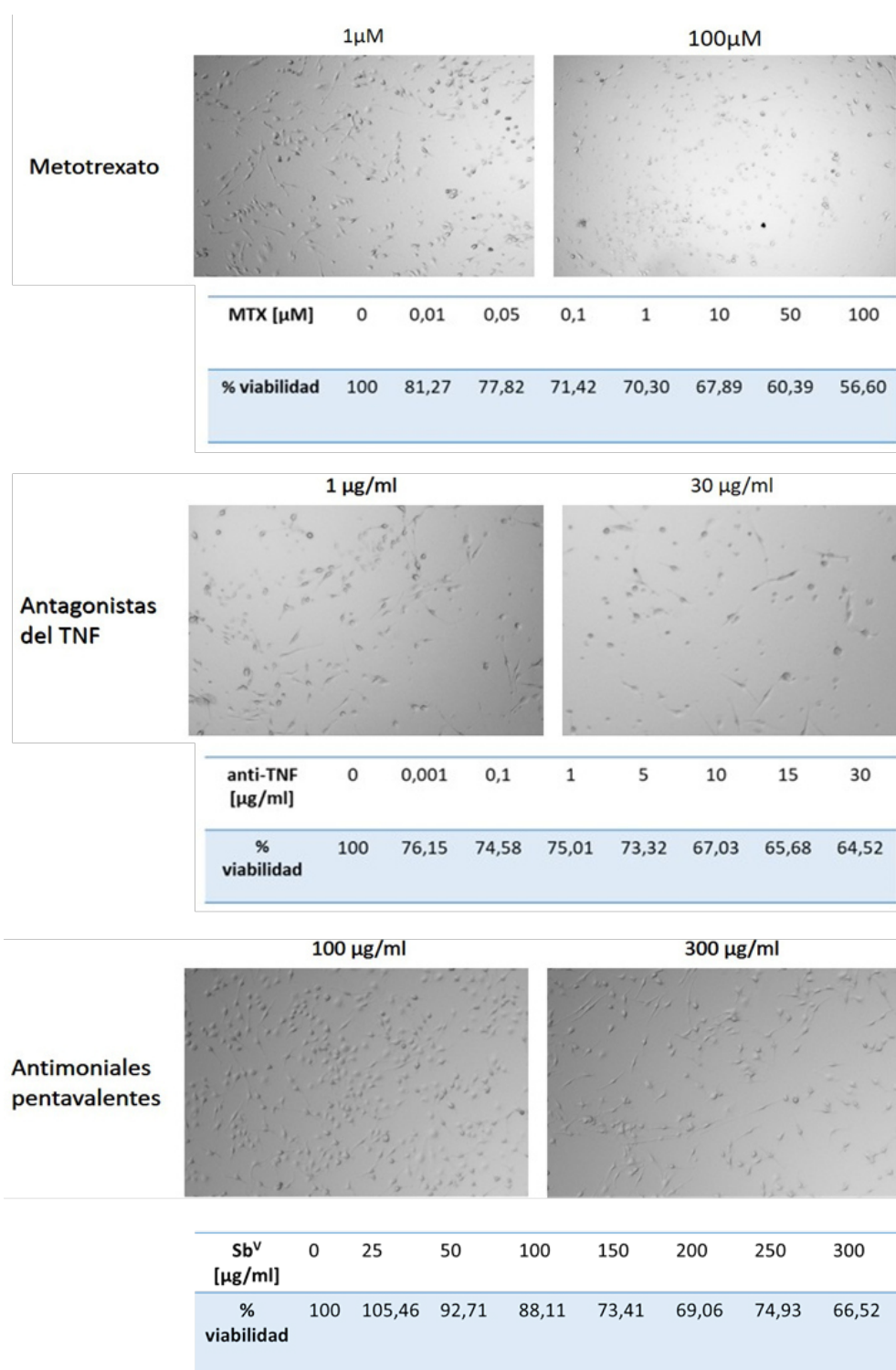
## **Anexo I: Determinación de la viabilidad celular en macrófagos derivados de médula ósea cultivados con tratamientos farmacológicos.**

Durante el desarrollo de los ensayos *in vitro* de susceptibilidad farmacológica en macrófagos BMDM, uno de los objetivos principales consistió en la determinación de la viabilidad celular frente a cada uno de los tratamientos. Este resultado permitió establecer las concentraciones de estos compuestos que afectan a la viabilidad celular y que, por lo tanto, serán excesivas para los análisis sobre la forma amastigote del parásito.

Esta viabilidad celular se determinó a través de un ensayo con el reactivo (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromuro) tal y como se describió en el apartado II.2. de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se calcularon como porcentajes de viabilidad celular con respecto al pocillo con células, pero sin tratamiento.

En la figura A1 se puede observar que según aumentan las concentraciones de los tratamientos metotrexato, antagonistas del TNF y antimoniales pentavalentes, se reducen los porcentajes de viabilidad celular. Además, es importante destacar que la disminución de la viabilidad celular fue más pronunciada en el caso de los tratamientos inmunosupresores. A pesar de la pérdida de viabilidad al emplear antimoniales pentavalentes, la morfología de los macrófagos no se vio afectada, como sí que ocurrió al emplear los inmunosupresores MTX y anti-TNF.

De forma estándar, se considera que el 65 % de viabilidad celular es suficiente para desarrollar los ensayos de susceptibilidad farmacológica en macrófagos infectados.



**Figura A1. Determinación de la viabilidad celular en BMDMs cultivados en presencia de MTX, anti-TNF o Sb<sup>V</sup>.** Se cultivaron BMDMs con concentraciones crecientes de MTX, anti-TNF o Sb<sup>V</sup> durante cinco días a una temperatura de 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub>. Finalizada la incubación se realizó el ensayo de viabilidad a través del reactivo MTT. Para cada una de las condiciones se calculó el porcentaje de viabilidad asociado con respecto a la ausencia del compuesto.

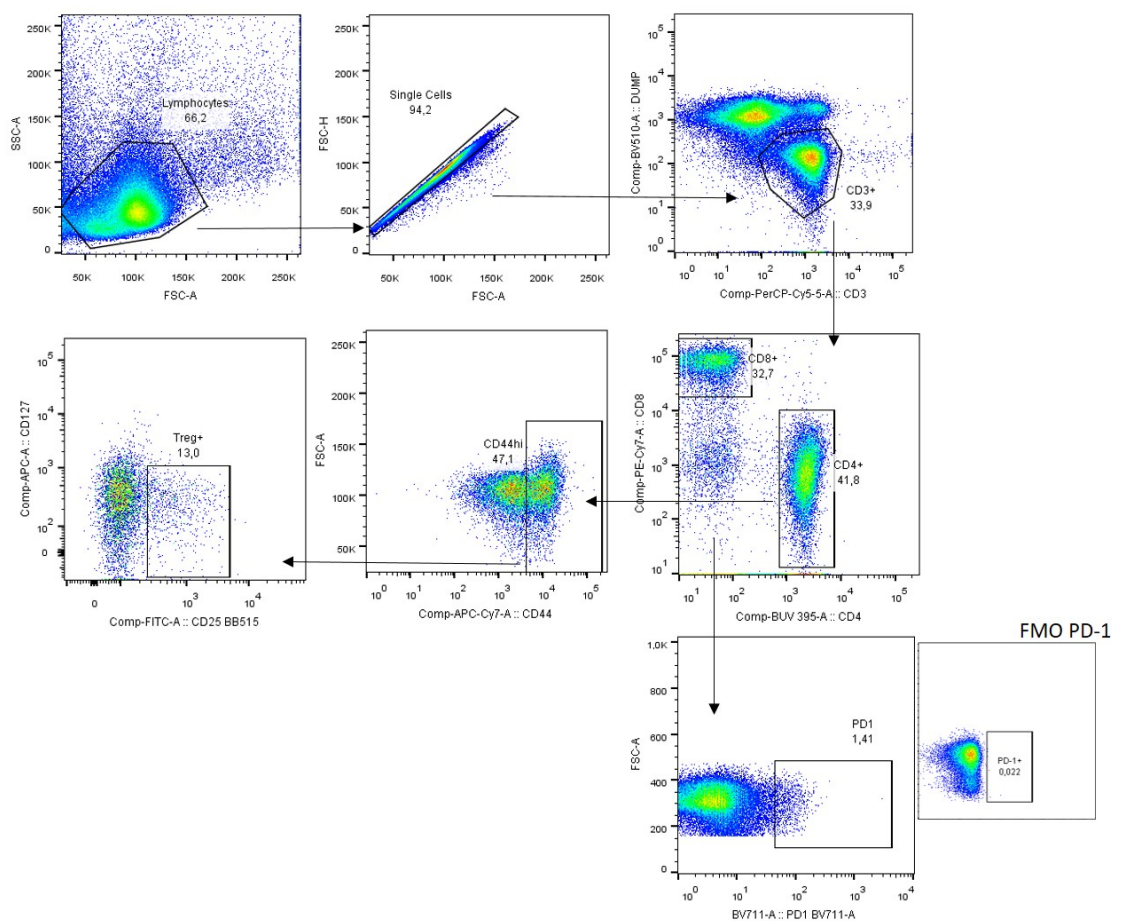
# ANEXO II

A decorative graphic consisting of several horizontal lines of varying lengths and colors (blue and grey) extending from the left side of the page towards the right, positioned below the title.

