



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS AMASTIGOTES DE
Leishmania mexicana DE DIFERENTES CEPAS EN LA
PRESENCIA PROTEÍNICA Y FUNCIÓN DE LA
ARGINASA 1 (ARG-1) EN CÉLULAS DENDRÍTICAS
MURINAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

OMAR BETANCOURT LEÓN



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Betancourt

León

Omar

56 66 80 51

Universidad Nacional Autónoma de
México

Facultad de Ciencias

Biología

307047489

2. Datos del tutor

Dra.

Laila

Gutiérrez

Kobeh

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Paz María Silvia

Salazar

Schettino

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Armando

Pérez

Torres

5. Datos del sinodal 3

Dra.

María Eugenia

Gonsebatt

Bonaparte

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Isabel Cristina

Cañeda

Guzmán

7. Datos del trabajo escrito

Análisis del efecto de los amastigotes

de *Leishmania mexicana* de diferentes cepas

en la presencia proteínica y función de la arginasa 1

(ARG-1) en células dendríticas murinas

67 p.

2015

Agradecimientos

A el proyecto Papiit, DGAPA, UNAM no. IN217913 por su apoyo con todas las herramientas necesarias para este trabajo.

A todos los profesores y académicos que me compartieron sus conocimientos y experiencias y me formaron como profesionista y científico, a mi tutora la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, al Biól. Arturo Alfredo Wilkins Rodríguez, al Biól. Jorge Rodríguez González, a la M. en C. Alma Reyna Escalona Montaña, a la Dra. Edith Araceli Fernández Figueroa y a mis sinodales la Dra. Paz María Silvia Salazar Schettino, el Dr. Armando Pérez Torres, la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y la M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a las Facultades de Ciencias y de Medicina.

A todos mis amigos quienes me han hecho crecer como persona.

Y finalmente a mi madre y a mi padre, ya que sin ellos nada hubiera sido posible.

Resumen

Leishmania, es un género de protozoarios parásitos que son el agente causal de la leishmaniasis, una enfermedad infecciosa que presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde úlceras cutáneas hasta lesiones que afectan las mucosas y diversos órganos internos del cuerpo. Estudios con diferentes cepas de una misma especie de *Leishmania* han mostrado que éstas pueden producir diferentes formas clínicas de leishmaniasis. La especie *Leishmania mexicana* es causante de dos formas clínicas, la leishmaniasis cutánea localizada y la leishmaniasis cutánea difusa. Por otra parte, la enzima arginasa 1 (ARG-1) es inducida posiblemente por *L. mexicana* en las células dendríticas como un mecanismo que favorece la supervivencia y con ello la persistencia de la enfermedad. Con base en lo anterior, es posible que el grado de patogenicidad de diferentes cepas de *L. mexicana* se deba en parte a una capacidad diferencial de modular la inducción y actividad de la ARG-1, por lo que en este estudio se evaluó el efecto de dos diferentes cepas de *L. mexicana*, una aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada y otra de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa en la inducción y actividad de la ARG-1 en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón. El resultado obtenido fue que ambas cepas mostraron una capacidad similar de inducir la presencia proteínica de la ARG-1 en las células dendríticas, sin embargo, no ocurrió lo mismo con la actividad enzimática, la cual se debió en mayor medida al estímulo producido por la citocina IL-4.

Índice

1. Introducción.....	6
1.1 <i>Leishmania</i> : clasificación y biología.....	6
1.2 La leishmaniasis.....	9
1.3 Diferencias intraespecíficas en las especies de <i>Leishmania</i> : presencia de cepas.....	12
1.4 Epidemiología de la leishmaniasis.....	14
1.5 Respuesta inmune contra <i>Leishmania</i>	16
1.5.1 Interacción entre las células presentadoras de antígenos (APCs) y <i>Leishmania</i>	16
1.5.2 Las APCs que fagocitan a <i>Leishmania</i> son activadas de manera clásica o alternativa por las citocinas de la respuesta inmune.....	18
1.5.3 Las respuestas Th1 y Th2 conducen a la resistencia o promueven el desarrollo de la leishmaniasis respectivamente.....	19
1.5.4 Las respuestas Th1 y Th2 en el modelo murino y en humanos.....	20
1.6 Las células dendríticas (DCs).....	21
1.6.1 Maduración de las DCs.....	23
1.7 La enzima Arginasa 1 (ARG-1).....	24
1.7.1 El papel de la ARG-1 en la leishmaniasis.....	27
2. Justificación.....	30
3. Hipótesis.....	32
4. Objetivo general.....	32
5. Objetivos particulares.....	32
6. Materiales y métodos.....	33

6.1 Obtención de las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC).....	33
6.2 Caracterización de las BMDC.....	34
6.3 Tratamiento de las BMDC con diferentes estímulos e infección con los amastigotes de <i>L. mexicana</i>	36
6.4 Tinción de las BMDC por inmunofluorescencia.....	38
6.5 Lisis de las BMDC.....	40
6.6 Determinación de la presencia proteínica de la ARG-1.....	41
6.7 Determinación de la actividad de la ARG-1.....	44
7. Resultados.....	46
7.1 Caracterización de las BMDC.....	46
7.2 Infección de las BMDC con diferentes cepas de amastigotes de <i>L. mexicana</i>	47
7.3 Análisis de la presencia proteínica de la ARG-1.....	49
7.4 Análisis de la actividad de la ARG-1.....	51
8. Discusión.....	53
9. Conclusiones.....	60
10. Perspectivas.....	61
11. Bibliografía.....	62

1. Introducción

1.1 *Leishmania*: clasificación y biología

Leishmania es un género de protozoarios parásitos que pertenece al *Phylum Sarcocystophora*, a la clase *Zoomastigophorea*, al orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae* (Alvar, 2001). El género *Leishmania* se divide a su vez en dos subgéneros que son: 1) *Leishmania*, que agrupa complejos de especies, entendiéndose éstos como especies crípticas y aislamientos relacionados cuyos miembros individuales pueden representar más de una especie (Cardozo *et al.*, 2009; Duminil *et al.*, 2011). Los complejos de especies son: *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* y *Leishmania mexicana*; 2) *Viannia* agrupa los complejos de especies de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania guyanensis* (OMS, 2010). Dado que los parásitos del género *Leishmania* requieren de un vector díptero para llegar al hospedero definitivo, los dos subgéneros se han establecido de acuerdo al sitio de desarrollo en el intestino del vector. El subgénero *Viannia* se desarrolla en el intestino medio posterior y el subgénero *Leishmania* en el intestino medio anterior. Sin embargo, no existen diferencias morfológicas entre las distintas especies del género *Leishmania*, por lo que no es posible identificar una especie de acuerdo a la morfología. La identificación de las especies es de suma importancia ya que aporta información útil sobre la evolución de la enfermedad, la epidemiología y el tratamiento (Alvar, 2001; OMS, 2010). Las especies de *Leishmania* se han identificado tomando en cuenta varios aspectos de su biología, tales como la historia natural de los hospederos, la especificidad del vector, la distribución geográfica, además de

utilizar herramientas de biología molecular para el análisis de isoenzimas o la amplificación del DNA, secuenciación y análisis de polimorfismos, con lo que se han definido perfiles genéticos y moleculares de cada una de las especies (Marcili *et al.*, 2014; Becerril, 2008; OMS, 2010).

Leishmania presenta dos estadios morfológicos y funcionales dentro del ciclo de vida, el promastigote, de morfología alargada, con un cinetoplasto y un flagelo y el amastigote, de morfología redondeada y con un cinetoplasto cercano al núcleo. El estadio de promastigote a su vez se divide en dos estadios funcionales, el procíclico, que se caracteriza por ser la forma replicativa del parásito y el metacíclico que se caracteriza por ser infectivo.

A)



B)



Figura 1. Estadios de *Leishmania*. **A.** Muestra una fotomicrografía teñida con Giemsa del estadio de promastigote de *Leishmania ssp.* **B.** Muestra una fotomicrografía teñida con Giemsa de un macrófago (MΦ) infectado con amastigotes de *Leishmania ssp.* (Tomado de Becerril, 2008).

El proceso de cambio de promastigote procíclico a metacíclico se denomina metaciclogénesis y consta de cambios genéticos y bioquímicos que modulan funciones biológicas en el parásito y le confieren la propiedad de ser infectivo,

mientras que el estadio de amastigote siempre es infeccioso (Muskus y Marín, 2002).

El ciclo de vida de *Leishmania* comienza cuando el vector, un díptero de la familia *Psychodidae*, que en el Viejo Mundo pertenece al género *Phlebotomus* y en el Nuevo Mundo al género *Lutzomyia*, inyecta al hospedero los parásitos al alimentarse (Fig. 2). Algunos de los hospederos son el hombre (*Homo sapiens*), el perro (*Canis familiaris*) y la zarigüeya (*Didelphis marsupialis*) (Muskus y Marín, 2002).

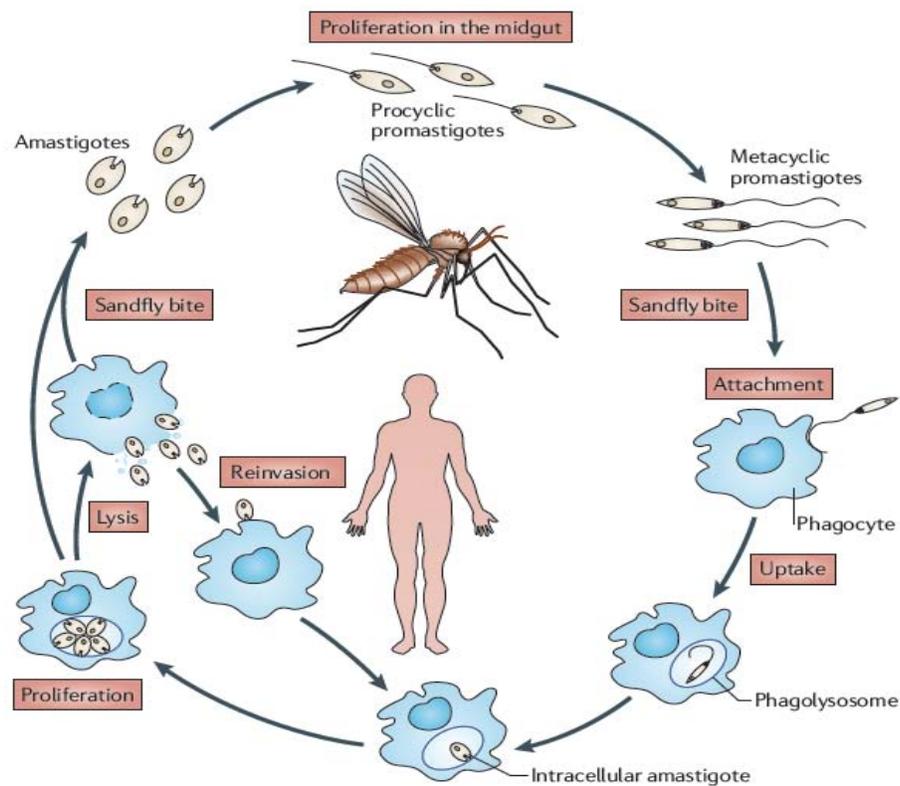


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania*. Los promastigotes procíclicos se diferencian en promastigotes metacíclicos (estadio infeccioso) en el vector. Los promastigotes metacíclicos se ubican en una invaginación del intestino, el vector al alimentarse los regurgita en el hospedero y son fagocitados por varios tipos celulares que se encuentran en el medio local. Los parásitos se desarrollan y se duplican en la célula hospedera como amastigotes aflagelados, los cuales inducen la lisis de la célula e infectan más células. El ciclo se completa cuando el vector se alimenta con la sangre de un hospedero infectado y adquiere los amastigotes contenidos en las células infectadas, mismos que cambian al estadio de promastigote procíclico en el intestino del vector (Tomado de Kaye y Scott, 2011).

Los parásitos inoculados al hospedero por el vector se encuentran en el estadio de promastigote metacíclico y son fagocitados por varios tipos de células que podrán eliminarlos o bien los parásitos pueden superar este mecanismo inmunológico y multiplicarse en estas células hospederas en las que se desarrollan al estadio de amastigote. Estos proliferan en la célula infectada hasta lizarla, quedando libres en el medio extracelular donde infectan a nuevas células. El ciclo continúa cuando un nuevo vector se alimenta de un hospedero infectado e ingiere células infectadas con amastigotes, estos últimos llegan al intestino del vector donde se transforman al estadio de promastigote procíclico (Fig. 2). Después de varios días en el intestino del vector, los promastigotes alcanzan la metaciclogénesis y migran hacia la probóscide, con lo que se cierra el ciclo (Alvar, 2001).