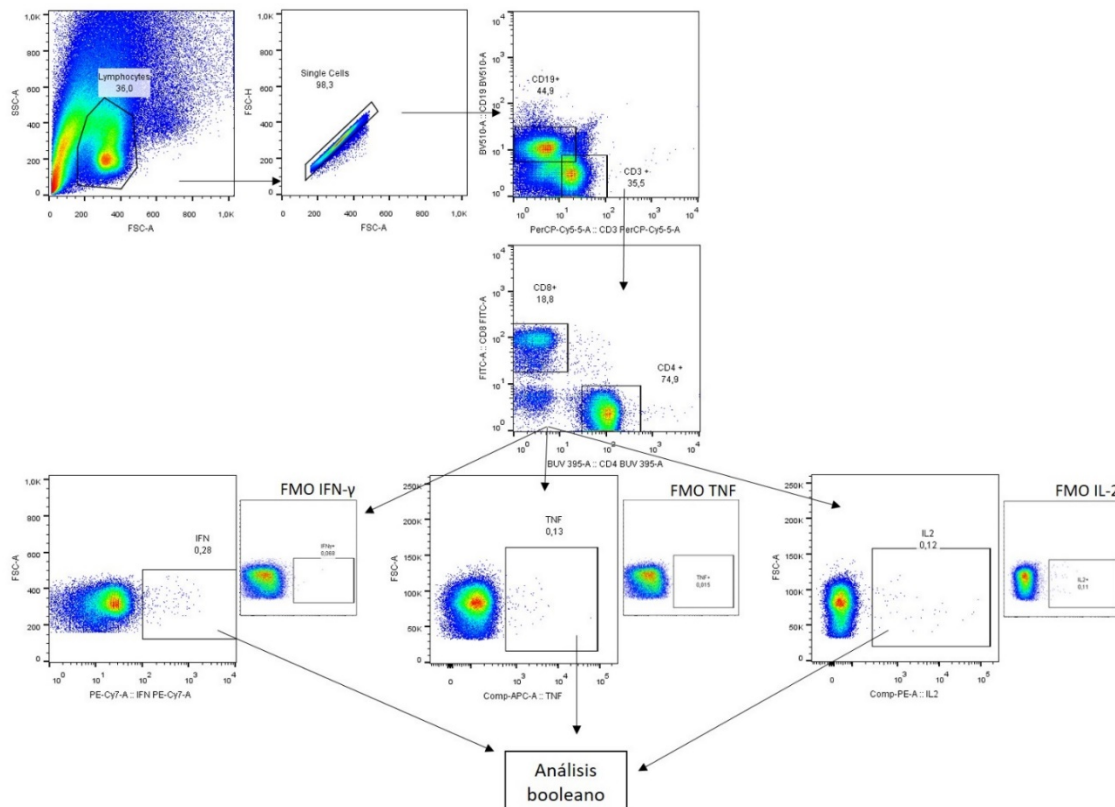
## Anexo II: Análisis de los ensayos de citometría de flujo.

Para realizar el análisis de citometría de flujo de las distintas poblaciones en los esplenocitos de los animales, se llevaron a cabo las estrategias que se detallan a continuación. Para ello se emplearon controles FMO (*Fluorescence Minus One*) en los que se encuentran todos los anticuerpos que conforman el panel de citometría, a excepción de la población a analizar, para poder así determinar la dispersión del resto de fluorocromos sobre el marcador en cuestión.

En primer lugar, se seleccionó la población celular diana (linfocitos o células mieloides) mediante la discriminación celular por tamaño (FSC) y complejidad (SSC). A continuación, sobre esta población se realizó una clasificación de células únicas para eliminar aquellas células que pudiesen provocar una distorsión del análisis. A partir de estas células únicas se fueron diseñando poblaciones con los marcadores escogidos, según se detalla a continuación.

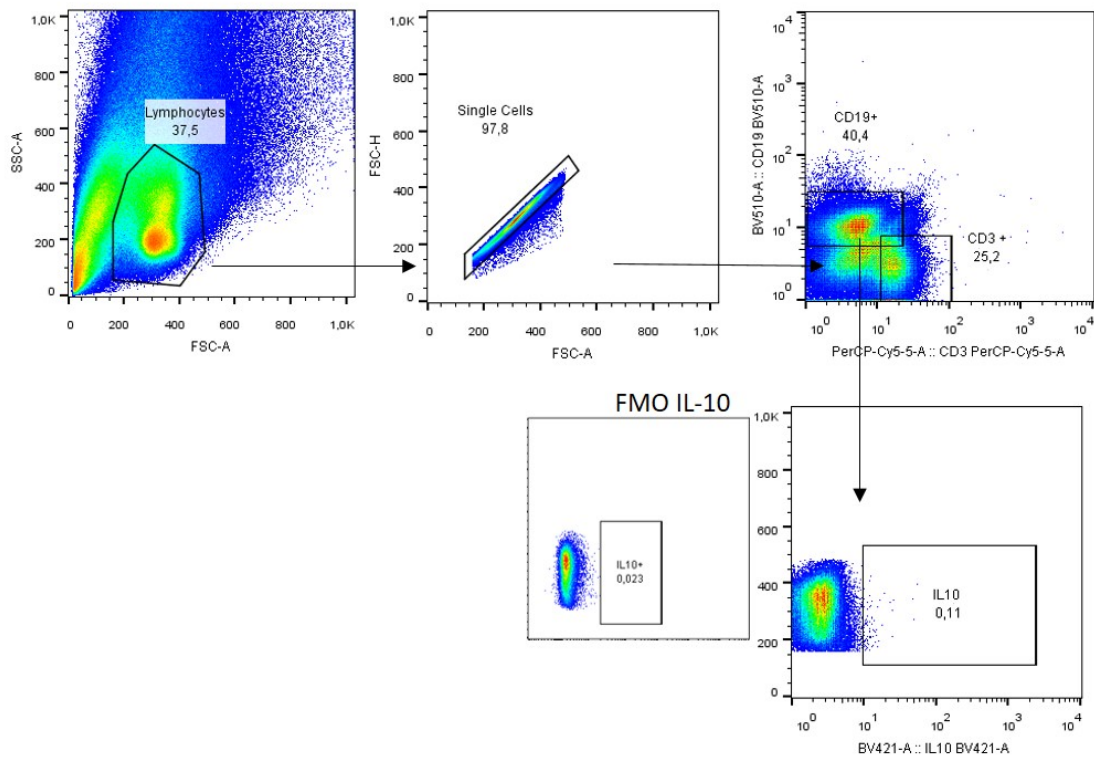


**Figura A2. Linfocitos T reguladores y marcador de agotamiento PD-1 (figura 17).** Para el análisis *ex vivo* de las poblaciones de células T reguladoras y del marcador PD-1 en los ratones inmunosuprimidos e infectados con *L. infantum* se emplearon los siguientes anticuerpos: anti-CD3 PerCP-Cy5 para la selección de los linfocitos T; sobre esta población se emplearon los marcadores anti-CD4 BUV395 y anti-CD8 PE-Cy7 para determinar las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, respectivamente. En la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se seleccionaron los marcadores anti-CD44 APC-Cy7, anti-CD127 APC y anti-CD25 BB515 para localizar a las células T reguladoras y, el marcador anti-PD1 BV711 para analizar la expresión de este marcador de agotamiento celular.

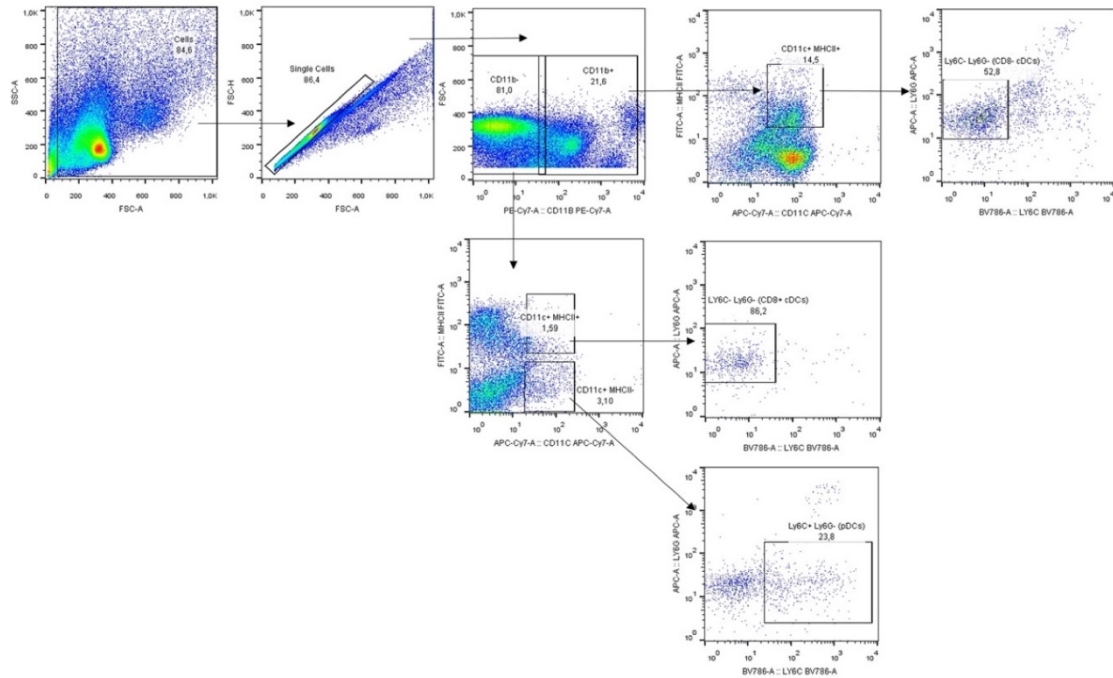


**Figura A3. Linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 y análisis booleano (figura 16, 22 y 23).** Mediante el análisis booleano, se determinaron las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> mono o multiproductores de citoquinas pro-inflamatorias después de la incubación con el antígeno SLA de *L. infantum*. Para ello, sobre la región de linfocitos T marcada con el anticuerpo anti-CD3 PerCP-Cy5, se establecieron las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con los marcadores anti-CD4 BUV395 y anti-CD8 FITC,

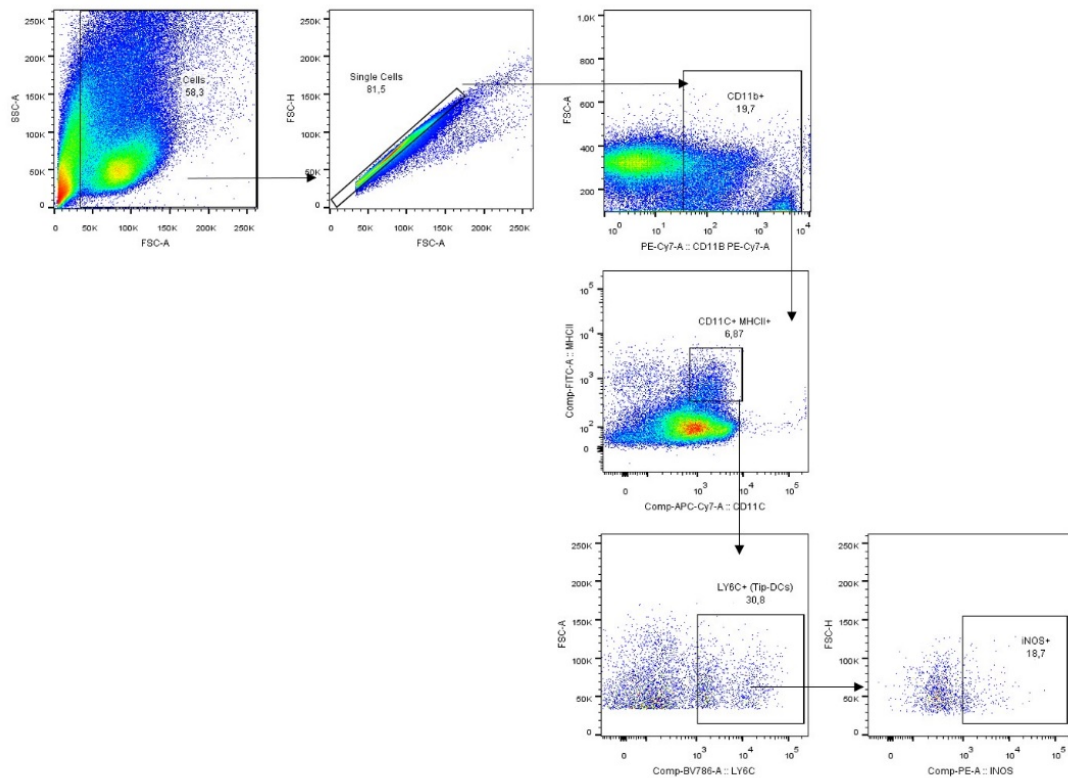
respectivamente. Sobre cada una de estas poblaciones se seleccionaron las citoquinas pro inflamatorias a través de los marcadores anti-IFN- $\gamma$  PE-Cy7, anti-TNF Alexa Fluor 647 y anti-IL-2 PE.



**Figura A4. Linfocitos B CD19<sup>+</sup> productores de IL-10 (figura 25).** La cuantificación de los linfocitos CD19<sup>+</sup> productores de la citoquina IL-10 se realizó, de igual modo, tras 72 h de incubación con el SLA de *L. infantum*. Sobre la región de los linfocitos se discriminó la población de células CD19<sup>+</sup> mediante los marcadores anti-CD3 PerCP-Cy5 y anti-CD19 BV510. Una vez seleccionada la población de linfocitos CD19<sup>+</sup>, se determinó la producción de IL-10 por medio del marcador anti-IL-10 BV421.



**Figura A5. Determinación de las poblaciones de células dendríticas (figura 26).** Las diferentes poblaciones de células dendríticas analizadas *ex vivo* se determinaron mediante los marcadores anti-CD11b PE-Cy7, anti-MHCII FITC, anti-CD11c APC-Cy7, anti-Ly6G APC y anti-Ly6C BV786. La estrategia empleada para el análisis de las células dendríticas plasmacitoides implicó los marcadores CD11b<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, Ly6G<sup>-</sup> y Ly6C<sup>-</sup>; la utilizada para las células dendríticas convencionales CD8<sup>+</sup> fue CD11b<sup>-</sup>, MHCII<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, LY6G<sup>-</sup> y Ly6C<sup>-</sup> y, finalmente para determinar a las células dendríticas convencionales CD8<sup>-</sup> se realizó la estrategia CD11b<sup>-</sup>, MHCII<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, Ly6G<sup>-</sup> y Ly6C<sup>+</sup>.



**Figura A6. Células Tip-DCs y producción de óxido nítrico (figura 27).** Tras la estimulación de 24 h con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 se analizó la población de células Tip-dendríticas y la producción de óxido nítrico asociada a las mismas. Para ello, sobre la población de células mieloides se seleccionó el marcador anti-CD11b PE-Cy7 y, sobre este, los fluorocromos anti-MHCII FITC, anti-CD11c APC-Cy7, anti-Ly6C BV786 y anti-iNOS PE.

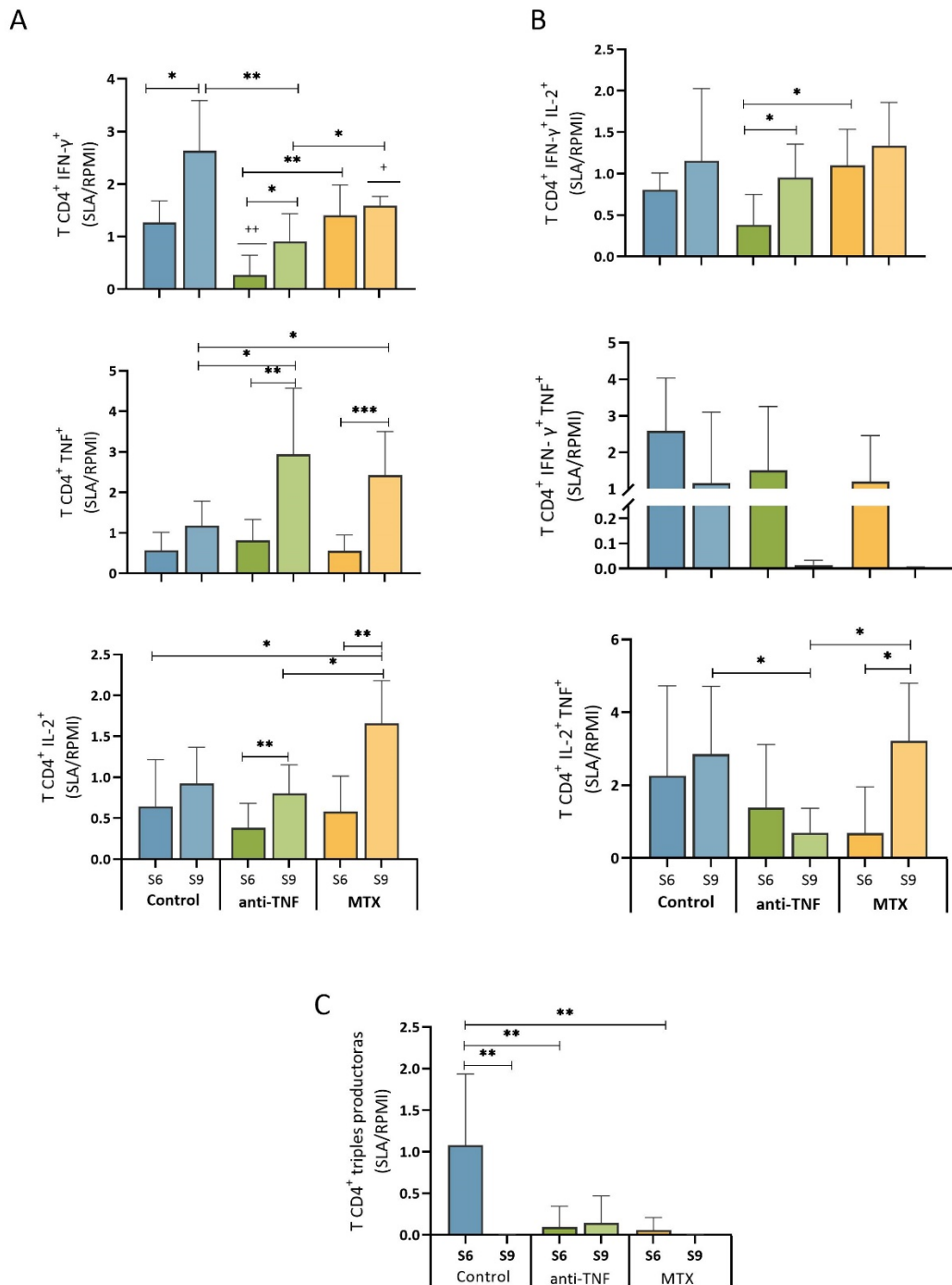
# ANEXO III

A decorative graphic consisting of several horizontal lines of varying lengths and colors (blue and grey) positioned below the title.

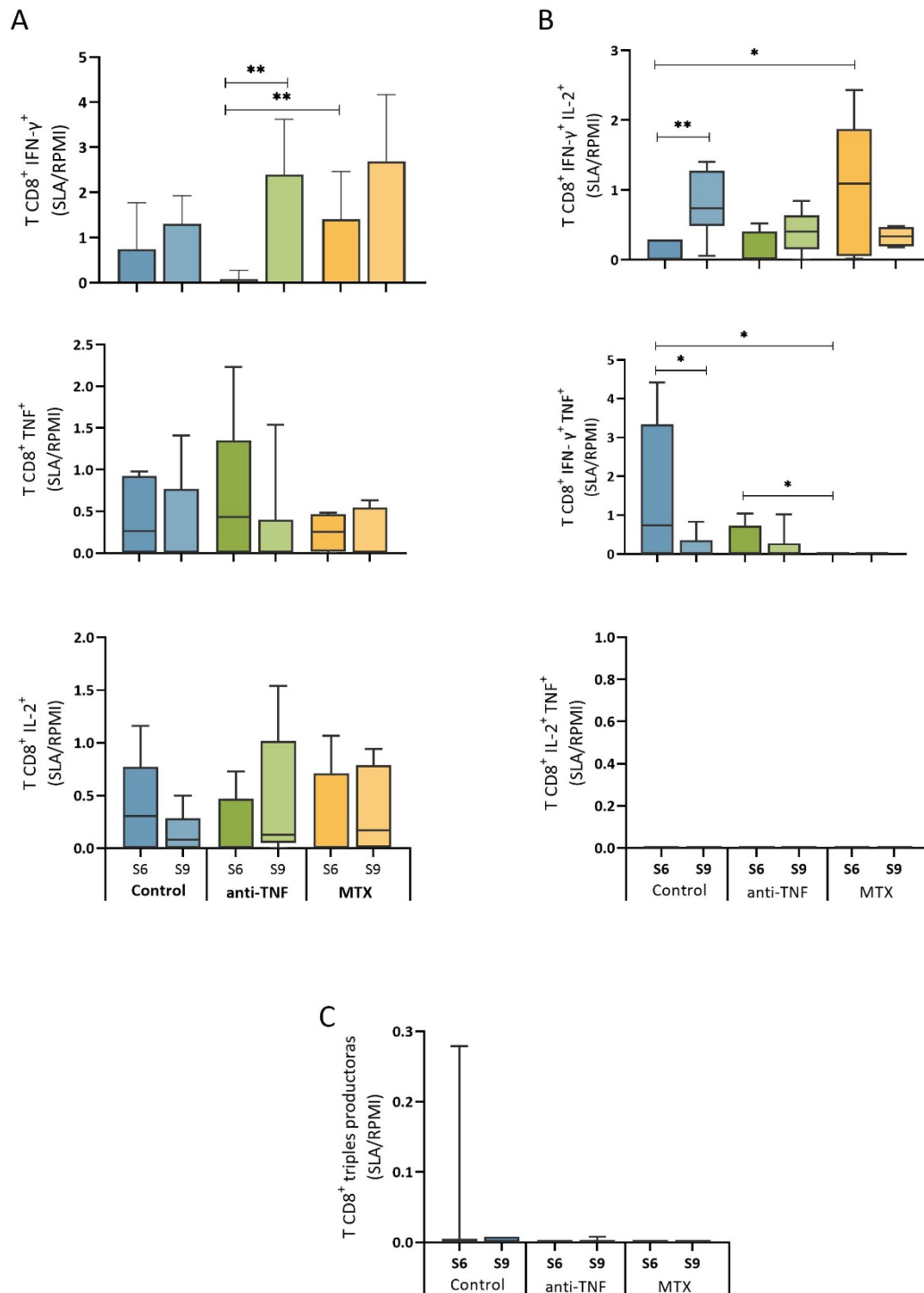
---

### **Anexo III: Análisis multiparamétrico para la determinación de poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productores de citoquinas mediante citometría de flujo**

En las figuras 22 y 23 del apartado de resultados se reflejaron de forma general las células monoproducidas, dobles o triples productoras de las citoquinas proinflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2. En este anexo III se detallan las relaciones entre la estimulación con el antígeno SLA de *L. infantum* y la ausencia de estímulo (medio RPMI) de cada una de las combinaciones de citoquinas posibles tanto para los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como para los T CD8<sup>+</sup>.