1.2 La leishmaniasis

Leishmania es el agente causal de la leishmaniasis, una enfermedad infecciosa que presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde úlceras cutáneas, que pueden sanar por sí mismas, hasta lesiones que afectan las mucosas y diversos órganos internos del cuerpo (Wanasen y Soong, 2008). Las formas clínicas de la enfermedad dependen tanto de la especie y cepa infectante, como de la respuesta inmune del hospedero (Liese *et al.*, 2008; Ampuero, 2000; Kumar, 2013) y son principalmente tres: la leishmaniasis cutánea (LC), la leishmaniasis mucocutánea (LMC) y la leishmaniasis visceral (LV).

La LC es la forma más común de la enfermedad y a su vez tiene dos variaciones clínicas con pronóstico y características inmunológicas diferentes, la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). La LCL se

distingue por la presencia de úlceras únicas o múltiples redondeadas, de bordes indurados e indoloras, aparecen pocos días después de la picadura del vector infectado y en general la piel que rodea la úlcera no muestra alteraciones, por lo que tiene apariencia sana. Algunos pacientes con LCL curan de manera espontánea, excepto cuando la lesión ocurre en la oreja donde es crónica y mutilante (Becerril, 2008). La LCL es provocada por las especies *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* y *L. donovani* en el Viejo Mundo y por las especies *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* y *L. infantum* en el Nuevo Mundo. La LCD se caracteriza por la falta de respuesta inmune celular, lo que permite la diseminación de los parásitos vía sanguínea y linfática con desarrollo subsecuente de lesiones nodulares, pápulas, máculas o placas cutáneas muy diseminadas en toda la piel con excepción del cuero cabelludo. Las diferentes lesiones cutáneas en la LCD se caracterizan por no presentar ulceraciones (Becerril, 2008). En el Viejo Mundo la LCD es ocasionada principalmente por *L. aethiopica* aunque también puede ser ocasionada por las mismas especies que producen LCL. En el Nuevo Mundo la LCD es ocasionada por las especies *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* (OMS, 2010).

La LMC resulta en la invasión y destrucción de la mucosa nasofaríngea, que lleva a la degeneración del tabique nasal, lo que desfigura la fisionomía gravemente. Esta forma clínica puede presentarse con lesiones cutáneas o desarrollarse sin las mismas, aunque años después pueden aparecer. Las lesiones son de color violeta y se caracterizan por tener muy pocos parásitos. Los daños son consecuencia de la reacción inflamatoria que ocurre en las mucosas (Becerril, 2008). La LMC es

ocasionada por las especies *L. infantum*, *L. major* y *L. tropica* en el Viejo Mundo y por *L. braziliensis* y *L. panamensis* en el Nuevo Mundo (OMS, 2010).

A)



B)



Figura 3. Lesiones características de la LCL y la LCD. A. Úlcera con bordes indurados en el brazo de un paciente con LCL. **B.** Lesiones nodulares múltiples en la mano de un paciente con LCD (Tomado de Becerril, 2008).

La LV es la forma clínica más severa de la enfermedad ocasionando hepatoesplenomegalia, palidez, debilidad, fiebre intermitente, pérdida de peso, hemorragias, anemia, caquexia, linfadenopatías, oscurecimiento de la piel de la cara, manos, pies, abdomen y raramente puede observarse algún nódulo o úlcera cutánea o alguna lesión mucosa que contenga parásitos. A medida que avanza la enfermedad se hacen evidentes signos de desnutrición como edema y alteraciones de la piel y pelo. La LV es 100% letal si no se recibe tratamiento y aún con éste, el riesgo de muerte es muy alto (Becerril, 2008; Ampuero, 2000; Alvar, 2001). La LV es ocasionada por las especies *L. donovani*, *L. infantum* y *L. tropica* en el Viejo Mundo y en el Nuevo Mundo también por la especie *L. infantum* (OMS, 2010).

1.3 Diferencias intraespecíficas en las especies de *Leishmania*: presencia de cepas

Como ya se mencionó, las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis se han adjudicado tanto a la respuesta inmune como a la genética del hospedero, así como a la especie del parásito. Sin embargo, siendo que una misma especie, como por ejemplo *L. mexicana*, puede causar dos formas clínicas de características opuestas como lo son la LCL y la LCD, es probable que existan diferencias intraespecíficas presentes en aislados o cepas derivados de una misma especie. Una cepa se define como la descendencia de un aislado único obtenido en cultivo puro y usualmente se realiza una sucesión de cultivos derivados del aislado inicial para preservar la cepa (Dijkshoorn *et al.*, 2000). Existen varias cepas de referencia de *Leishmania* que se utilizan para la identificación de los parásitos a nivel de género. Algunos ejemplos de estas cepas de referencia son la MHOM/BZ/82/BEL21 para la especie *L. mexicana* y la MHOM/SU/73/5-ASKH para la especie *L. major* (OMS, 2010). Existen diferentes reportes que demuestran que la cepa infectante puede también influir en el desarrollo de la forma clínica de la enfermedad (Markikou *et al.*, 2012; Ritter *et al.*, 2004). Por ejemplo, aunque la infección con *L. major* típicamente produce LC y la infección con *L. donovani* produce LV, se ha observado que en algunas ocasiones la infección con estas especies puede ocasionar el desarrollo de otras formas clínicas (Alimohammadian *et al.*, 2010). Otro ejemplo de este fenómeno es el caso de *L. infantum*, agente causal de la LV en Europa Sur-Occidental, el Norte y Este de África y China, donde se ha observado que diferentes cepas que presentan el zimodema MON-1, aislado de los vectores *Phlebotomus ariasi* y *Phlebotomus*

perniciosus, inducen LC sin llegar a la forma visceral en sus hospederos más comunes que son cánidos y humanos (Baptista *et al.*, 2007). Por otro lado, estudios realizados con diferentes cepas de *L. major* endémicas de Irán mostraron también diferentes grados de virulencia e infectividad en infecciones experimentales con ratones BALB/c en los cuales a las 8 semanas posteriores a la infección, una cepa denominada Shiraz produjo lesiones de menor tamaño (3.02 mm) en comparación con las producidas por la cepa Kashan (5.20 mm). Se determinaron también las cargas parasitarias en los ganglios linfáticos de los ratones infectados y se encontraron también diferencias significativas entre las cepas (Alimohammadian *et al.*, 2010). Otro estudio de LC experimental realizado con diferentes cepas de *L. major* en ratones C57BL/6 con fenotipo silvestre (B6.WT) y con fenotipo inducido deficiente en la producción de la citocina TNF, la cual es importante en la respuesta inmune contra *Leishmania*, nombrado (B6 TNF^{-/-}), mostró que la cepa BNI provocó una LC más severa en los ratones B6TNF^{-/-} en comparación con la infección causada por la cepa Friedlin. En este último caso los ratones mostraron resistencia parcial a la infección con la presencia de lesiones crónicas, pero sin letalidad. Adicionalmente, en este estudio se demostró que macrófagos (MΦs) infectados con la cepa Friedlin fueron más eficientes en la eliminación de los parásitos en comparación con los MΦs infectados con la cepa BNI (Ritter *et al.*, 2004). Existe otro reporte en el que se hizo un análisis histopatológico de diferentes órganos de ratones BALB/c que fueron inoculados en el cojinete plantar con tres diferentes aislados de la cepa de referencia M2903 de la especie *L. braziliensis* nombrados I, II y III. Los aislados mostraron diferencias en el grado de infectividad en células mononucleares y aumento en el tamaño del

cojinete plantar. El aislado I fue el que mostró la mayor infectividad en células mononucleares a las 10 semanas posteriores a la infección y el aislado II fue el que provocó el mayor aumento de tamaño en el cojinete plantar. El aislado III como la cepa de referencia M2903 únicamente indujo un incremento en los megacariocitos del bazo (Pereira *et al.*, 2009).

El término clona, se utiliza para denotar la progenie de un individuo que se reproduce asexualmente (Dijkshoorn *et al.*, 2000) y un estudio en células dendríticas (DCs) humanas infectadas con diferentes clonas de *L. major*, mostró que una clona de alta virulencia estaba asociada a una infección significativamente mayor de DCs humanas, con una gran carga parasitaria, mientras que una clona de baja virulencia, infectó solo la mitad de las células proporcionadas por los donadores del estudio (Markikou *et al.*, 2012). En los estudios antes mencionados se evaluaron parámetros distintos, con el objetivo de determinar las diferencias de patogenicidad y virulencia entre los distintos individuos de una misma especie de *Leishmania*. Estas diferencias, se reflejan en las distintas formas clínicas de la enfermedad, aunque como se ha mencionado antes uno de los factores primordiales en la evolución de la enfermedad es la respuesta inmune del hospedero.

1.4 Epidemiología de la leishmaniasis

La leishmaniasis está presente en 98 países de los cuales es endémica en 80, se extiende por las regiones del Norte de África, Oriente Medio, el Sur de Europa, en México y América Central y América del sur. La leishmaniasis ocupa el noveno lugar en importancia dentro de las enfermedades infecciosas tropicales. Cerca de

2 millones de nuevos casos de leishmaniasis ocurren cada año, de los cuales el 50% ocurre en niños. Se calcula que en la actualidad existen más de 12 millones de personas infectadas en el mundo y unos 350 millones más están en riesgo de contraer la infección. La estimación anual de muertes por leishmaniasis es de 7000 (Dong y Uzonna, 2012). Se estima que en el mundo la LC tiene una incidencia de entre 700,000 y 1,200,000 casos anuales y la LV de 200,000 a 400,000 casos anuales (CDC, 2015). En México la mayoría de los casos de leishmaniasis corresponden a la forma clínica de la LCL y se concentran en la zona sureste del país, principalmente en los estados de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Yucatán, Quintana Roo y Campeche, aunque también se han encontrado casos en Nayarit, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Hidalgo y San Luis Potosí. La LCD tiene menor incidencia y está reportada en los mismos estados que la LCL, salvo en Yucatán y Quintana Roo. La especie causal de la LC en México, tanto la forma localizada como la difusa, es *L. mexicana*. Se han reportado casos de LMC en los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas y Oaxaca ocasionados por la especie *L. braziliensis*. Se han reportado también, aunque en menor medida, casos de LV en México en los estados de Guerrero, Chiapas, Puebla y Morelos ocasionados por *L. chagasi* (INDRE, 2015). La especie del vector que ha sido identificada como transmisora más común de la LC en México es *Lutzomyia olmeca*, aunque también se sospecha de otras especies posibles (González *et al.*, 2011).

1.5 Respuesta inmune contra *Leishmania*

1.5.1 Interacción entre las células presentadoras de antígenos (APCs) y *Leishmania*

Una vez que los promastigotes metacíclicos de *Leishmania* son inoculados en el hospedero por el vector, uno de los primeros elementos inmunológicos con los que se encuentran los parásitos son las células de Langerhans (Zuluaga y Robledo, 2004). Al penetrar los tejidos, los parásitos entran en contacto con otras APCs diferentes de las células de Langerhans, que son las células dendríticas (DCs) residentes y los macrófagos (MΦs). Los MΦs son las principales células hospederas de *Leishmania* (Dong y Uzonna, 2012), ya que en estas células se tiene la mayor evidencia de supervivencia y duplicación del parásito (Kaye y Scott, 2011), sin embargo estas células son también las mayores efectoras en la eliminación del parásito (Dong y Uzonna, 2012). Las DCs también tienen la capacidad de eliminar a *Leishmania* (Wilkins *et al.*, 2010), sin embargo éstas son menos efectivas en comparación con la de los MΦs. La función principal de las DCs es enlazar la respuesta inmune innata con la adaptativa y esta última contribuye a la activación de los MΦs, con lo que se consigue una respuesta eficiente contra la infección (Dong y Uzonna, 2012). Por lo anterior, ambos tipos celulares, tanto MΦs como DCs tienen un papel primordial en el combate y desarrollo de la enfermedad ya que funcionan como principales células hospederas y/o leishmanicidas. Además de los MΦs y las DCs, *Leishmania* infecta otras células tales como los neutrófilos y los fibroblastos (Wanasen y Soong, 2007; Liese *et al.*, 2008; Iniesta *et al.*, 2002; Modolell *et al.*, 2009).