**Figura A7. Linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de citoquinas.** En (A) se muestran las ratios SLA/RPMI correspondientes a las células mono productoras de IFN- $\gamma^+$ , TNF $^+$  o IL-2 $^+$ ; en (B) las tres combinaciones posibles de células dobles productoras (IFN- $\gamma^+$  IL-2 $^+$ ; IFN- $\gamma^+$  TNF $^+$  o TNF $^+$  IL-2 $^+$ ). El gráfico en (C) corresponde a las células triples productoras IFN- $\gamma^+$  TNF $^+$  IL-2 $^+$ . Las diferencias estadísticas se determinaron mediante un test Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).



**Figura A8. Linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de citoquinas.** En (A) se muestran las ratios correspondientes a las células mono productoras de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF<sup>+</sup> o IL-2<sup>+</sup>; en (B) las tres combinaciones posibles de células dobles productoras (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>; IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> o TNF<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>). El gráfico en (C) corresponde a las células triples productoras IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante un test Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

# ANEXO IV

---

---

---

---

## RESEARCH ARTICLE

# Effect of immunosuppressants on the parasite load developed in, and immune response to, visceral leishmaniasis: A comparative study in a mouse model

Lorena Bernardo , Jose Carlos Solana \*, Alba Romero-Kauss , Carmen Sánchez, Eugenia Carrillo ‡, Javier Moreno ‡

WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid), Spain

‡ EC and JM are joint last authors.

\* [jc.solana@isciii.es](mailto:jc.solana@isciii.es)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Bernardo L, Solana JC, Romero-Kauss A, Sánchez C, Carrillo E, Moreno J (2021) Effect of immunosuppressants on the parasite load developed in, and immune response to, visceral leishmaniasis: A comparative study in a mouse model. *PLoS Negl Trop Dis* 15(2): e0009126. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009126>

**Editor:** Claudia Ida Brodskyn, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-FIOCRUZ/BA, BRAZIL

**Received:** September 24, 2020

**Accepted:** January 12, 2021

**Published:** February 1, 2021

**Copyright:** © 2021 Bernardo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its [Supporting information](#) files.

**Funding:** This study was funded by the Instituto de Salud Carlos III through the ISCIII-AES project (PI16CIII/00007). E. C. was supported by a contract from RD16CIII/0003/0002 Red de Enfermedades Tropicales, Subprograma RETICS del Plan Estatal de I+D+I 2013–2016, cofunded by FEDER 'Una manera de hacer Europa' funds. The

## Abstract

The increasing use of immunosuppressants in areas where visceral leishmaniasis (VL) is endemic has increased the number of people susceptible to developing more severe forms of the disease. Few studies have examined the quality of the immune response in immunosuppressed patients or experimental animals with VL. The present work characterises the parasite load developed in, and immune response to, *Leishmania infantum*-induced VL in C57BL/6 mice that, prior to and during infection, received immunosuppressant treatment with methylprednisolone (MPDN), anti-tumour necrosis factor (anti-TNF) antibodies, or methotrexate (MTX). The latter two treatments induced a significant reduction in the number of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes over the infection period. The anti-TNF treatment was also associated with a higher parasite load in the liver and a lower parasite load in the spleen. This, plus a possibly treatment-induced reduction in the number of cytokine-producing Th1 cells in the spleen, indicates the development of more severe VL. Interestingly, the MPDN and (especially) MTX treatments provoked a greater presence of soluble *Leishmania* antigen-specific multi-cytokine-producing T cells in the spleen and a lower liver parasite load than in control animals. These results highlight the need to better understand how immunosuppressant treatments might influence the severity of VL in human patients.

## Author summary

Patients who are immunosuppressed are at greater risk of developing visceral leishmaniasis (VL) when infected with *Leishmania*. Prior infection with HIV has been traditionally associated with an increased risk of developing VL, but the use of immunosuppressants in the treatment of autoimmune disease has been linked to a higher incidence of VL in *Leishmania*-endemic areas. It is important to understand the influence these treatments have on *Leishmania* infection, paying special attention to how they affect the immune response

fundors had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

mediated by IFN- $\gamma$ -, TNF- and IL-2-producing T lymphocytes (such cells are necessary if an infection is to be resolved). Studies in this area require the use of murine models of VL. C57BL/6 mice infected with *Leishmania infantum* that received immunosuppressant treatment with methylprednisolone, anti-tumour necrosis factor antibodies, or methotrexate prior to and during infection, showed differences in their immune response, and in the parasite load developed in various organs. These results highlight the need to better understand how immunosuppressant treatments might influence the severity of VL in human patients.

## Introduction

Leishmaniasis is a neglected—though widely distributed—tropical disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* [1]. Visceral leishmaniasis (VL), the most severe form of the disease in which parasites invade different internal organs, is associated with high morbidity and mortality [2]. In the Mediterranean Basin, Central Asia and Brazil, *Leishmania infantum* is the species mainly responsible. Successful resolution of the infection requires the host to mount an adequate Th1-type immune response characterised by the production of IFN- $\gamma$ , TNF and IL-2 by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells [3,4].

Being in an immunosuppressed state is major risk factor for developing severe VL. For example, co-infection with HIV increases by some 100–2320 fold the chances of developing active VL [5,6]. Indeed, HIV-associated immunosuppression has been identified as a major emerging challenge in the control of VL [5]. However, an increase in cases of VL has also been detected among recipients of solid organ transplants [7,8] and patients receiving immunosuppressants to treat autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, lupus erythematosus and inflammatory bowel disease [9,10]. Ever more frequently used in these contexts, these drugs may increase the number of people susceptible to *Leishmania* infection as well as condition the severity of disease. For example, VL caused by both *L. infantum* and *L. donovani* has been reported in patients treated with methylprednisolone (MPDN) for rheumatoid arthritis, along with reactivated disease, likely due to the immunosuppression induced [11,12].

Tumour necrosis factor (TNF) is a key cytokine in the activation of macrophages infected by *Leishmania*, and it plays a central role in the development of a protective Th1 immune response [13]. Antagonists of TNF, such as anti-TNF antibodies, are also used in the treatment of autoimmune disease. After their bonding to the target molecule, the multiplication of amastigotes in infected macrophages is favoured, increasing the chances of developing clinical leishmaniasis—an outcome confirmed in animal models lacking the gene for TNF [14].

Methotrexate (MTX), an antagonist of folic acid, blocks the synthesis of purines and pyrimidines [15]. Commonly used to treat autoimmune diseases, its precise mechanism of action remains unknown, although it has been described to reduce the inflammation associated with these diseases [16]. It also reduces the multiplication of lymphocytes, and thus has a direct effect on immune system function [16]; it might, therefore, influence the development of an adequate immune response to *Leishmania* infection.

The effects of the above agents on the immune response to and severity of VL have never been examined comparatively in standard experimental models. However, the murine model of *L. infantum* infection allows the study of the immune response and of the mechanisms affecting protection against/susceptibility towards the development of VL [17]. This immune response is organ-specific; the infection is usually cleared from the liver in the first few weeks, but it becomes chronic in the spleen and bone marrow [18]. The present work characterises

the parasite load developed in, and immune response to, *L. infantum*-induced VL in C57BL/6 mice that, prior to and during infection, received immunosuppressant treatment with MPDN, anti-TNF antibodies, or MTX.

## Methods

### Ethics statement

This work was approved by the Committee on Ethics and Animal Welfare of the *Instituto de Salud Carlos III* (CBA 04\_2018, PROEX 072/18), and performed according to Spanish legislation for the protection of animals for experimentation and other scientific purposes (Royal Decree 53/2013, law 32/2007), which adheres to European Directive 86/609/EEC.

### Animals and parasites

The experimental animals were female C57BL/6 mice (Charles River, USA). The promastigotes used in experimental infections belonged to the JPC strain of *L. infantum* (MCAN/ES/98/LLM-724) and were obtained from the cold-stored *Leishmania* strain collection at the National Center for Microbiology (Majadahonda, Spain). Promastigotes were cultivated at 27°C in Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium plus RPMI-1640 L-glutamine medium (Lonza, Switzerland) supplemented with 10% foetal bovine serum (Sigma, USA), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml) (Lonza, Switzerland).

### Immunosuppressants and infection

The mice were divided into four groups (N = 6 per group) and received either: 1) intraperitoneal (i.p.) PBS three times per week (control group); 2) subcutaneous (s.c.) MPDN 16 mg/kg (Sigma, USA) once per week [19]; 3) i.p. anti-TNF antibodies 20 mg/kg (Leinco Technologies, USA) twice per week [20], or 4) i.p. MTX 2.5 mg/kg (Sigma, USA) three times per week [21]. All treatments were administered in volumes of 0.1 ml. One week after beginning these treatments (end of Week 0), the mice were infected by injecting the tail vein with  $1 \times 10^7$  parasites in 100 µl PBS. Immunosuppressive treatment was maintained until the end of the experiment (end of Week 4).

### Sample processing

200 µl of blood were extracted from the submaxillary vein into a tube containing EDTA once per week to examine the immune response mounted to the infection. This blood was centrifuged at 500 g for 10 min to isolate the plasma. The remainder of the sample was used to analyse the populations of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells via flow cytometry (see below).

At the end of Week 4 the mice were euthanised and blood, liver, spleen and bone marrow (from the femur) samples collected.

The liver and spleen were homogenised on Falcon Cell Strainer nylon membranes (Thermo Fisher Scientific, USA) to obtain cell suspensions, which were then centrifuged at 800 g for 10 min in PBS at 4°C. The spleen cell fraction thus obtained was washed with RBC buffer (Invitrogen, USA) to eliminate any erythrocytes. The clean spleen cells were then re-centrifuged as above, and the pellet resuspended in 2 ml of RPMI. The liver cells obtained in the first centrifugation above were directly resuspended in 2 ml PBS. Bone marrow was obtained from the femur (cleared of muscle tissue) by flushing RPMI into the bone's central cavity. The extracted cells were resuspended in 200 µL PBS. DNA was extracted from 200 µl suspensions of the above-prepared cells using phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) [22]. Extracted DNA

was resuspended in 100  $\mu$ l of distilled water, and quantified using the NanoDrop ND-1000 Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

### qPCR measurement of parasite load

Extracted *Leishmania* DNA was quantified using the LightCycler FastStart Kit (Roche Applied Science, Germany), using primers R223 and R334 for the *Leishmania* 18S ribosomal subunit [23]. A standard curve was then used to calculate the number of parasites from the DNA quantification results as previously described [24].

### Humoral response

Antibodies against parasite antigens in plasma were determined by ELISA. Nunc MaxiSorp plates (Thermo Fisher Scientific, USA) were coated with 2  $\mu$ g/ml of soluble *L. infantum* antigen (SLA), obtained as previously described [25]. The plates were washed with 0.5% PBS-Tween20 and the wells blocked with a 3% BSA in 0.5% PBS-Tween20 blocking solution. Plasma samples were diluted 1/100 in blocking solution and the wells prepared to represent a 50% serial dilution series. After incubation (1 h at 37°C) the wells were washed in 0.5% PBS-Tween20 and incubated again for 30 min at 37°C with horse radish peroxidase-conjugated secondary antibodies, i.e., anti-IgG (conjugated high and low molecular weight chains), anti-IgG1, or anti-IgG2c (Nordic Mubio, Netherlands) diluted 1:2000 in blocking solution. Finally, the wells were washed again in 0.5% PBS-Tween20 and reactions revealed using the SIGMAFAST OPD Kit (Sigma, USA) according to the manufacturer's instructions. The colorimetric reaction was stopped using 2N HCl. Absorbance was measured at 490 nm in a Multi-skanFC device (Thermo Fisher Scientific, USA) and antibody titres determined as the inverse value of the last serial dilution in the above series in which the reactivity was greater than that of negative controls.

### Flow cytometry measurement of T lymphocyte populations

CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in blood were marked with APC CD8 (Clone 53–5.8) and PE CD4 (Clone GK1.5) anti-mouse antibodies (Biolegend, USA) for 30 min at 4°C in the dark. Erythrocytes were then eliminated using BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, USA). After centrifugation (800 g for 6 min), the cell pellet was washed and fixed in 2% formaldehyde. Analysis was then performed using a BD FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA) and the results examined using FlowJo v7.6.5 software (FlowJo LLC, USA). Total CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were obtained by multiplying the frequency value for each population by the number of leukocytes previously determined in the extracted blood using a Scill Vet ABC Plus automatic counter (Horiba Medical, Japan).

To determine T lymphocyte cytokine production,  $5 \times 10^6$  splenocytes/ml were stimulated for 6 h at 37°C with plate-bound anti-CD3 antibodies (10  $\mu$ g/ml), soluble anti-CD28 antibodies (2  $\mu$ g/ml) (eBioscience, USA), *L. infantum* SLA (25  $\mu$ g/ml), or with culture medium alone (non-stimulated control). After 2 h of culturing, 10  $\mu$ g/ml brefeldin A (Sigma, USA) were added to block the secretion of cytokines.

To determine their viability, the above splenocytes were then washed with PBS and incubated for 30 min with the reagent provided in the LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). They were then washed in PBS + 1% FBS and incubated for 5 min with anti-mouse Fc Block (BD Biosciences, USA). Surface antigen detection was performed by adding PerCp-Cy5.5 anti-mouse CD3 (clone 145-2C11), BUV395 anti-mouse CD4 (clone GK1.5), FITC anti-mouse CD8 (clone 53–6.7), BV510 anti-mouse CD19 (clone 1D3) and BV510 anti-mouse CD14 (clone 123323) antibodies, incubating for 20 min. After washing

off excess antibodies, the cells were fixed and permeabilized with BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, USA) and then washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences, USA). Intracellular cytokines were marked by incubating the cells for 30 min with PE-Cy7 anti-mouse IFN- $\gamma$  (clone XMG1.2), AlexaFluor 647 anti-mouse TNF (clone MP6-XT22) and PE anti-mouse IL-2 (clone JES6-5H4) (BD, USA or BioLegend, USA) antibodies at 4°C in the dark.

The populations of different cytokine-producing T cells were determined using a BD LSRFortessa X-20 flow cytometer (BD Biosciences, USA) and the results processed using FlowJo v.7.6.5 software (FlowJo LLC, USA) (see [S1 Fig](#)). The results for each cytokine were represented as the difference between those of stimulated (anti-CD3/anti-CD28 or SLA) cells and non-stimulated (RPMI-treated) cells.

## Statistical analysis

All result distributions were subjected to Shapiro-Wilk testing of normality. Differences between groups were examined using the two-tailed Student t test (if distributions were normal) or Mann-Whitney U test (if they were not). Significance was set at  $p < 0.05$ . All calculations were performed using GraphPad Prism v.7 software (GraphPad Software, USA). The results are representative of two independent experiments.

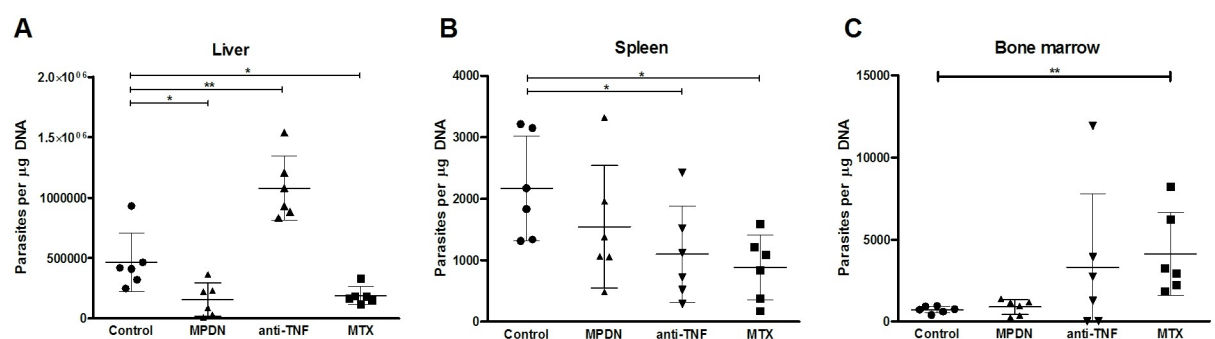
## Results

### Parasite loads in different organs

The anti-TNF-treated mice had a significantly higher liver parasite load than the control animals ( $p = 0.0018$ ) ([Fig 1A](#)) but showed a significantly lower spleen parasite load than those same controls ([Fig 1B](#)).

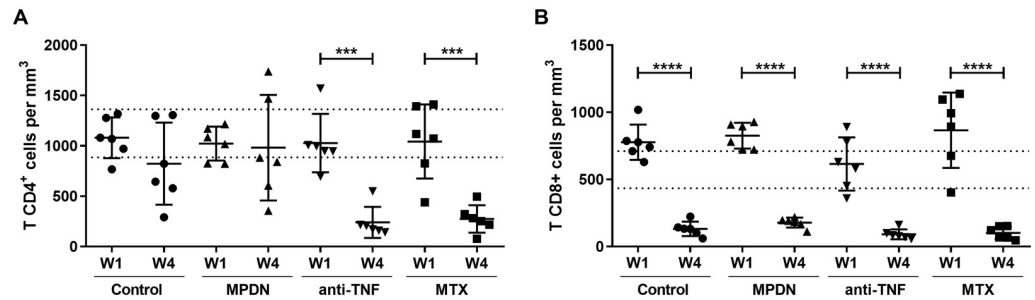
The MTX-treated animals showed a lower parasite load than the controls in both the liver ( $p = 0.023$ ) and spleen ( $p = 0.010$ ), ([Fig 1A and 1B](#)), but a higher bone marrow parasite load ([Fig 1C](#)) ( $p = 0.0084$ ).

As for the MTX-treated mice, the liver parasite load of the MPDN-treated animals was smaller than that seen in the control animals ( $p = 0.021$ ), but no significant differences were seen between the spleen or bone marrow loads and those of the control animals.



**Fig 1. Parasite loads in the organs of *L. infantum*-infected mice treated with the different immunosuppressants.** C57BL/6 mice (6 animals per group) were treated with PBS (control), MPDN (methylprednisolone), anti-tumour necrosis factor antibodies (anti-TNF) or MTX (methotrexate) one week before infection with  $1 \times 10^7$  *L. infantum* promastigotes. All animals were euthanized four weeks after infection and number of parasites per  $\mu\text{g}$  of DNA of liver (A), spleen (B) and bone marrow (C) were determined by qPCR. Results for each animal are shown, as well as the mean  $\pm$  standard deviation per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009126.g001>



**Fig 2. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts in immunosuppressant-treated mice infected with *L. infantum*.** C57BL/6 mice (6 animals per group) were infected with  $1 \times 10^7$  *L. infantum* promastigotes one week after immunosuppressive treatment. Results show CD4<sup>+</sup> (A) and CD8<sup>+</sup> (B) T cell counts in peripheral blood one (W1) and four (W4) weeks after infection for all animals in all treatment groups, plus the mean  $\pm$  standard deviation for each group. The normal count for CD4<sup>+</sup> T cells is  $1124 \pm 238$  cells/mm<sup>3</sup>, and for CD8<sup>+</sup> T cells  $716 \pm 173$  cells/mm<sup>3</sup>. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . MPDN = methylprednisolone, anti-TNF = anti-tumour necrosis factor antibodies, MTX = methotrexate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009126.g002>

### The number of T CD4<sup>+</sup> cells circulating during infection is reduced by anti-TNF antibodies and methotrexate

One week after infection (end of Week 1), the number of circulating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells remained unaffected by the immunosuppressant treatments (Fig 2); values for both fell within the range for naive mice of the same age (CD4<sup>+</sup> T cells  $1124 \pm 238$  cells/mm<sup>3</sup>, CD8<sup>+</sup> T  $716 \pm 173$  cells/mm<sup>3</sup>; determined in-house). However, at the end of the Week 4, the number of CD4<sup>+</sup> T cells was significantly lower than at the end of Week 1, and indeed below normal values in both the anti-TNF- (76.6%;  $p = 0.0002$ ) and MTX-treated (73.6%;  $p = 0.0007$ ) mice (Fig 2A). This reduction coincided with an increase in the liver and bone marrow parasite loads (Fig 1A and 1C, respectively). However, all the treated animals, as well as the controls, showed a drastic reduction in the number of CD8<sup>+</sup> T cells ( $p = 0.0001$ )—a result of the infection rather than any treatment (Fig 2B).