Los promastigotes de *Leishmania* son fagocitados por los MΦs principalmente a través de la interacción con los receptores del complemento (CR1 y CR3), los FcγR, el receptor de manosa (MR) y la fibronectina (Mosser y Edelson, 1985; Wilson y Pearson, 1988; Chakraborty *et al.*, 2001). Las DCs fagocitan eficientemente a *Leishmania*, aunque se ha demostrado que el estadio que es fagocitado con mayor eficiencia es el amastigote y la capacidad fagocítica es limitada en comparación a la de los MΦs (Blank, *et al.*, 1993). Los receptores que participan en la fagocitosis de *Leishmania* en las DCs son los FcγR (Woelbing *et al.*, 2006) y los receptores de lectina tipo C (Colmenares *et al.*, 2002; Argueta *et al.*, 2015). Por otro lado, las moléculas gp63, lipofosfoglicano (LPG) y proteofosfoglicano (PPG) en la membrana de los promastigotes de *Leishmania*, son elementos importantes en la fagocitosis, ya que son blancos de opsoninas tales como C3b y C3bi. La proteína de unión a manosa y las galectinas también promueven la internalización del parásito. Las IgG son otros importantes promotores de la fagocitosis de *Leishmania*, ya que son reconocidas por los receptores FcγR presentes en los MΦs y las DCs (Woelbing *et al.*, 2006, Dong y Uzonna, 2012). Una vez fagocitado, el parásito queda contenido en una vacuola parasitófora o fagosoma, que subsecuentemente se fusiona con los lisosomas de la célula hospedera para formar un fagolisosoma. Los parásitos fagocitados, dada su condición intracelular, quedan protegidos de la formación del complejo de ataque a membranas (Brittingham *et al.*, 1995; Dong y Uzonna, 2012). La sobrevivencia en el fagolisosoma representa un reto para la mayoría de los microorganismos patogénicos y solo con la excepción de *Coxiella burnetti*,

Leishmania es el único microorganismo que puede sobrevivir y duplicarse en el fagolisosoma. La supervivencia de *Leishmania* en el fagolisosoma puede ocurrir debido a que el LPG inhibe las vías de señalización en el MΦ que permiten reclutar a la NADPH oxidasa en la membrana del fagolisosoma y con esto evitar la oxidación del NADPH que genera el estallido oxidativo (Naderer y McConville, 2008; Dong y Uzonna, 2012).

1.5.2 Las APCs que fagocitan a *Leishmania* son activadas de manera clásica o alternativa por las citocinas de la respuesta inmune

La producción de las citocinas proinflamatorias IL-1, TNF- α y particularmente de IL-12, a causa de la infección por *Leishmania*, conducen entre otros sucesos, a la activación de las células NK que son importantes productoras de IFN- γ y TNF- α (Prajeeth *et al.*, 2011; Bogdan, 2012). A su vez, estas citocinas son producidas por los linfocitos T CD4 Th1 y T CD8 de la respuesta inmune adaptativa en los casos en los que la infección se prolonga. El IFN- γ y el TNF- α activan a los MΦs y las DCs de manera clásica y con ello se potencian mecanismos leishmanicidas en estas células (Dong y Uzonna, 2012). Uno de estos mecanismos es la inducción de la enzima sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), que produce citrulina y óxido nítrico (NO), este último es una molécula sumamente tóxica para *Leishmania* producida a partir de la oxidación del amino ácido L-arginina. Otros mecanismos importantes de los MΦs contra *Leishmania* son el estallido oxidativo generado por la NADPH oxidasa que produce especies reactivas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido que reaccionan con los fosfolípidos de la membrana del parásito y la acidificación de la vacuola

parasitófora que desnaturaliza las proteínas intrínsecas del parásito (Stempin y Cerban, 2007; Munder *et al.*, 1999; Osorio *et al.*, 2012; Iniesta *et al.*, 2001; Becerril, 2008). Por otro lado, en un escenario inmunológico distinto, la producción de la citocina IL-4 por algunas células de la respuesta inmune innata, como por ejemplo las células cebadas, conducen a la diferenciación de los linfocitos T CD4 Th2 que mantienen la producción de IL-4 y además producen IL-10 y TGF- β , lo que conlleva a la activación alternativa de M Φ s y DCs, que es inadecuada para el combate de la infección, ya que resulta en la producción de poliaminas que tienen funciones relacionadas con la proliferación y división celular y de prolina que es un componente clave en la síntesis de la colágena (Stempin y Cerban, 2007; Munder *et al.*, 1999; Iniesta *et al.*, 2002, Gobert *et al.*, 2000).

1.5.3 Las respuestas Th1 y Th2 conducen a la resistencia o promueven el desarrollo de la leishmaniasis respectivamente

Las citocinas producidas por las diferentes células de la respuesta inmune innata como consecuencia del contacto con el parásito juegan un papel decisivo en la resolución de la infección, ya que inducen la respuesta inmune adaptativa orquestada por los linfocitos T CD4 y T CD8 (Iniesta *et al.*, 2005; Modolell *et al.*, 2009). La producción de IL-12 conduce a la diferenciación de linfocitos Th1 con la subsecuente producción de IFN- γ y TNF- α , que activa a M Φ s y DCs de manera clásica promoviendo la eliminación de los parásitos. La expansión clonal de las poblaciones de linfocitos Th1 conduce al control de la enfermedad mientras que la expansión clonal de linfocitos Th2 conduce a la exacerbación de ésta (Iniesta *et al.*, 2001). Esto último debido a que la IL-4, citocina Th2, activa a M Φ s y DCs de

manera alternativa, con lo que se inhibe la síntesis de la iNOS y la producción subsecuente de NO, así la supervivencia de *Leishmania* aumenta en la célula hospedera.

1.5.4 Las respuestas Th1 y Th2 en el modelo murino y en humanos

El papel de las citocinas de la respuesta inmune en el desarrollo de la leishmaniasis ha sido demostrado en el modelo murino. En este modelo, se ha observado claramente la tendencia de la enfermedad entre las respuestas Th1 y Th2 (Iniesta *et al.*, 2005; Modolell *et al.*, 2009; Abebe *et al.*, 2012), así como también la activación de los MΦs (Iniesta *et al.*, 2001). Sin embargo el caso en humanos es diferente, ya que durante la infección en los pacientes se ejerce una suma de respuestas Th1 y Th2 que actúan de manera conjunta, por lo que el avance de la enfermedad se define por la predominancia de elementos de una respuesta con respecto de la otra. La LCL se caracteriza por una buena respuesta inmune del tipo Th1, mientras que la LCD y la LV se caracterizan por una respuesta del tipo Th2 que correlaciona con la persistencia del parásito (Zuluaga y Robledo, 2004; Kumar, 2013). En este último caso se presenta anergia por parte de la respuesta inmune celular y con ello una producción excesiva de anticuerpos que no son protectores, ya que al opsonizar a los parásitos promueven la fagocitosis y con ésta la permanencia del parásito dentro de las células. Una evidencia de lo anterior es el hecho de que en pacientes con LV, los niveles de IL-4 en el plasma son altos aunque también están presentes las citocinas IL-12, IFN- γ y TNF- α (Modolell *et al.*, 2009).

En síntesis, una buena parte de la evolución de la enfermedad puede ser adjudicada al perfil de citocinas producidas por las células de la respuesta inmune innata y adaptativa, principalmente las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8 (Becerril, 2008; Kumar, 2013). Incluso se ha sugerido que podría inducirse una respuesta Th2 como estrategia de supervivencia de *Leishmania* en el hospedero (Iniesta *et al.*, 2001; 2002). La activación clásica y alternativa por las citocinas Th1 y Th2 respectivamente, está bien establecida en MΦs murinos, aunque también ocurre de manera semejante en las DCs (Munder *et al.*, 1999).

1.6 Las células dendríticas (DCs)

Como se mencionó con anterioridad, los promastigotes al ser inoculados en el hospedero, son fagocitados por varios tipos de células, entre las que se encuentran las DCs. Éstas tienen un papel central en la leishmaniasis, ya que su participación es activa desde el inicio de la infección y durante su desarrollo (Granados y Delgado, 2008), así como también lo es en la respuesta inmune en general. Las DCs se originan a partir de progenitores de la médula ósea que conforman un grupo heterogéneo de leucocitos y están ampliamente distribuidas por todo el organismo (Dong y Uzonna, 2012). Las DCs fueron redescubiertas por Ralph Steinman y Zanvil Cohn al estudiar células del bazo (Steinman, 2012) y son consideradas como células presentadoras de antígenos (APCs) altamente eficientes e inductoras de la respuesta inmune adaptativa. La participación importante de las DCs en la inducción y regulación de los linfocitos T se debe a una serie de características propias de estas células, entre las que destacan la gran capacidad de migrar entre los tejidos hasta los ganglios linfáticos, misma que

las distingue notablemente de los MΦs y la habilidad especializada para adquirir, procesar y finalmente presentar antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y II (MHC I y II) (Sallusto y Lanzavecchia, 2002). Las DCs tienen una mayor capacidad de presentar antígenos en comparación con la de los MΦs. Un ejemplo que apoya lo anterior, ocurre en los alvéolos, donde los MΦs alveolares sobrepasan hasta cien veces en número a las DCs, así como en las vías aéreas en general, pero el número de DCs que migran desde los alvéolos hasta los ganglios linfáticos para presentar antígenos sobrepasa por mucho al de los MΦs que migran hasta estos órganos linfoides (Gwendalyn *et al.*, 2008). Mediante citometría de flujo se han identificado distintos marcadores de superficie que han definido la heterogeneidad de las DCs así como su distinción de otras células fagocíticas mononucleares. Por otro lado, el estudio de estos marcadores de superficie ha revelado que muchos de éstos son compartidos por varias subpoblaciones de DCs, así como por otros tipos celulares, por lo que también es importante tomar en cuenta la ontogenia de las DCs para su clasificación (Guilliams *et al.*, 2014). Existen muchas clasificaciones de DCs, una de las más sencillas es la que las agrupa en dos grandes familias: las células dendríticas clásicas (cDCs) y las células dendríticas plasmocitoides (pDCs) (Merad *et al.*, 2013; Guilliams *et al.*, 2014).

Las cDCs se encuentran distribuidas en la mayoría de los tejidos linfoides y no linfoides del cuerpo. Fenotípicamente las cDCs expresan constitutivamente los marcadores CD45, MHC II y CD11c. Las cDCs pueden clasificarse en dos categorías de acuerdo a su localización y algunos marcadores característicos, que son, las cDCs residentes de tejidos linfoides y las cDCs no residentes de tejidos

linfoides. Las cDCs residentes de tejidos linfoides son abundantes en el tejido linfoide asociado a mucosas de la nasofaringe, la placa de Peyer y algunos nódulos linfáticos aislados en el intestino. Las cDCs no residentes de tejidos linfoides tienen una distribución mucho más amplia y están presentes en la mayoría de los tejidos conjuntivos, el intestino, el tejido muscular y la epidermis. Las pDCs comparten el mismo origen hematopoyético que las cDCs, pero expresan en menor nivel algunos marcadores constitutivos de las cDCs tales como CD11c, MHC II y moléculas coestimuladoras. Las pDCs se localizan principalmente en la sangre y los tejidos linfoides y poseen características tanto de linfocitos como de cDCs. Presentan el marcador de superficie de células B B220/CD45RA y el CD11c, marcador característico de las cDCs puede ser bajo o incluso negativo, sin embargo la cualidad de ser APCs se mantiene (Merad *et al.*, 2013; Reizis *et al.*, 2011).

1.6.1 Maduración de las DCs

El fenotipo inmaduro de las DCs se caracteriza por una baja presencia de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 y por una gran actividad fagocítica mediada por varios receptores como lo son el CD14, el receptor scavenger A (SR-A) y los receptores de inmunoglobulinas FcγR1, FcγR2b y FcγRIII. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) conduce a la maduración de las DCs y con esto la producción de citocinas como la IL-12, necesarias para inducir la respuesta inmune adaptativa y activación de los linfocitos T mediante la presentación antigénica. El fenotipo de las DCs maduras se caracteriza por un aumento elevado en la expresión de las

moléculas coestimuladoras antes mencionadas, así como del MHC II (Zuluaga y Robledo 2004; Wallet y Tisch 2005; Steinman y Banchereau 2007), sin embargo la capacidad fagocítica disminuye considerablemente. Las citocinas producidas por otras células inmunitarias, tienen la capacidad de estimular a las DCs y por ende de promover la activación y maduración de estas.