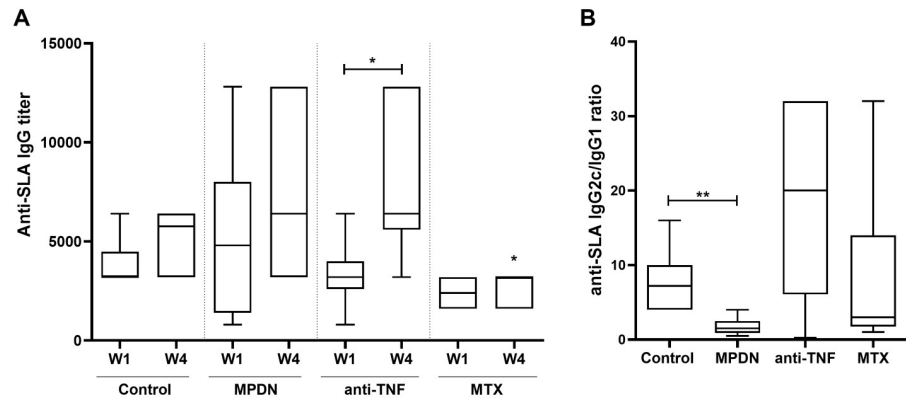
### Immunosuppressant treatment can influence the type and magnitude of the humoral immune response

In response to *Leishmania* antigen, the *Leishmania*-specific total IgG titre increased from the end of Week 1 until the end of Week 4 (Fig 3A), but only significantly so in the anti-TNF-treated animals ( $p = 0.045$ ). Interestingly, the MTX-treated animals returned an IgG titre significantly lower than that recorded for the control group by the end of Week 4 ( $p = 0.032$ ).

No significant difference was seen between the IgG2c/IgG1 ratios of the anti-TNF-treated animals and the controls. The MPDN-treated mice showed a significantly less strong polarization towards the IgG2c type than did those of the control group ( $p = 0.0065$ ) (Fig 3B). The latter result is not due to any smaller IgG2c titre in the MPDN-treated animals, but to a production of IgG1 antibodies far stronger than in any other group (S2 Fig).

### Immunosuppressant treatment can influence the cell-mediated immune response to *L. infantum*

In general, 10–20% of the splenocyte CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells produced only TNF (S3 Fig) when challenged with  $\alpha$ -CD3+ $\alpha$ -CD28. In the control mice, only TNF-producing T cells were found, while the MPDN-, anti-TNF- and MTX-treated animals also showed CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>



**Fig 3. Humoral response of immunosuppressant-treated mice infected with *L. infantum* to soluble *Leishmania* antigen.** C57BL/6 mice (6 animals per group) were treated with PBS (control), MPDN (methylprednisolone), anti-TNF antibodies or MTX (methotrexate) one week before infection with  $1 \times 10^7$  *L. infantum* promastigotes. Samples of sera of each animal were collected one (W1) and four (W4) weeks after infection to determine anti-SLA antibody titers by ELISA using limiting dilutions. The results are shown as median and whisker (min to max) plots for (A) anti-SLA total IgG antibodies one and four weeks after infection and (B) anti-SLA IgG2c/IgG1 subclasses ratio at W4. \* $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.001$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009126.g003>

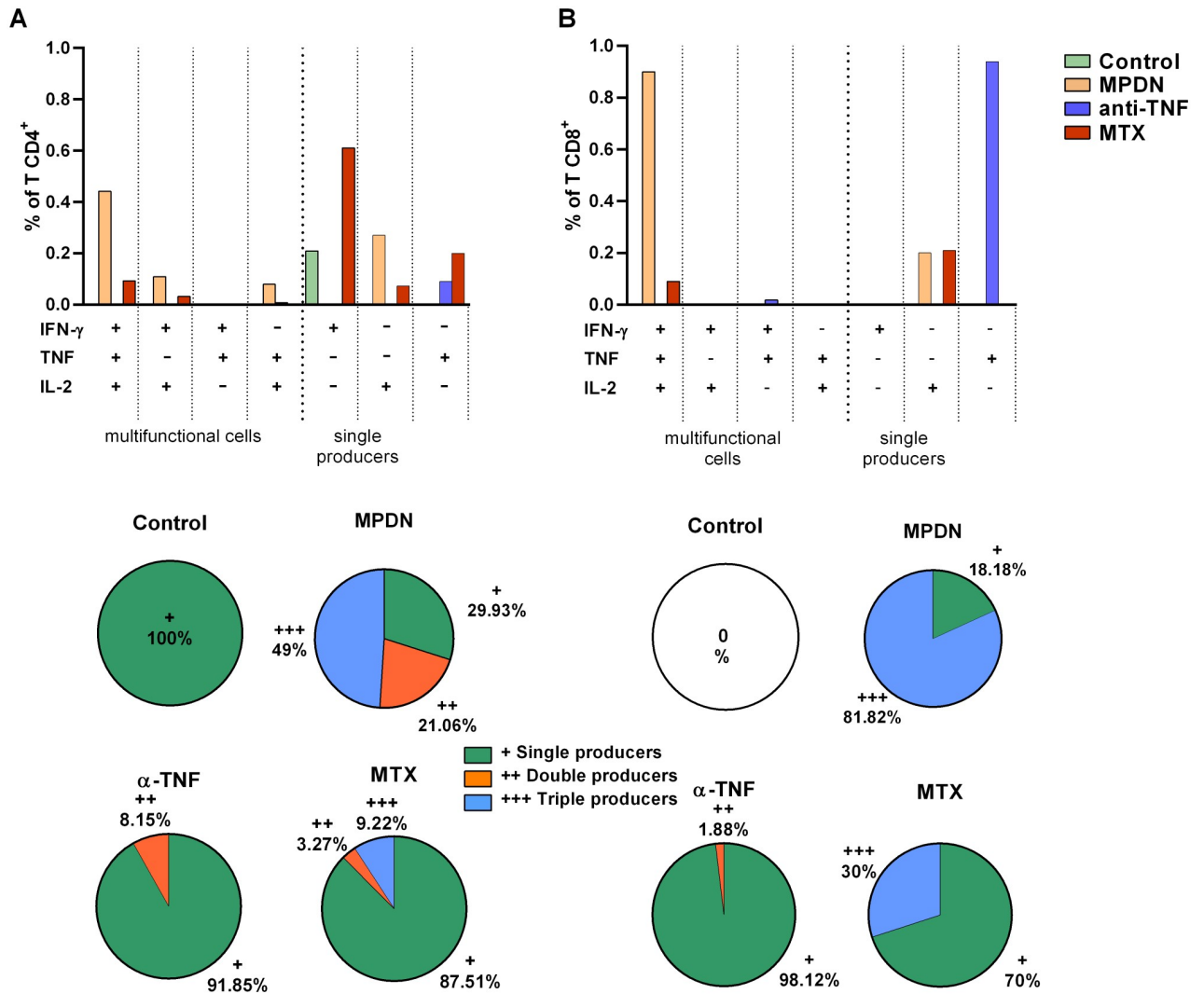
T cells that produced two ( $\text{IFN-}\gamma^+\text{TNF}^+$  or  $\text{IL-2}^+\text{TNF}^+$ ; up to 5% of T cells) or even three ( $\text{IFN-}\gamma^+\text{IL-2}^+\text{TNF}^+$ ; up to 4% of T cells in the MPDN-treated mice) of the examined cytokines (S3 Fig). The lymphocytes could thus be activated in all treatment groups, with TNF single-cytokine producers being the most common type generated.

The capacity of the  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  lymphocytes to respond to SLA differed between the treatment groups, and between them and the controls (Fig 4). The control animals generated only  $\text{CD4}^+$   $\text{IFN-}\gamma^+$  producers (Fig 4A), while in the anti-TNF-treated mice this cytokine was produced only by a discrete population of  $\text{CD8}^+$  T cells (Fig 4B). In contrast, the MTX-treated animals generated mainly  $\text{CD4}^+$   $\text{IFN-}\gamma^+$  producers, along with  $\text{CD4}^+$  TNF,  $\text{CD4}^+$  IL-2 and  $\text{CD8}^+$ IL-2 single-cytokine producers, plus a discrete number of  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$   $\text{IFN-}\gamma^+\text{IL-2}^+\text{TNF}^+$  triple-cytokine producers. The MPDN-treated animals generated more  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  single-cytokine producers of IL-2, along with  $\text{CD4}^+$   $\text{IFN-}\gamma^+\text{IL-2}^+$  and  $\text{TNF}^+\text{IL-2}^+$  double-cytokine producers. These animals also generated the greatest number of  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$   $\text{IFN-}\gamma^+\text{IL-2}^+\text{TNF}^+$  triple-cytokine producers (Fig 4A and 4B).

## Discussion

Anti-TNF antibodies, MPDN and MTX are among the immunosuppressants most often used to treat rheumatoid arthritis, lupus erythematosus and inflammatory bowel disease [26]. Moreover, patients thus treated who live in *Leishmania*-endemic areas are at greater risk of infection by this parasite [27,28]. The present work compares the parasite load in, and immune response of, mice treated with these agents that were infected with *L. infantum*. The results show that these treatments influence the course of infection.

TNF plays a central role in the response to infection by *Leishmania*, promoting the activation of infected macrophages [29]. In the present model, the continued administration of anti-TNF antibodies led to an increased liver parasite load. The liver experiences the highest parasite loads of any organ in the first weeks of infection, but later these fall spontaneously [30,31]. The present results show that the administration of anti-TNF antibodies impedes this natural resolution. On the other hand, in this mouse model while granuloma formation and self-cure



**Fig 4. Cytokine-producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from the spleen of immunosuppressant-treated mice infected with *L. infantum*, following stimulation with soluble *Leishmania* antigen (SLA).** C57BL/6 mice (n = 6 per group) were infected one week after starting drug treatment with 1x10<sup>7</sup> *L. infantum* promastigotes and four weeks later the cytokine-producing capacity of T CD4<sup>+</sup> (A) and T CD8<sup>+</sup> (B) cells was determined by Boolean gating based on the expression of the cytokines IFN- $\gamma$ , TNF and IL-2 (single-, double- and triple-cytokine producers). The upper graphs show the frequencies of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells producing one, two or three types of cytokine (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF<sup>+</sup> and IL-2<sup>+</sup>) in pooled splenocytes from each group of treated animals. The lower graphs show the percentage of total T cells that were IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> or TNF<sup>+</sup> or IL-2<sup>+</sup> single-cytokine producers (+), IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> or TNF<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> double-cytokine producers (++) and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> triple-cytokine producers (+++) in each group of mice. MPDN = methylprednisolone, anti-TNF = anti-tumour necrosis factor antibodies, MTX = methotrexate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009126.g004>

occurs in liver, the immune response against *Leishmania* begins to fail in the spleen and leads to uncontrolled parasite multiplication during the chronic phase of the infection [32]. Interestingly, although our analysis was performed before the chronic stage, we found in the spleen of control animals the highest parasite load. T cell exhaustion and tissue damage mediated by an excessive production of TNF (among other cytokines) lead to the remodelling of its architecture, an ineffective cellular response and compensatory mechanisms, such as IL-10 production, that promote parasite persistence [33]. Thus, anti-TNF treatment could reduce this host detrimental effect during the acute phase and delay the dysfunction of the spleen. Further

experiments are necessary, including histological analysis and a continuous follow up of the disease progression to the chronic phase, in order to assess this question in mice models.

The anti-TNF animals also showed elevated titres of antibodies to *Leishmania*, a phenomenon that has been described as related to the presence of active VL in both patients and experimental animals [34,35]. In addition, the anti-TNF-treated mice showed a significant reduction in the number of circulating CD4<sup>+</sup> T cells to below normal limits. As several authors have reported, leucopenia regularly occurs with anti-TNF treatment [36,37], and in addition to that caused by VL could become a serious clinical problem. The anti-TNF treatment also influenced the functionality of the T cells in *L. infantum* infections; TNF antagonists are known to completely inhibit proinflammatory responses in patients [36,38]. Certainly, in TNF-knockout C57BL/6 mice infected with *Leishmania major*, the progression to VL is rapid, highlighting how important TNF is in the generation of cellular immunity against *Leishmania* [14,39]. Similarly, here we show for the first-time evidence in the liver of mice infected with viscerotropic species, which can be considered a site of acute self-resolving infection having similar features than asymptomatic individuals [40], of the risk of progressive visceral disease in otherwise asymptomatic infections. These findings are important since in recent years there has been an increase in the number of opportunistic *Leishmania* infections in patients treated with TNF antagonists, especially among those receiving monoclonal antibodies (Infliximab or Adalimumab) [41]. Clinicians should always weigh up the risk of the patient developing leishmaniasis before starting immunosuppressant treatment, but so far no guidelines are available to help in making such decisions.

Following infection, the MPDN-treated animals showed a reduction in the number of CD4<sup>+</sup> T cells similar to that seen for the control group—but much less of a reduction than that seen in the other groups of treated mice. This can be related to the lower organ parasite loads in the MPDN and control animals (the resolution of *Leishmania* infections depends on a good CD4<sup>+</sup> response [42]).

The humoral immune response to *Leishmania* is not protective; rather, it is a sign of advanced disease. Nevertheless, analysing the subtypes of IgG in experimental models is useful as a means of determining the kind of response underway [4,35]. In the present model, IgG2c antibodies were produced—a type related to the Th1 response. [43]. The MPDN-treated mice also produced IgG1 antibodies, which are associated with a Th2 response; this was not seen in any other group. However, the MPDN treatment also induced a clear Th1 response with T cells that produced different types of cytokine in the spleen. It has been amply described [4,42] that a specific Th1 response is necessary for resolving *Leishmania* infections; the cytokines produced, especially IFN- $\gamma$ , mediate this protection [44]. The induction of this kind of response is essential if any immunotherapy or vaccine is to be successful [45]. Nevertheless, the immunobiology of VL is complex and resolution of the infection depends on an equilibrium between inflammatory and regulatory responses [42] and it seems that, despite a marked IgG1 antibody production, MPDN did not affect severely the anti-*Leishmania* response in the liver, spleen or bone marrow in a short-term infection.

The MTX-treated mice had a higher bone marrow parasite load than the mice of any other group. The bone marrow is sensitive to MTX, which suppress its function [46,47]. Interestingly, the spleen parasite load was lower in these mice than in either the controls or the other groups of treated animals. It has been reported that MTX has an antiparasitic effect against *Plasmodium vivax* and *Leishmania tropica* via its reduction of folate availability; by binding to parasite dihydrofolate reductase it reduces the availability of folate, which is essential to the survival of trypanosomatids [48,49]. However, it is important to note that *Leishmania* promastigotes has been described as having the potential to generate rapid resistance to methotrexate [50,51], which may trigger a worsening of the disease, especially in endemic areas of

leishmaniasis. It is therefore necessary to monitor both aspects over time in order to better establish the relationship between *Leishmania* and the immunosuppressant MTX.

Patients treated with MTX appear to be at greater risk of VL than the immunocompetent population [52]. However, this treatment can be administered for over 60 months without greatly increasing this risk. In comparison, this risk becomes increased after just 17.5 months when TNF antagonists are administered [26,41].

In conclusion, the present results show that immunosuppressant agents can influence the immune response to *Leishmania* infection and the course of disease, even after a short immunosuppression period. The finding that treatment with anti-TNF antibodies can increase the liver parasite load is important given the many people treated with this agent in *Leishmania*-endemic areas [38,53]. Further analyses are necessary to evaluate if infection after long-term immunosuppression have even more harmful effects on the patient during parasite colonization and VL progression. Clinicians need to bear in mind the risk of leishmaniasis to patients thus treated, and how the dose employed might influence this. Likewise, the use immunological and molecular diagnostic tools to detect asymptomatic individuals and opportunistic infections in the follow up of immunosuppressed patients should be considered in endemic areas. Some parameters analysed in this work related with the T cell profile and the quality of the cellular response, in addition to those evaluated in future investigations, will help physicians to monitor these patients.

## Supporting information

**S1 Fig. Gating strategy used in the analysis of cell cultures.** The first gate, FSC vs. SSC, was used to select the lymphocyte populations. Singlets were removed via the plot FSC-A vs. FSC-H. The CD3<sup>+</sup> T cell population was selected by viability marking (LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit), and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> populations then distinguished. IFN- $\gamma$ , TNF and IL-2 production by each population was then determined using a Boolean gating. (TIF)

**S2 Fig. Titre of IgG1 antibodies against soluble *Leishmania* antigen in immunosuppressed C57BL/6 mice infected with *L. infantum*.** One week after starting immunosuppressive treatment mice (n = 6 per group) were infected with  $1 \times 10^7$  *L. infantum* promastigotes. Median and whisker (min to max) plots for IgG1 titre at the end of the first (W1) and fourth (W4) weeks after infection for animals in all treatment groups. \*p<0.05 \*\*p<0.001.

MPDN = methylprednisolone, anti-TNF = anti-tumour necrosis factor antibodies, MTX = methotrexate. (TIF)

**S3 Fig. Cytokine-producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from the spleen of immunosuppressant-treated mice infected with *L. infantum*, following stimulation with  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 cocktail.** C57BL/6 mice (n = 6 per group) were infected one week after starting drug treatment with  $1 \times 10^7$  *L. infantum* promastigotes and four weeks later the cytokine-producing capacity of T CD4<sup>+</sup> (A) and T CD8<sup>+</sup> (B) cells was determined by Boolean gating based on the expression of the cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-2 (single-, double- and triple-cytokine producers). The upper graphs show the frequencies of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells producing one, two or three types of cytokine (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF<sup>+</sup> and IL-2<sup>+</sup>) in pooled splenocytes from each group of treated animals. The lower graphs show the percentage of total T cells that were IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> or TNF<sup>+</sup> or IL-2<sup>+</sup> single-cytokine producers (+), IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> or IL-2<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> double-cytokine producers (++) , and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> triple-cytokine producers (+++) in each group of

mice. MPDN = methylprednisolone, anti-TNF = anti-tumour necrosis factor antibodies, MTX = methotrexate.  
(TIF)

## Author Contributions

**Conceptualization:** Jose Carlos Solana, Eugenia Carrillo, Javier Moreno.

**Data curation:** Lorena Bernardo, Jose Carlos Solana, Eugenia Carrillo.

**Formal analysis:** Lorena Bernardo, Jose Carlos Solana, Alba Romero-Kauss, Carmen Sánchez.

**Funding acquisition:** Javier Moreno.

**Investigation:** Lorena Bernardo, Jose Carlos Solana, Alba Romero-Kauss, Eugenia Carrillo, Javier Moreno.

**Methodology:** Lorena Bernardo, Jose Carlos Solana, Alba Romero-Kauss, Carmen Sánchez, Eugenia Carrillo.

**Project administration:** Javier Moreno.

**Resources:** Javier Moreno.

**Software:** Lorena Bernardo, Jose Carlos Solana, Alba Romero-Kauss, Carmen Sánchez.

**Supervision:** Carmen Sánchez, Eugenia Carrillo, Javier Moreno.

**Visualization:** Eugenia Carrillo, Javier Moreno.

**Writing – original draft:** Lorena Bernardo, Jose Carlos Solana, Eugenia Carrillo.

**Writing – review & editing:** Jose Carlos Solana, Eugenia Carrillo, Javier Moreno.

## References

1. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012; 7(5):e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671> PMID: 22693548.
2. WHO. Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region. 2017 [14 November 2019]. <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/978-92-89052-51-1/en/>.
3. Goto H, Lindoso JA. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. Braz J Med Biol Res. 2004; 37(4):615–23. Epub 2004/04/06. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004000400020> PMID: 15064826.
4. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. Parasit Vectors. 2016; 9:118. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1412-x> PMID: 26932389.
5. Botana L, Ibarra-Meneses AV, Sanchez C, Castro A, San Martin JV, Molina L, et al. Asymptomatic immune responders to *Leishmania* among HIV positive patients. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13(6): e0007461. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007461> PMID: 31158223.
6. Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. Indian J Med Res. 2006; 123(3):357–88. Epub 2006/06/17. PMID: 16778317.
7. Carrillo E, Carrasco-Anton N, Lopez-Medrano F, Salto E, Fernandez L, San Martin JV, et al. Cytokine Release Assays as Tests for Exposure to *Leishmania*, and for Confirming Cure from Leishmaniasis, in Solid Organ Transplant Recipients. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(10):e0004179. Epub 2015/10/27. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004179> PMID: 26496365.
8. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. Crit Rev Oncol Hematol. 2005; 56(1):23–46. Epub 2005/07/26. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2005.03.012> PMID: 16039869.