1.7 La enzima Arginasa 1 (ARG-1)

Uno de los posibles mecanismos mediante el cual el parásito logra sobrevivir en la célula hospedera, es la inducción de la enzima ARG-1 en las DCs y en los MΦs activados de manera alternativa a causa del estímulo de la IL-4 (Munder *et al.*, 1999; Iniesta *et al.*, 2001; Gobert *et al.*, 2000). En mamíferos, la enzima arginasa (L-arginina amidinohidrolasa) presenta dos isoformas: la arginasa 1 (ARG-1) y la arginasa 2 (ARG-2), ambas tienen alta semejanza estructural y cinética, catalizan la misma reacción, pero tienen diferente localización intracelular y tisular, así como regulación y reactividad inmunológica. La ARG-1 es una enzima citosólica predominantemente expresada en el hígado y los riñones y su función principal reside dentro del ciclo de la urea, mientras que la ARG-2 es mitocondrial y se expresa en el cerebro, los riñones y el intestino y está involucrada en la síntesis de prolina, glutamato y poliaminas. Es importante denotar que la ARG-1 es una enzima inducible mientras que la ARG-2 es constitutiva (Santos *et al.*, 2014; Correa *et al.*, 2013; Stempin y Cerban, 2007; Iyamu *et al.*, 2008; Reguera *et al.*, 2009). La reacción enzimática catalizada por la ARG-1 utiliza como sustrato el aminoácido L-arginina el cual se hidroliza en urea y la ornitina (Fig. 4).

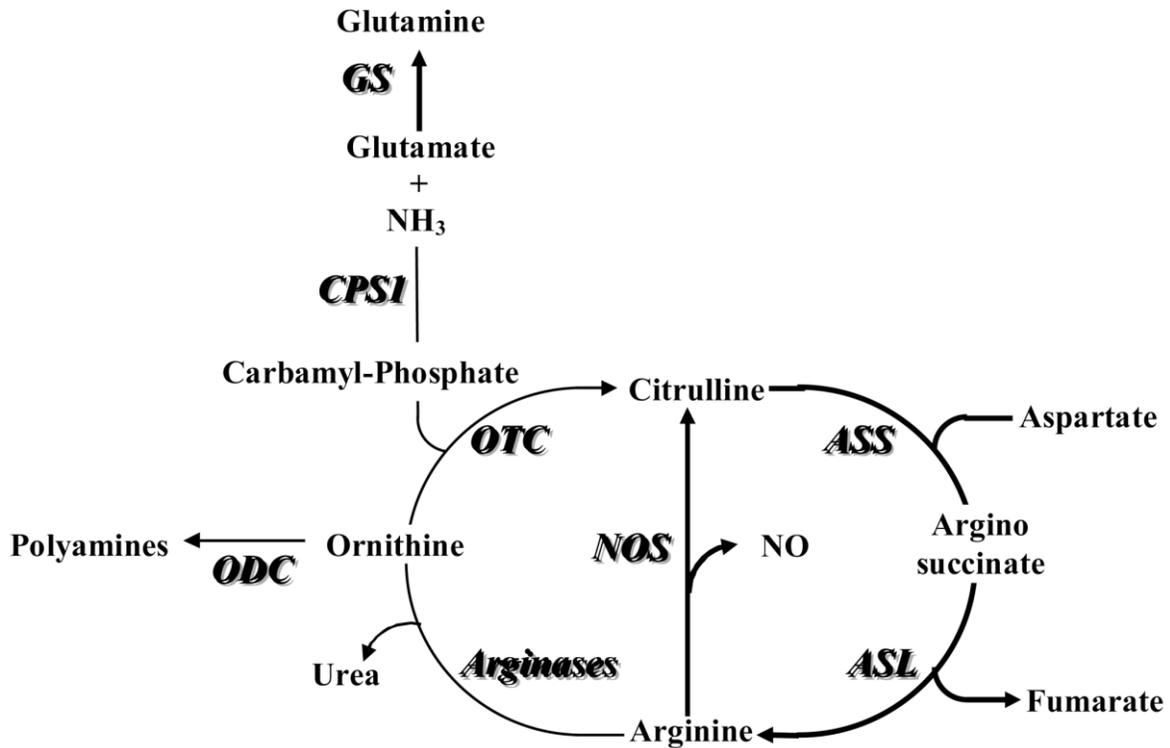


Figura 4. Ciclo de la urea y conexiones metabólicas. El papel principal de las arginasas radica en el ciclo de la urea, aunque la ornitina, uno de sus productos metabólicos, puede utilizarse para la síntesis de poliaminas. La L-arginina es el sustrato de las arginasas, pero también es utilizado para la síntesis de citrulina y óxido nítrico. **ASL**: Argininosuccinato liasa, **ASS**: Argininosuccinato sintetasa, **CPS1**: Carbamoil fosfato sintasa, **GS**: Glutamina sintetasa, **NOS**: óxido nítrico sintetasa, **NO**: óxido nítrico, **ODC**: Ornitina descarboxilasa, **OTC**: Ornitina transcarbamilasa (Tomado de Hansmannel *et al.*, 2010).

La L-arginina es utilizada primordialmente en la síntesis de proteínas, aunque también es un sustrato necesario para la síntesis de poliaminas, ya que al ser hidrolizada por la ARG-1, la ornitina producida se convierte en el sustrato de la ornitina descarboxilasa (ODC) que sintetiza las poliaminas putrescina, espermidina, espermina (Iniesta *et al.*, 2001, 2002; Reguera *et al.*, 2009; Abebe *et al.*, 2012). La L-arginina también es el sustrato de la iNOS, que está presente en MΦs y DCs. La iNOS produce citrulina y NO en dos pasos, primero la L-arginina es hidrolizada en N-hidroxi-L-arginina (NOHA) y después el NOHA es oxidado en

citrulina y NO (Iniesta *et al.*, 2001; Surace y Li, 2013; Wilkins *et al.*, 2010). La iNOS y la ARG-1 tienen una cinética y afinidad semejante por el sustrato (Bhatt *et al.*, 2014), por lo que la actividad de ambas enzimas resulta en una autoregulación competitiva (Iniesta *et al.*, 2001; Bhatt *et al.*, 2014; Iyamu *et al.*, 2008). La competencia por el sustrato no es la única manera en la que se regula la expresión de la ARG-1, esto depende también del estímulo producido por las citocinas de la respuesta inmune. Como se ha mencionado antes, las citocinas Th2 promueven la activación alternativa de MΦs y DCs y con ello el metabolismo de la L-arginina por la vía de la ARG-1, mientras que de manera opuesta las citocinas Th1 promueven una activación clásica de éstas células y conducen el metabolismo del sustrato por la vía de la iNOS (Fig. 5). La inducción de la ARG-1 inhibe la de la iNOS y viceversa; esto debido a que durante la incorporación de la L-arginina a la ruta metabólica de la ARG-1 o de la iNOS se generan productos intermediarios que son inhibidores fisiológicos de la ruta opuesta. Típicamente, las células del sistema inmune sintetizan una, pero no ambas enzimas dependiendo de la patología y el papel de las enzimas en la misma (Iniesta *et al.*, 2001; Bhatt *et al.*, 2014; Surace y Li, 2013; Modollel *et al.*, 2009; Abebe *et al.*, 2012; Reguera *et al.*, 2009). El NOHA, compuesto intermediario en la síntesis del NO, es el mejor inhibidor de la ARG-1 y también lo son las citocinas IL-12 e IFN- γ . De manera contraria, las poliaminas y las citocinas IL-4 e IL-10 inhiben la inducción de la iNOS (Fig. 5) (Iniesta *et al.*, 2001, 2002; Santos *et al.*, 2014; Correa *et al.*, 2013; Stempin y Cerban, 2007).

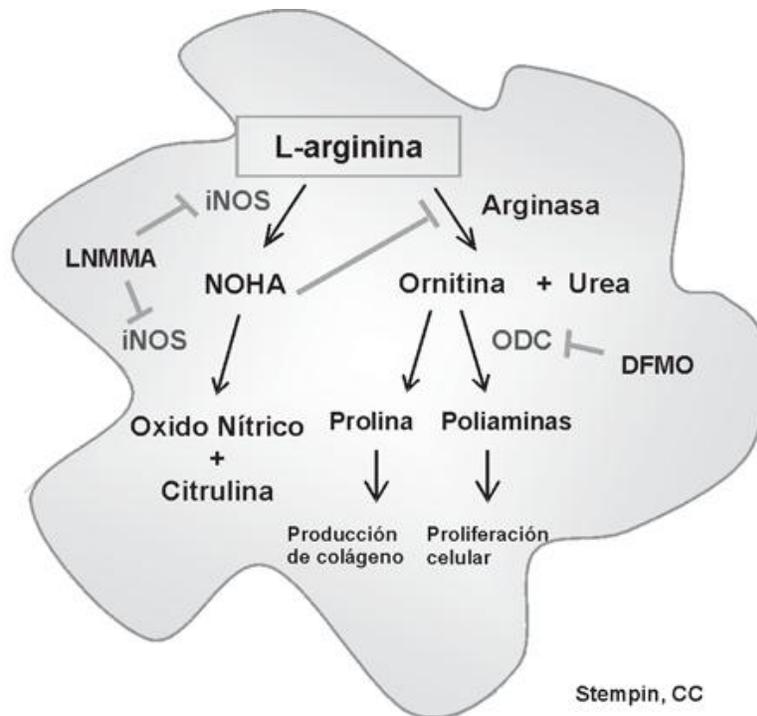


Figura 5. Metabolismo de la L-arginina en el MΦ. La L-arginina se metaboliza por dos vías diferentes. Por un lado es oxidada por la iNOS, inducida por citocinas Th1, para generar NO y citrulina. Durante este proceso se genera NOHA, que es un potente inhibidor de la ARG-1. Por otro lado, la L-arginina es hidrolizada por la ARG-1 en urea y ornitina y posteriormente por acción de la ODC, la ornitina es transformada a poliaminas. **LNMMA**: N-G-metil-L-arginina, **DFMO**: Di-fluor-metil-ornitina, **ODC**: Ornitina descarboxilasa, **NOHA**: N-hidroxil-L-arginina, **iNOS**: Sintasa inducible del óxido nítrico (Tomado de Stempin y Cerban, 2007).

La importancia de la regulación entre la ARG-1 y la iNOS en células del sistema inmune, particularmente en los MΦs, radica en que dependiendo de ésta, la infección puede eliminarse o bien continuar desarrollándose (Modolell *et al.*, 2009).

1.7.1 El papel de la ARG-1 en la leishmaniasis

En la infección por *Leishmania*, la presencia y actividad de la ARG-1 en el hospedero están correlacionadas con el grado de patogenicidad de la infección (Iniesta *et al.*, 2001). Se ha sugerido que el parásito puede inducir la síntesis de

poliaminas en beneficio de su supervivencia y duplicación mediante la depleción de la L-arginina disponible para la iNOS, evitando así la producción del NO y sus derivados tóxicos (Iniasta *et al.*, 2001, 2002). La hipótesis de que *Leishmania* pudiera inducir la ARG-1 como una estrategia de supervivencia es apoyada por varias evidencias, una de ellas es el hecho de que se ha observado que el parásito tiene la capacidad de inducir la enzima en ausencia de IL-4 exógena en la LV experimental producida por *L. donovani* en hámster (Osorio *et al.*, 2012). Además, las poliaminas son esenciales para la síntesis de macromoléculas, proliferación, diferenciación y buen funcionamiento de la maquinaria antioxidante de *Leishmania*. Por ejemplo, una de estas poliaminas, la espermidina, es un sustrato necesario para la síntesis del tripanotión, molécula que neutraliza las especies reactivas del nitrógeno y el oxígeno y protege al parásito del estallido oxidativo, uno de los mecanismos inmunológicos más eficaces de la célula hospedera (Correa *et al.*, 2013). Se sabe también que *Leishmania* posee un gen para sintetizar la arginasa y es esencial para la supervivencia. La arginasa de *Leishmania* es distinta a la del hospedero, pero cataliza exactamente la misma reacción, por lo que la L-arginina del hospedero está disponible para el parásito (Correa *et al.*, 2013). Un estudio con cepas de *L. mexicana* con una mutación que impide la síntesis de la arginasa, mostró que *L. mexicana* es un organismo auxotrófico para las poliaminas, pero en cultivo, el suministro de éstas permite que los parásitos mantengan la virulencia al infectar ratones BALB/c (Reguera *et al.*, 2009).