9. Antinori S, Schifanella L, Corbellino M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(2):109–18. Epub 2011/05/03. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1276-0> PMID: 21533874.
10. Glans H, Dotevall L, Sobirk SK, Farnert A, Bradley M. Cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis in Sweden from 1996–2016: a retrospective study of clinical characteristics, treatments and outcomes. *BMC Infect Dis*. 2018; 18(1):632. Epub 2018/12/12. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3539-1> PMID: 30526519.
11. Pittalis S, Nicastrì E, Spinazzola F, Ghirga P, De Marco M, Paglia MG, et al. *Leishmania infantum* leishmaniasis in corticosteroid—treated patients. *BMC Infect Dis*. 2006; 6:177. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-177> PMID: 17176478.
12. Castellino G, Govoni M, Lo Monaco A, Montecucco C, Colombo F, Trotta F. Visceral leishmaniasis complicating a connective tissue disease: three case reports from Italy. *Lupus*. 2004; 13(3):201–3. Epub 2004/05/04. <https://doi.org/10.1191/0961203304lu518oa> PMID: 15119550
13. Tumang MC, Keogh C, Moldawer LL, Helfgott DC, Teitelbaum R, Hariprashad J, et al. Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 1994; 153(2):768–75. Epub 1994/07/15. PMID: 8021511.
14. Fromm PD, Kling JC, Remke A, Bogdan C, Korner H. Fatal Leishmaniasis in the Absence of TNF Despite a Strong Th1 Response. *Front Microbiol*. 2015; 6:1520. Epub 2016/02/03. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01520> PMID: 26834705.
15. Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2007; 65(3):168–73. Epub 2007/10/10. PMID: 17922664.
16. Thomas S, Fisher KH, Snowden JA, Danson SJ, Brown S, Zeidler MP. Methotrexate Is a JAK/STAT Pathway Inhibitor. *PLoS One*. 2015; 10(7):e0130078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130078> PMID: 26131691.
17. Nieto A, Dominguez-Bernal G, Orden JA, De La Fuente R, Madrid-Elena N, Carrion J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. *Vet Res*. 2011; 42:39. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-39> PMID: 21345200.
18. Loeuillet C, Banuls AL, Hide M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasit Vectors*. 2016; 9:144. Epub 2016/03/13. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1413-9> PMID: 26969511.
19. Sukura A, Soveri T, Lindberg LA. Superiority of methylprednisolone over dexamethasone for induction of *Pneumocystis carinii* infection in rats. *J Clin Microbiol*. 1991; 29(10):2331–2. <https://doi.org/10.1128/JCM.29.10.2331-2332.1991> PMID: 1939591.
20. Bigbee CL, Gonchoroff DG, Vratsanos G, Nadler SG, Haggerty HG, Flynn JL. Abatacept treatment does not exacerbate chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(8):2557–65. <https://doi.org/10.1002/art.22750> PMID: 17665452.
21. Iqbal MP, Ahmed M, Umer M, Mehboobali N, Qureshi AA. Effect of methotrexate and folinic acid on skeletal growth in mice. *Acta Paediatr*. 2003; 92(12):1438–44. PMID: 14971796.
22. Mahajan MM, Cheng B, Beyer AI, Mulvaney US, Wilkinson MB, Fomin ME, et al. A quantitative assessment of the content of hematopoietic stem cells in mouse and human endosteal-bone marrow: a simple and rapid method for the isolation of mouse central bone marrow. *BMC Hematol*. 2015; 15:9. <https://doi.org/10.1186/s12878-015-0031-7> PMID: 26161262.
23. Cruz I, Canavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, et al. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002; 96 Suppl 1:S185–9. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90074-x](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90074-x) PMID: 12055836.
24. Cunha J, Carrillo E, Sanchez C, Cruz I, Moreno J, Cordeiro-da-Silva A. Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatotropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2013; 6:122. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-122> PMID: 23622683.
25. Fernandez L, Carrillo E, Sanchez-Sampedro L, Sanchez C, Ibarra-Meneses AV, Jimenez MA, et al. Antigenicity of *Leishmania*-Activated C-Kinase Antigen (LACK) in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, and Protective Effect of Prime-Boost Vaccination With pCI-neo-LACK Plus Attenuated LACK-Expressing Vaccinia Viruses in Hamsters. *Front Immunol*. 2018; 9:843. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00843> PMID: 29740446.
26. Xynos ID, Tektonidou MG, Pikazis D, Sipsas NV. Leishmaniasis, autoimmune rheumatic disease, and anti-tumor necrosis factor therapy, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(6):956–9. <https://doi.org/10.3201/eid1506.090101> PMID: 19523302.

27. van Griensven J, Carrillo E, Lopez-Velez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(4):286–99. Epub 2014/01/24. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12556> PMID: 24450618.
28. Besada E, Njalla RJ, Nossent JC. Imported case of visceral leishmaniasis presenting as pancytopenia in a Norwegian patient treated with methotrexate and etanercept for psoriasis arthritis. *Rheumatol Int*. 2013; 33(10):2687–9. Epub 2012/08/14. <https://doi.org/10.1007/s00296-012-2483-4> PMID: 22886470.
29. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev*. 2004; 201:239–53. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00188.x> PMID: 15361245.
30. Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2004; 20(11):524–30. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.009> PMID: 15471704.
31. Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol*. 2007; 85(2):138–47. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100011> PMID: 17146466.
32. Carrion J, Nieto A, Iborra S, Iniesta V, Soto M, Folgueira C, et al. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol*. 2006; 28(5):173–83. Epub 2006/04/25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00817.x> PMID: 16629702.
33. Montes de Oca M, Engwerda CR, Kaye PM. Cytokines and splenic remodelling during *Leishmania donovani* infection. *Cytokine*. 2020; 2(4):100036. <https://doi.org/10.1016/j.cytok.2020.100036>
34. Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*. 2005; 201(5):747–54. <https://doi.org/10.1084/jem.20041470> PMID: 15753208.
35. Perez-Cabezas B, Cecilio P, Gaspar TB, Gartner F, Vasconcellos R, Cordeiro-da-Silva A. Understanding Resistance vs. Susceptibility in Visceral Leishmaniasis Using Mouse Models of *Leishmania infantum* Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019; 9:30. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00030> PMID: 30881923.
36. Azevedo VF, Silva MB, Marinello DK, Santos FD, Silva GB. Leukopenia and thrombocytopenia induced by etanercept: two case reports and literature review. *Rev Bras Reumatol*. 2012; 52(1):110–2. Epub 2012/01/31. PMID: 22286650.
37. Montane E, Salles M, Barriocanal A, Riera E, Costa J, Tena X. Antitumor necrosis factor-induced neutropenia: a case report with double positive rechallenges. *Clin Rheumatol*. 2007; 26(9):1527–9. Epub 2006/10/13. <https://doi.org/10.1007/s10067-006-0415-y> PMID: 17031483.
38. De Leonardis F, Govoni M, Lo Monaco A, Trotta F. Visceral leishmaniasis and anti-TNF-alpha therapy: case report and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol*. 2009; 27(3):503–6. PMID: 19604446.
39. Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C, et al. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol*. 2001; 166(6):4012–9. Epub 2001/03/10. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.4012> PMID: 11238648.
40. Bunn PT, Montes de Oca M, de Labastida Rivera F, Kumar R, Ng SS, Edwards CL, et al. Distinct Roles for CD4(+) Foxp3(+) Regulatory T Cells and IL-10-Mediated Immunoregulatory Mechanisms during Experimental Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani*. *J Immunol*. 2018; 201(11):3362–72. Epub 2018/10/26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701582> PMID: 30355785.
41. Zanger P, Kotter I, Kremsner PG, Gabrysch S. Tumor necrosis factor alpha antagonist drugs and leishmaniasis in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(7):670–6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03674.x> PMID: 21985586.
42. Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(7):e2914. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002914> PMID: 25010815.
43. Gracie JA, Bradley JA. Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur J Immunol*. 1996; 26(6):1217–21. Epub 1996/06/01. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260605> PMID: 8647195.
44. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(11):845–58. <https://doi.org/10.1038/nri933> PMID: 12415308.
45. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med*. 2007; 13(7):843–50. <https://doi.org/10.1038/nm1592> PMID: 17558415.
46. Gaies Emna J N, Trabelsi Sameh, Salouage Issam, Charfi Rim, Lakhel Mohamed and Klouz Anis. Methotrexate Side Effects: Review Article. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*. 2012; 3(4). <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000125>

47. Mizusawa T, Kamimura K, Sato H, Suda T, Fukunari H, Hasegawa G, et al. Methotrexate-related lymphoproliferative disorders in the liver: Case presentation and mini-review. *World J Clin Cases*. 2019; 7(21):3553–61. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v7.i21.3553> PMID: [31750337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31750337/).
48. Nduati E, Diriye A, Ommeh S, Mwai L, Kiara S, Masseno V, et al. Effect of folate derivatives on the activity of antifolate drugs used against malaria and cancer. *Parasitol Res*. 2008; 102(6):1227–34. Epub 2008/02/09. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0897-4> PMID: [18259776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18259776/).
49. Mahmoudvand H, Kheirandish F, Mirbadie SR, Kayedi MH, Rezaei Riabi T, Ghasemi AA, et al. The Potential Use of Methotrexate in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: In Vitro Assays against Sensitive and Meglumine Antimoniate-resistant Strains of *Leishmania tropica*. *Iran J Parasitol*. 2017; 12(3):339–47. PMID: [28979343](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28979343/).
50. Gazanion E, Fernandez-Prada C, Papadopoulou B, Leprohon P, Ouellette M. Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113(21):E3012–21. Epub 2016/05/11. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520693113> PMID: [27162331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27162331/).
51. Ubeda JM, Legare D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, et al. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol*. 2008; 9(7):R115. Epub 2008/07/22. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-7-r115> PMID: [18638379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18638379/).
52. Reina D, Cerda D, Guell E, Martinez Montauti J, Pineda A, Corominas H. Visceral leishmaniasis in a rheumatoid arthritis patient receiving methotrexate. *Reumatol Clin*. 2017; 13(6):354–6. Epub 2016/08/16. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2016.07.005> PMID: [27523470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27523470/).
53. Keyser FD. Choice of Biologic Therapy for Patients with Rheumatoid Arthritis: The Infection Perspective. *Curr Rheumatol Rev*. 2011; 7(1):77–87. <https://doi.org/10.2174/157339711794474620> PMID: [22081766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22081766/).