El papel de la ARG-1 en la patogenicidad de *Leishmania* ha sido demostrado en diferentes estudios realizados tanto in vivo como in vitro. En los ratones BALB/c,

que son susceptibles a la infección y cuya respuesta inmune típicamente es del tipo Th2, se ha observado la inducción de la ARG-1 en diferentes células inmunes. En contraste, en los ratones C57BL/6 que son resistentes a la infección y presentan una respuesta tipo Th1, la ARG-1 se mantiene en niveles basales (Iniesta *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha observado que el crecimiento de *L. major* en los MΦs murinos aumenta cuando se induce la ARG-1 (Iniesta *et al.*, 2005). En experimentos in vivo con un modelo de LC causada por *L. aethiopica* se demostró que la actividad de ARG-1 es alta durante la exacerbación de la enfermedad y éste incremento en la actividad de la enzima contribuye a la supresión local de los linfocitos T (Abebe *et al.*, 2012). Se ha observado también que la actividad de la ARG-1 es significativamente mayor en el sitio de la lesión de ratones BALB/c infectados con *L. major* en comparación con la actividad de la enzima en áreas sanas (Modolell *et al.*, 2009). De igual forma, en el modelo de LV en hámsteres infectados con *L. donovani* se demostró que la actividad de la iNOS es baja, con una elevada inducción, presencia de RNAm y actividad de la ARG-1 en MΦs principalmente, aunque también en fibroblastos y fibroblastos sin síntesis endógena de IL-4 o exposición a citocinas exógenas (Osorio *et al.*, 2012).

La inducción de la ARG-1 en la infección por *Leishmania* tiene un efecto benéfico hacia el parásito, ya que la síntesis de poliaminas favorece la duplicación de los amastigotes en la célula hospedera. Sin embargo, la activación alternativa de los MΦs tiene otro objetivo, el cual es amortiguar la inflamación del tejido y sintetizar poliaminas y colágena, que en conjunto con los fibroblastos promueven la reconstrucción del tejido dañado (Gobert *et al.*, 2000; Osorio *et al.*, 2012).

Además de *Leishmania*, se ha demostrado que otros parásitos como *Trypanosoma brucei*, relacionado filogenéticamente con *Leishmania*, inducen la ARG-1, pero la infección es controlada con la inducción de la iNOS (Iniesta *et al.*, 2001). Además de la leishmaniasis y la tripanosomiasis, la presencia y actividad enzimática de la ARG-1 se han asociado con otras enfermedades infecciosas tales como la esquistosomiasis, la tuberculosis, la hepatitis B y la infección con VIH (Abebe *et al.*, 2012), así como a la inflamación crónica, el asma y la soriasis (Modolell *et al.*, 2009).

2. Justificación

La leishmaniasis es una enfermedad tropical, la cual no ha recibido la atención que requiere, aún cuando existen miles de personas en riesgo de contraerla, sobre todo las de más escasos recursos que no tienen acceso a un diagnóstico y tratamiento (Modollel *et al.*, 2009). En México, la leishmaniasis está presente en muchos estados de la república y su distribución coincide con algunos de los lugares más pobres de México (INDRE, 2015). El metabolismo de la L-arginina es determinante en el resultado de la infección, ya que la producción de poliaminas es esencial para la supervivencia de *Leishmania* (Iniesta *et al.*, 2001), por lo que el estudio de la ARG-1 es muy importante en la comprensión de los mecanismos utilizados por el parásito para sobrevivir en la célula hospedera. Además, la ARG-1, así como los moduladores de su actividad, han sido sugeridos como blancos de fármacos o elementos potencialmente terapéuticos en el tratamiento de esta enfermedad (Iniesta *et al.*, 2005; Iyamu *et al.*, 2008). El papel de la ARG-1 en la

leishmaniasis ha sido estudiado principalmente en MΦs murinos (Iniesta *et al.*, 2001, 2002, 2005; Surace y Li, 2013; Osorio *et al.*, 2012), sin embargo, el papel de la enzima no ha sido estudiado en otras células hospederas de *Leishmania*, las DCs, aún cuando éstas también tienen un papel central en el combate de la infección (Dong y Uzonna, 2012). Por otro lado, en los modelos experimentales en los que se ha analizado el papel de la ARG-1 en la leishmaniasis han utilizado especies de *Leishmania* tales como *L. infantum* (Iniesta *et al.*, 2001; Baptista *et al.*, 2007), *L. donovani* (Osorio *et al.*, 2012), *L. braziliensis* (Pereira *et al.*, 2009) y más extensamente a *L. major* (Iniesta *et al.*, 2002, 2005; Ritter *et al.*, 2004; Modollel *et al.*, 2009; Reguera *et al.*, 2009; Alimohammadian *et al.*, 2010; Markikou *et al.*, 2012), pero pocos estudios han sido realizados con *L. mexicana*. Finalmente, estudios llevados a cabo con diferentes cepas de *Leishmania* (Ritter *et al.*, 2004; Baptista *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009; Alimohammadian *et al.*, 2010; Markikou *et al.*, 2012), han demostrado que existen diferencias en las formas clínicas que producen. Sin embargo, no se han realizado estudios que analicen el efecto de diferentes cepas de *Leishmania* en la presencia y función de la ARG-1, siendo que está demostrado que *Leishmania* puede inducir a la ARG-1, aún en ausencia de IL-4 (Osorio *et al.*, 2012) y es probable que existan diferencias entre cepas, en la capacidad de inducción de la ARG-1 y que ésta correlacione con la patogenia.

3. Hipótesis

Los amastigotes de *L. mexicana* de dos diferentes cepas, una aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y otra aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa (LCD), modulan de manera distinta la presencia proteínica y la función de la enzima ARG-1 en las DCs murinas.

4. Objetivo general

Determinar si los amastigotes de dos diferentes cepas de *L. mexicana* inducen en las DCs murinas la presencia de la ARG-1 de manera diferencial, así como también determinar si la actividad de la ARG-1 es mayor en las DCs infectadas por una cepa con respecto de la otra.

5. Objetivos particulares

- 1) Obtener y caracterizar células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC) de ratones BALB/c.
- 2) Infectar las BMDC con los amastigotes de dos diferentes cepas de *L. mexicana*.
- 3) Determinar la presencia proteínica de la ARG-1 en las BMDC infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de una cepa aislada de un paciente con LCL o de una cepa aislada de un paciente con LCD.
- 4) Determinar la actividad de la ARG-1 en las BMDC infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de una cepa aislada de un paciente con LCL o de una cepa aislada de un paciente con LCD.

6. Materiales y métodos

6.1 Obtención de las BMDC

A partir de los fémures y las tibias de ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad, se obtuvo la médula ósea, que entre otros tipos celulares contiene las células precursoras de las DCs. Los ratones fueron proporcionados por el bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM y se sacrificaron mediante dislocación cervical. Los huesos de las patas traseras se extrajeron y se limpiaron retirando perfectamente la piel y el músculo con gasas, pinzas y tijeras de disección y se colocaron en una caja Petri bacteriológica con una solución desinfectante compuesta de PBS (Caisson, North Logan, UT, USA) con 2% penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para extraer la médula ósea, cada hueso se cortó por la epífisis y la médula se expulsó mediante presión con una jeringa con solución desinfectante acoplada a una aguja de 25 G y se colectó en un tubo de 50 ml. La médula obtenida se centrifugó a $300 \times g$ durante 10 min y posteriormente se suspendió en medio RPMI (Gibco Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) suplementado con 2 mM de L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina y 50 μM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El número de células obtenido se contabilizó con una cámara de Neubauer con azul tripán (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). A continuación, las células se sembraron en tres cajas de Petri bacteriológicas, cada una con 2×10^6 células en 10 ml de medio RPMI adicionado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco Life

Technologies Corporation) inactivado por calor y con 10% del sobrenadante de cultivo de la línea celular X-63. Esta línea celular está transfectada con el gen que codifica para la citocina GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos) y el 10% de sobrenadante es equivalente a 200 U/ml de GM-CSF. La línea celular fue donada por la Dra. Brigitta Stockinger (Medical Research Council, Mill Hill, London, UK). El día de la siembra de las células se consideró como el día 0 de cultivo y a partir de éste se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO₂ durante la totalidad del cultivo. En el día 3, el cultivo se alimentó mediante la adición de 10 ml de medio suplementado y con 10% de FBS y sobrenadante X-63, en el día 6 se retiraron 10 ml de medio de la caja de cultivo y se reemplazaron con 10 ml de medio fresco. Las BMDC diferenciadas se cosecharon en el día 7 de cultivo, se centrifugaron a 300 ×g durante 10 min, se lavaron con PBS y se centrifugaron nuevamente. Las BMDC se resuspendieron en 10 ml de medio RPMI y se determinó el número de células obtenido mediante un conteo en una cámara de Neubauer utilizando azul tripán. Las BMDC se sembraron en dos placas de 24 pozos de fondo adherente, en cada una se sembraron 9 pozos con una densidad de 1 × 10⁶ de BMDC en 1 ml de medio RPMI suplementado y sin GM-CSF, sólo con 10% de FBS y se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO₂.

6.2 Caracterización de las BMDC

Con el fin de determinar el fenotipo de las BMDC obtenidas de acuerdo a la metodología anteriormente descrita, éstas se caracterizaron mediante citometría de flujo utilizando los marcadores de las DCs indicados más adelante. Una vez

concluido el periodo de cultivo de 7 días, las BMDC se dejaron en reposo durante 24 h más a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, las BMDC se colectaron directamente de las cajas Petri bacteriológicas, se centrifugaron a 300 ×g durante 10 min, se resuspendieron con PBS estéril (0.2 g/L de KCl, 8 g/L de NaCl, 0.2 g/L de KH₂PO₄ y 1.15 g/L de Na₂HPO₄) ajustado a un pH 7.3, se lavaron centrifugándose una vez más y se resuspendieron en PBS estéril para contarse en una cámara de Neubauer con azul tripán. Un total de 10 × 10⁶ de células se resuspendieron en un tubo de 1 ml con PBS estéril y se lavaron tres veces con PBS centrifugando a 300 ×g durante 10 min cada vez. Las BMDC se mantuvieron en hielo durante todos los pasos subsecuentes hasta el análisis en el citómetro. Del total de células sólo se tomaron 5 × 10⁶, colocando 1 × 10⁶ con 1 ml de PBS estéril en 5 tubos de 1 ml cada uno y se centrifugaron a 300 ×g durante 10 min a 4 °C. A continuación, se retiró el PBS y las células se resuspendieron en 200 µl de buffer FACS compuesto de PBS estéril con 2% de suero de caballo (Sigma-Aldrich) y 5 mM de EDTA y se incubaron durante 15 min con el fin de bloquear los receptores FcγR de las BMDC. Una vez terminado el bloqueo, las células se centrifugaron a 300 ×g durante 10 min a 4 °C y se marcaron con anticuerpos dirigidos contra marcadores específicos de las DCs. Para esto, se retiraron los 200 µl de buffer FACS de cada tubo y las células se resuspendieron en 50 µl del mismo buffer, en el que se diluyeron los anticuerpos respectivos en una relación 1:200. Los anticuerpos que se utilizaron fueron los siguientes: a) anticuerpo de ratón anti CD11c (cadena α del receptor de complemento 4 (CR4)) conjugado con ficoeritrina (PE), b) anticuerpo de ratón anti CD11b (cadena α del receptor de

complemento 3 (CR3)) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), c) anticuerpo de ratón anti CD86 (proteína co-estimuladora en la activación de linfocitos T) conjugado con FITC, d) anticuerpo de ratón anti-I-A/I-E (MHC II) conjugado con FITC (BioLegend, San Diego, CA, USA). Como control negativo de las tinciones con los anticuerpos se utilizaron BMDC sin teñir. Una vez adicionados los anticuerpos, las BMDC se incubaron con éstos durante 25 min en ausencia de luz. Al término de la incubación, a todos los tubos se les agregó 400 µl de buffer FACS, se centrifugaron a 300 ×g durante 10 min, se les retiró el buffer, se les adicionaron 500 µl más y se centrifugaron nuevamente. A continuación, se retiró el buffer de cada tubo y las células se resuspendieron en 1 ml de PBS estéril para analizarse en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) con el software CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A partir de los datos generados con el software anterior se generaron los histogramas de la sección de resultados con el software WinMDI.

6.3 Tratamiento de las BMDC con diferentes estímulos e infección con los amastigotes de *L. mexicana*

El cultivo finalizó en el día 7, sin embargo las células se mantuvieron en las placas de 24 pozos durante 24 h más a 37 °C y con 5% de CO₂. Pasadas las 24 h de reposo, las BMDC de ambas placas se estimularon como se señala más adelante y después de 2 h se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana*. Con el objetivo de analizar el efecto de las diferentes cepas de *L. mexicana* en la ARG-1 de las BMDC, se utilizó la cepa LAC aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea

localizada (LCL) y la cepa DIACT aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Los amastigotes de ambas cepas fueron aislados y cultivados por el Biól. Arturo Wilkins Rodríguez en el Laboratorio de Inmunoparasitología, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. Los tratamientos se aplicaron a cada pozo en las BMDC de ambas placas y fueron los siguientes: Basal: BMDC sin estímulos, IL-4: BMDC estimuladas con 20 U de IL-4 (Peprotech Inc., Rocky Hill, NJ, USA), TNF- α + IFN- γ : BMDC estimuladas con 500 U de TNF- α y 100 U de IFN- γ (Peprotech Inc.), LAC: BMDC infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC, LAC + IL-4: BMDC estimuladas con 20 U de IL-4 e infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC, LAC + TNF- α + IFN- γ : BMDC estimuladas con 500 U de TNF- α y 100 U de IFN- γ e infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC, DIACT: BMDC infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de la cepa DIACT, DIACT + IL-4: BMDC estimuladas con 20 U de IL-4 e infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de la cepa DIACT y DIACT + TNF- α + IFN- γ : BMDC estimuladas con 500 U de TNF- α y 100 U de IFN- γ e infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de la cepa DIACT. El estímulo de las BMDC con la IL-4 es el control positivo de la presencia proteínica de la ARG-1 y el estímulo con TNF- α + IFN- γ es el control negativo de la presencia proteínica de la ARG-1. Para realizar las infecciones de las BMDC con los amastigotes de *L. mexicana* se tomaron 5 ml del cultivo de los amastigotes de cada cepa. Los amastigotes se cultivaron en medio Grace's (Gibco Life Technologies Corporation), pH 5.4 con 20% de FBS (Gibco Life Technologies Corporation). Los 5 ml del cultivo de amastigotes de cada cepa se colocaron en tubos de 15 ml, se centrifugaron a 2000 $\times g$ durante 10

min y se lavaron 3 veces con PBS estéril centrifugándolos cada vez a $2000 \times g$ durante 10 min. Al terminar los lavados, los amastigotes de ambas cepas se colocaron en tubos de 1.5 ml, se resuspendieron en 1 ml de PBS estéril, se pasaron 5 veces por jeringas de insulina para deshacer los agregados de parásitos y finalmente se fijaron con formaldehído al 2% durante 5 min en una cámara húmeda y se contaron en una cámara de Neubauer. El cociente de infección de las BMDC con los amastigotes de *L. mexicana* fue de 5:1 (parásitos:células) por lo que se adicionaron 5×10^6 amastigotes por cada 1×10^6 BMDC de acuerdo a los tratamientos antes mencionados. Una vez aplicados los tratamientos, las BMDC se mantuvieron a 37°C y con 5% de CO_2 durante 48 h.

6.4 Tinción de las BMDC por inmunofluorescencia

Con el objetivo de obtener evidencias fotográficas de las BMDC infectadas con los amastigotes de ambas cepas, se fijaron 5×10^5 BMCD en cubreobjetos redondos de 12 mm. Un total de 3 cubreobjetos tratados se colocaron en una placa de 24 pozos de fondo adherente, uno por pozo y en ellos se sembraron las células procedentes del día 7 de cultivo de acuerdo con la metodología antes mencionada en 1 ml de medio RPMI (Gibco Life Technologies Corporation) suplementado y sin GM-CSF. La infección de las BMDC también se realizó de la misma manera, aunque en este caso solo durante 24 h, de modo que los cubreobjetos correspondieron a la condición basal y a los tratamientos LAC y DIACT. Antes de sembrar las BMDC en los cubreobjetos, estos se limpiaron para una correcta adherencia de las células. La limpieza constó en sumergirlos en HCl 1 M toda la

noche, posteriormente el HCl se limpió con 3 lavados con agua desionizada. Una vez concluidos los lavados con agua, se aplicaron 2 lavados con etanol al 96% y 1 con etanol absoluto, hasta que los alcoholes se evaporaron en sus respectivos lavados. Al terminar los lavados, los cubreobjetos se esterilizaron con calor seco durante 45 min a 190 °C, una vez esterilizados se trataron con una gota de Poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich) al 0.01% en PBS (Caisson) durante 5 min por una de las caras. Pasado el tiempo de tratamiento, se retiró el excedente de reactivo con papel y los cubreobjetos se colocaron en la placa de 24 pozos listos para sembrar las células. Al terminar las 24 h de infección, se retiró el medio para realizar 3 lavados en cada pozo con 1ml de PBS durante 2 min, para después fijar las células con 500 µl de metanol absoluto durante 15 min. Al terminar la fijación, se retiraron los cubreobjetos de la placa y las células se bloquearon durante 30 min adicionando una gota de 100µl de PBS con 10% de FBS que adicionalmente contenía suero anti-leishmania de ratón, rico en IgGs, en una dilución 1:100. Al terminar el bloqueo, los cubreobjetos se lavaron en la placa de 24 pozos 3 veces con PBS durante 3 min y posteriormente se tiñeron con Concanavalina A acoplada a TRITC (Sigma-Aldrich) en una dilución 1:100 en PBS durante 20 min para visualizar la membrana. Después de la tinción, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS durante 3 min para después teñirse con un anticuerpo de ratón conjugado con FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Baltimore Pike, West Grove, PA, USA) en una dilución 1:100 en PBS durante 20 min para visualizar los amastigotes. Al terminar esta segunda tinción, se aplicaron 3 lavados con PBS durante 3 min para realizar una última tinción con DAPI (Sigma-Aldrich) en una dilución 1:1000 en PBS durante 5 min. Finalmente, al terminar las

tinciones, se aplicaron 5 lavados con PBS durante 5 min para después aplicar una gota de medio de montaje (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) y visualizar las preparaciones en un microscopio de fluorescencia Microphot-FXA con los filtros: rojo DM 430, verde DM 400 y azul DM 580 y con una cámara digital Nikon DXm 1200 F.

6.5 Lisis de las BMDC

Al terminar el tiempo de los tratamientos, que fue de 48 h, las BMDC se centrifugaron en las placas a $450 \times g$ durante 5 min, se desechó el sobrenadante, se reemplazó por 1 ml de PBS y las placas se centrifugaron nuevamente a $450 \times g$ durante 5 min. Posteriormente se procedió a la lisis de las BMDC, siguiendo una metodología diferente para cada placa. Esto debido a que las BMDC de una placa se utilizaron para la determinación de la presencia proteínica de la ARG-1 por Western-blot (WB) y las BMDC de la otra placa se utilizaron para determinar la actividad de la ARG-1 mediante un ensayo colorimétrico. En la placa que se utilizó para la determinación de la actividad de la ARG-1 el sobrenadante se desechó posteriormente a la centrifugación y se agregaron 150 μ l de Tritón X100 al 0.1% a cada pozo, la placa se dejó en agitación durante 15 min, después se agregaron 150 μ l de Tris HCl 25 mM pH 7.5 y la placa se dejó en agitación durante 5 min. Posteriormente se agregaron 15 μ l de $MnCl_2$ 10 mM y la placa se mantuvo en agitación durante 5 min más. Al terminar, la placa se almacenó a $-70^\circ C$. La placa utilizada para analizar la presencia proteínica de la ARG-1 se colocó en hielo posteriormente a la centrifugación y ahí se mantuvo hasta finalizar el

procedimiento de lisis. Se desechó el PBS de cada pozo y se agregaron 50 μ l de buffer RIPA (Tris-HCL 100 mM, pH 8, EDTA 2 mM, NaCl 100 mM y Triton X-100 al 1%) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) a una concentración de 20 μ l por ml de buffer RIPA. El fondo de cada pozo se lavó cuidadosamente con el buffer RIPA y la placa se mantuvo en reposo durante 10 minutos. El lisado de cada pozo se transfirió a un tubo de 1 ml y todos los tubos se agitaron brevemente en un vortex cada 5 min durante 30 min. Los tubos sólo se sacaron del hielo para agitarlos en el vortex. Al terminar el tiempo de agitación, los tubos se centrifugaron a 15500 \times g durante 15 min a 4 °C y una vez terminada la centrifugación el lisado de cada tubo se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a -70 °C.

6.6 Determinación de la presencia proteínica de la ARG-1

El análisis de la presencia proteínica de la ARG-1 se realizó mediante Western-blot (WB). Para ello primero se cuantificó la proteína de los lisados de las BMDC tratadas en la forma descrita previamente. Los tubos con los lisados se sacaron del almacenamiento a -70 °C, se descongelaron a temperatura ambiente y se mantuvieron en hielo para conservar la integridad de las muestras. La cuantificación de proteínas se realizó con el kit para determinación de proteínas compatible con detergente (DC Protein Assay Reagents Package, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y consistió en la elaboración de una curva de concentración de albúmina sérica bovina (BSA) en agua desionizada a partir de dos stock, el primero a una concentración de 1mg/ml y el segundo a 5mg/ml. Del

stock de 1mg/ml se tomaron 1, 2, 3 y 4 μ l y se colocaron por triplicado en una placa de 96 pozos, posteriormente se adicionaron 4, 3, 2 y 1 μ l de buffer de lisis RIPA respectivamente para utilizarse como blanco con lo que se consiguió un volumen total de 5 μ l por pozo. Del stock de urea 5 mg/ml se tomaron 1, 1.4, 2 y 3 μ l y se colocaron en la placa de la misma manera que los puntos anteriores de la curva y posteriormente se adicionaron 4, 3.6, 3 y 2 μ l de buffer de lisis RIPA respectivamente. Las muestras se ajustaron a un volumen de 5 μ l ya que ese es el volumen óptimo de lectura en el espectrofotómetro (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA), por lo que las muestras de cada tratamiento se agregaron también por triplicado y ajustando a este mismo volumen adicionando 2.5 μ l de muestra y 2.5 μ l de buffer de lisis RIPA. Una vez colocadas las réplicas de la curva y de los tratamientos se adicionó a cada pozo 25 μ l del reactivo A' del kit de determinación de proteínas y 200 μ l de reactivo B del mismo kit, en ese orden y la reacción se dejó incubar durante 15 min. Las muestras se analizaron en el espectrofotómetro (Bio-Tek Instruments, Inc.) a 650 nm, se determinó la cantidad de proteína en las muestras problema y de éste mediante una regla de tres se determinó el volumen requerido para tomar 10 μ g de proteína total, cantidad de proteína con la que se analizó la presencia proteínica de la ARG-1 en cada tratamiento. Los 10 μ g de proteína total se cargaron en una electroforesis con un gel de bis-acrilamida al 7.5%. El gel consistente en dos fases, una separadora y una concentradora, se preparó adicionando en un tubo de 50 ml 2.5 ml de buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 con SDS al 0.4%, 2.5 ml de bis-acrilamida al 30%, 5 ml de H₂O desionizada, 100 μ l de persulfato de amonio al 10% y 5 μ l de TEMED para conformar el segmento separador del gel, mientras que el segmento

concentrador consistió de 750 μ l de buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 con 0.4 % de SDS, 500 μ l de bis-acrilamida al 30%, 1750 μ l de H₂O desionizada, 40 μ l de persulfato de amonio al 10% y 2 μ l de TEMED. La electroforesis se corrió a 70 V durante 15 min y posteriormente a 120 V durante 75 min en promedio. Al terminar la electroforesis, el gel se equilibró en buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM con metanol al 20%) durante 10 min en agitación. Una vez equilibrado el gel, las proteínas se transfirieron a una membrana de Inmobilon-P (Millipore corporation, Billerica, MA, USA) activada con metanol absoluto durante 1 min. La transferencia se llevó a cabo en un equipo de transferencia de proteínas con un sistema semiseco (Trans-Blot SD semi-dry transfer cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a un voltaje constante de 20 V durante 60 min. Al terminar la transferencia de las proteínas, la membrana se cortó en dos partes de acuerdo al peso en el que se localizaban la proteína de interés y el control de carga. La proteína de interés es la ARG-1, con dos subunidades en los pesos 36 KDa y 38 KDa, reconocidas por el anticuerpo que se utilizó en este análisis. Como control de carga se utilizó β - tubulina que tiene un peso de 55 KDa. Las dos secciones de la membrana se bloquearon con buffer Tris salino adicionado con tween (TBST) (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, NaCl 0.15 M con 0.05% de Tween 20) y leche en polvo baja en grasa al 5% durante 60 min. Una vez pasado el tiempo de bloqueo, las membranas se lavaron durante 5 min con TBST, 4 veces. Después de los lavados se realizó la incubación con los anticuerpos primarios que se diluyeron en 10 ml de TBST con 5 % de leche y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos que se utilizaron fueron un anticuerpo de ratón anti-ARG-1 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) en una dilución

1:10000 y un anticuerpo de ratón anti- β -Tubulina (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) en una dilución 1:1000. Después de la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron con TBST durante 5 min 4 veces y al terminar se incubaron durante 60 min con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de raíz fuerte (HRP) (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA) en una dilución 1:10000 para la ARG-1 y 1:1000 para la β -Tubulina en 10 ml de TBST con 5 % de leche baja en grasa cada uno. Al finalizar la incubación de las membranas con el anticuerpo secundario, éstas se lavaron con TBST durante 5 min 6 veces para posteriormente revelar las proteínas de interés mediante una reacción con un sustrato de quimioluminiscencia (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) y se expusieron a películas para rayos X (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), en un cuarto oscuro. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas se realizó con el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

6.7 Determinación de la actividad de la ARG-1

La actividad enzimática de la ARG-1 se analizó mediante un ensayo colorimétrico. Para llevarlo a cabo, los lisados almacenados a -70°C se descongelaron a temperatura ambiente y posteriormente la placa se mantuvo en hielo para conservar la integridad de las muestras. Una vez descongelados los lisados, se tomaron 50 μl de cada uno y se transfirieron a tubos de 0.5 ml. Los tubos se sometieron a tres ciclos de diferente temperatura en un termociclador. El primero fue a 56°C durante 10 min para activar a la ARG-1. Posteriormente se agregaron 50 μl del sustrato L-arginina 0.5 M pH 9.7 y se llevó a cabo el segundo ciclo de

temperatura a 37 °C durante 60 min durante el cual se llevó a cabo la hidrólisis de la L-arginina. Mientras procedía el segundo ciclo se elaboró una curva de concentración de urea, esto con el fin de determinar la concentración de ésta en las muestras problema, ya que la urea es el producto intermedio en la catálisis de la L-arginina por la ARG-1. La curva se realizó a partir de un stock de urea en agua desionizada a una concentración de 1µg/µl con las siguientes cantidades de urea: 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg que se colocaron en tubos de 0.5 ml. Al finalizar el segundo ciclo, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 400 µl de una mezcla de ácidos compuesta por H₃PO₄ (ácido fosfórico) al 85%, H₂SO₄ (ácido sulfúrico) al 96% y H₂O (agua) en una proporción 1:3:7. La mezcla de ácidos se adicionó también a los tubos correspondientes a la curva de concentración de urea. A continuación se agregaron 20 µl de α-isonitrosopropiofenona al 9% en etanol a cada tubo. Éste es un reactivo que interacciona con la urea para formar un compuesto azo, del cual se determina la absorbancia por espectrofotometría para cuantificar la urea producida en cada condición. Una vez adicionada la α-isonitrosopropiofenona, los tubos se sometieron al último ciclo de temperatura que fue a 100 °C durante 45 min y a 4 °C durante 30 min. Al finalizar los ciclos se tomaron 100 µl de cada tubo problema y de la curva de concentración de urea por triplicado y se transfirieron a una placa de 96 pozos para analizarse en un espectrofotómetro (Bio-Tek Instruments, Inc.) a 550 nm.

7. Resultados

7.1 Caracterización de las BMDC

El fenotipo de las DCs se analizó mediante citometría de flujo y se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD11c, CD11b, CD86 y MHC II.

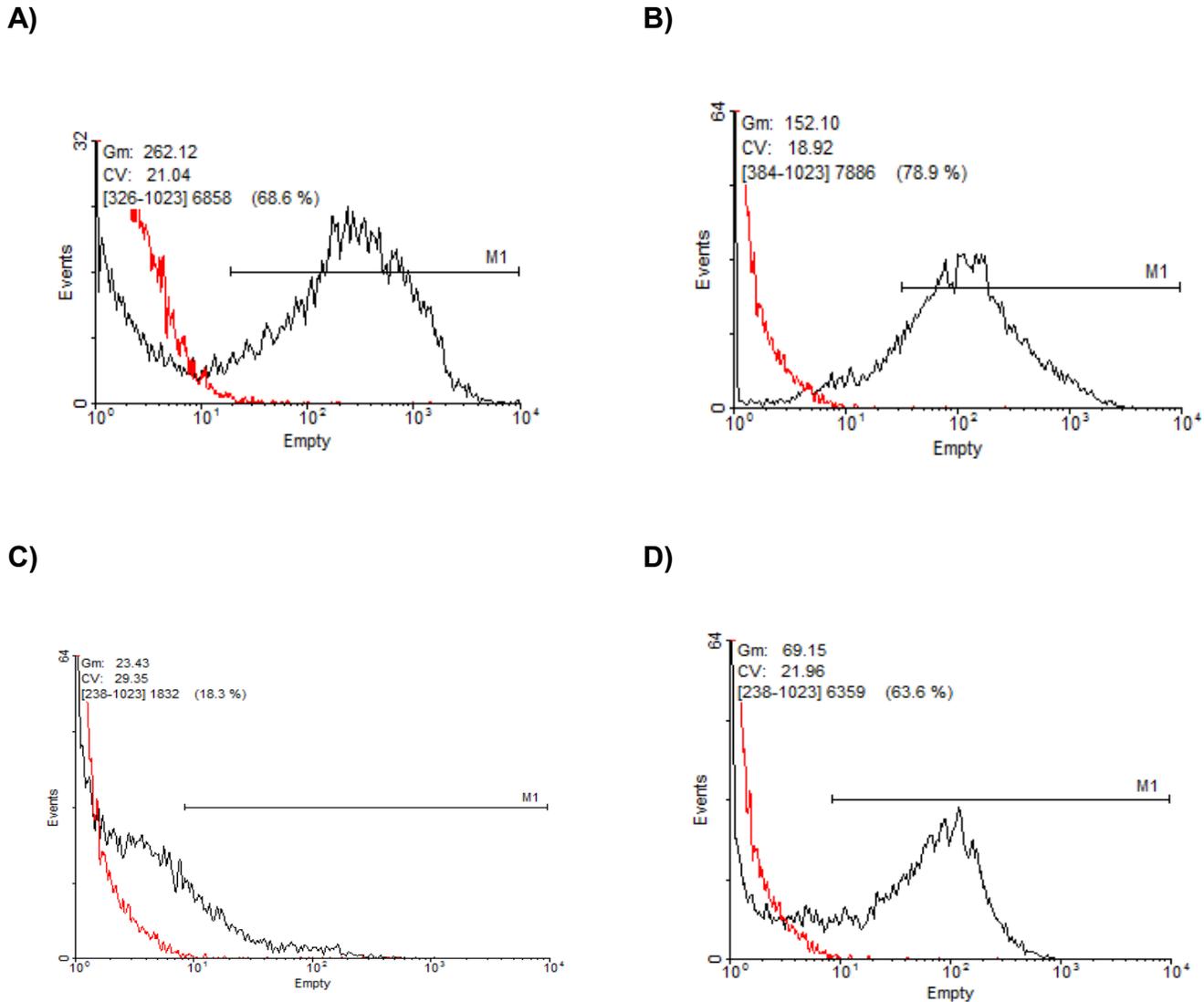


Figura 6. Caracterización de la BMDC mediante citometría de flujo. Las BMDC diferenciadas por 7 días con GM-CSF se caracterizaron mediante citometría de flujo analizando los marcadores de superficie CD11c (A), CD11b (B), CD86 (C) y MHC II (D). Los histogramas de color rojo en cada figura representan el control de células sin teñir, los histogramas de color negro las células teñidas y las líneas horizontales representan el porcentaje de células positivas para los marcadores. El eje Y indica el número de eventos (células) y el eje X la intensidad de fluorescencia emitida por dichas células para cada marcador en escala logarítmica.

Como se muestra en la Fig. 6, de un total de 10,000 eventos independientes para cada marcador de superficie, el 68.5% de las células expresaron el marcador de superficie CD11c, el cual se expresa de manera constitutiva en las DCs. El 79% expresaron el marcador CD11b. El 18% expresaron el marcador CD86 y el 63.5% expresaron el marcador MHC II, el cual se expresa de manera constitutiva en las DCs, aunque su expresión es mayor en las células maduras.

7.2 Infección de las BMDC con diferentes cepas de amastigotes de *L. mexicana*

Para constatar la infección de las células, estas fueron constantemente monitoreadas con microscopía óptica de luz y adicionalmente con objeto de obtener evidencia fotográfica de la infección con los amastigotes de *Leishmania*, también se realizaron preparaciones teñidas para visualizarse con microscopía de fluorescencia.

En la microscopía de luz como en la de fluorescencia (Fig. 7 y 8) se pudo observar la infección de las células. Las DCs monitoreadas con microscopía de luz se observaron directamente en las placas de 24 pozos al tiempo que transcurrían los tratamientos, mientras que las DCs teñidas se observaron en preparaciones fijadas al terminar la tinción. La primera observación de las células se realizó a las 24 h posteriores a la infección y en dichas observaciones los amastigotes ya se encontraron contenidos en vacuolas parasitóforas dentro de las BMCD, aunque las vacuolas solo se visualizaron en la microscopía de luz la cual no se muestra.

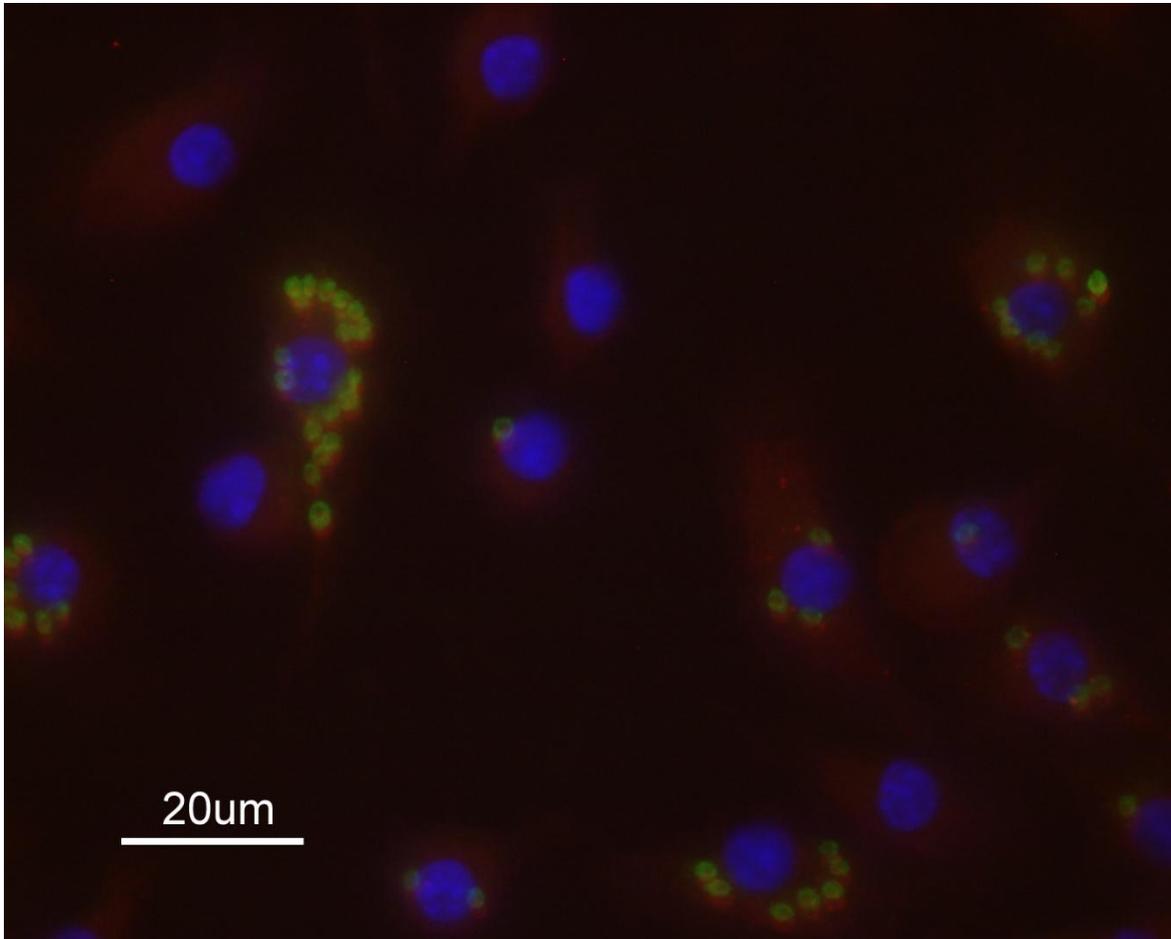


Figura 7. Fotomicrografía de fluorescencia de las BMDC después de 24 h de infección con amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC. Se pueden observar varias BMDC infectadas con amastigotes. En color rojo, teñido con Concanavalina A conjugada con TRITC, se observa la membrana, en color azul se observa el núcleo celular teñido con DAPI y en color verde se observan los parásitos teñidos con FITC.

Basándose únicamente en las observaciones de microscopía, no se observó diferencia significativa entre las infecciones con la cepa LAC y la DIACT, ya que ambas infectaron las células satisfactoriamente de manera semejante. Con la infección demostrada de las BMDC, se procedió a la lisis para evaluar la presencia proteínica y función de la ARG-1.

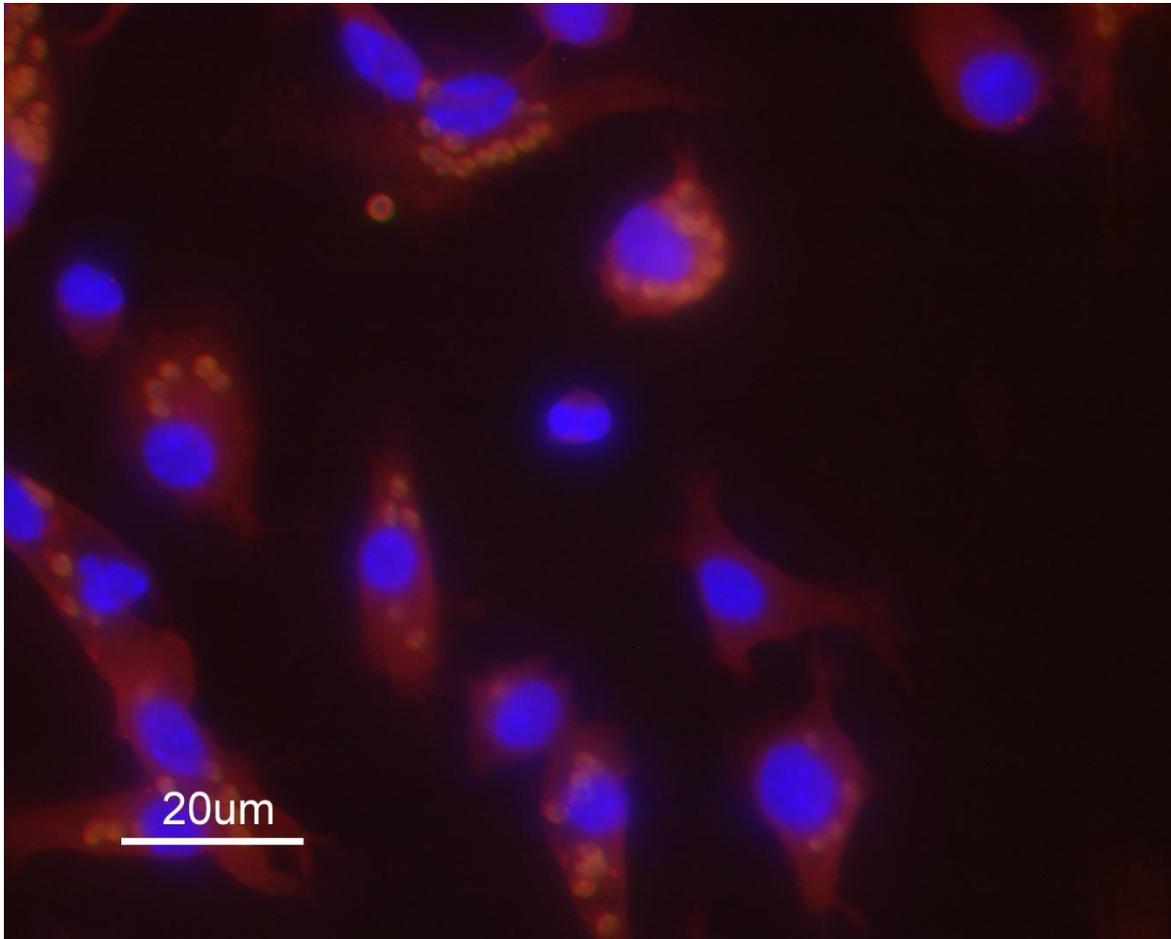


Figura 8. Fotomicrografía de fluorescencia de las BMDC después de 24 h de infección con amastigotes de *L. mexicana* de la cepa DIACT. Se observan varias BMDC infectadas con amastigotes. En color rojo, teñido con Concanavalina A conjugada con TRITC, se observa la membrana, en color azul se observa el núcleo celular teñido con DAPI y en color verde se observan los parásitos teñidos con FITC.

7.3 Análisis de la presencia proteínica de la ARG-1

Después de aplicar los diferentes estímulos con citocinas a las BMDC e infectarlas con los amastigotes de diferentes cepas de *L. mexicana*, se analizó la presencia proteínica de la ARG-1 mediante WB en nueve tratamientos, los cuales fueron: Basal, IL-4, TNF- α + IFN- γ , LAC, LAC + IL-4, LAC + TNF- α + IFN- γ , DIACT, DIACT + IL-4 y DIACT + TNF- α + IFN- γ (Fig. 9).

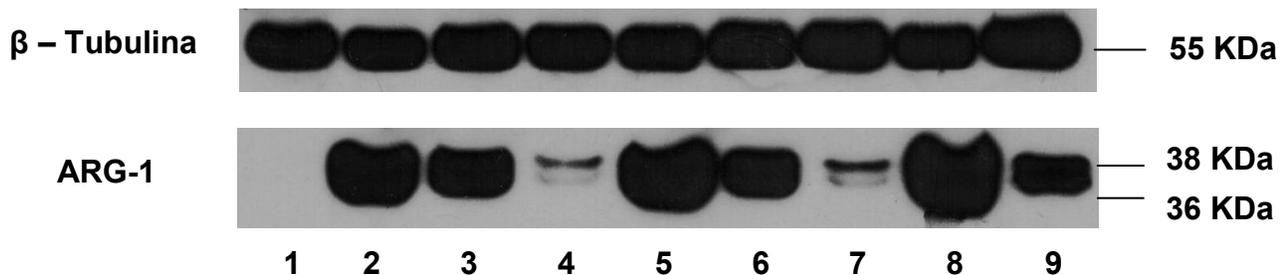


Figura 9. Western-blot de la presencia proteínica de la ARG-1 en BMDC murinas infectadas con amastigotes de diferentes cepas de *Leishmania mexicana* y estimuladas con diferentes citocinas y control de carga β-Tubulina. Las bandas de la parte superior corresponden al control de carga β-Tubulina y se sitúan en el peso de 55 KDa. Las bandas de la parte inferior corresponden a la presencia proteínica de la ARG-1 en los distintos tratamientos: 1. Basal, 2. IL-4, 3. TNF-α + IFN-γ, 4. LAC, 5. LAC + IL-4, 6. LAC + TNF-α + IFN-γ, 7. DIACT, 8. DIACT + IL-4, 9. DIACT + TNF-α + IFN-γ. Las subunidades reconocidas de la ARG-1 por los anticuerpos se sitúan en los pesos 38 KDa y 36 KDa.

Interesantemente ambas cepas de *L. mexicana*, tanto la LAC como la DIACT lograron inducir por sí mismas la enzima ARG-1 en las BMDC, mostrándose ligeramente más intensa la banda del tratamiento DIACT (7) que la del tratamiento LAC (4) en el blot de la Fig. 9. La condición basal no mostró una banda perceptible en el blot. Como se esperaba, en los tratamientos estimulados con IL-4 la inducción de la ARG-1 fue mayor con respecto del resto de los tratamientos y también de manera interesante se observa cierto sinergismo entre la citocina Th2 y las cepas de parásitos, ya que las banda del tratamiento DIACT + IL-4 (8) y LAC + IL-4 (5) son más intensas que las del tratamiento IL-4 (2). Los tratamientos estimulados con TNF-α + IFN-γ e infectados con las diferentes cepas mostraron una inducción de la ARG-1 semejante, mayor que la de los tratamientos sin estimular y menor que la de los estimulados con IL-4 e infectados con las diferentes cepas.

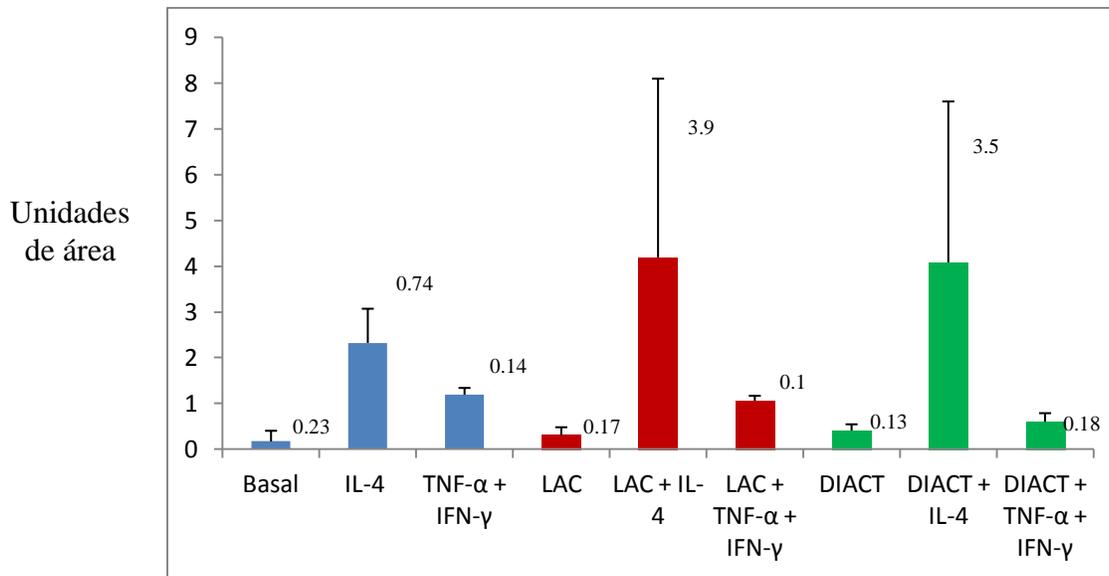


Figura 10. Análisis de densitometría realizado a las bandas de los tratamientos. Las barras de color azul muestran los tratamientos sin infectar, las de color rojo los infectados con la cepa LAC y las de color verde los infectados con la cepa DIACT. El eje Y indica las unidades de área ocupadas por las bandas en el film y el eje X los distintos tratamientos de las BMDC. El valor de la desviación estándar se indica a la derecha de cada barra. n=3.

El análisis de densitometría de la Fig. 10 corrobora la tendencia antes observada en el blot, la cepa LAC indujo casi el doble la ARG-1 con respecto a la condición basal y la cepa DIACT casi dos veces y media más, aunque también se puede ver que la inducción diferencial de la ARG-1 entre la cepa LAC y la DIACT es pequeña, evento que ocurre de manera muy semejante en la inducción diferencial entre el tratamiento LAC + IL-4 y DIACT + IL-4.

7.4 Análisis de la actividad de la ARG-1

La actividad de la ARG-1 se analizó cuantificando la urea producida por la enzima durante la hidrólisis de L-arginina *in vitro*, mediante un ensayo colorimétrico basado en la interacción de la urea con el reactivo α -isonitrosopropiofenona para

formar un compuesto azo el cual es analizado mediante espectrofotometría. De manera semejante a como se observó en el análisis de la presencia proteínica, la actividad de ARG-1 es mucho mayor en los tratamientos estimulados con IL-4, mismos que muestran una producción de urea semejante, lo que sugiere que la actividad enzimática es inducida mayormente por el estímulo con IL-4 y no por los parásitos. Los tratamientos en los que las BMDC no fueron estimuladas con citocinas, tienen la menor actividad de ARG-1 y también se observa una ligera mayor actividad diferencial en el tratamiento DIACT con respecto al tratamiento LAC. De manera semejante al resultado obtenido en el análisis de la presencia proteínica, la actividad de ARG-1 fue muy similar entre los tratamientos TNF- α + IFN- γ y LAC + TNF- α + IFN- γ , pero menor en el tratamiento DIACT + TNF- α + IFN- γ .

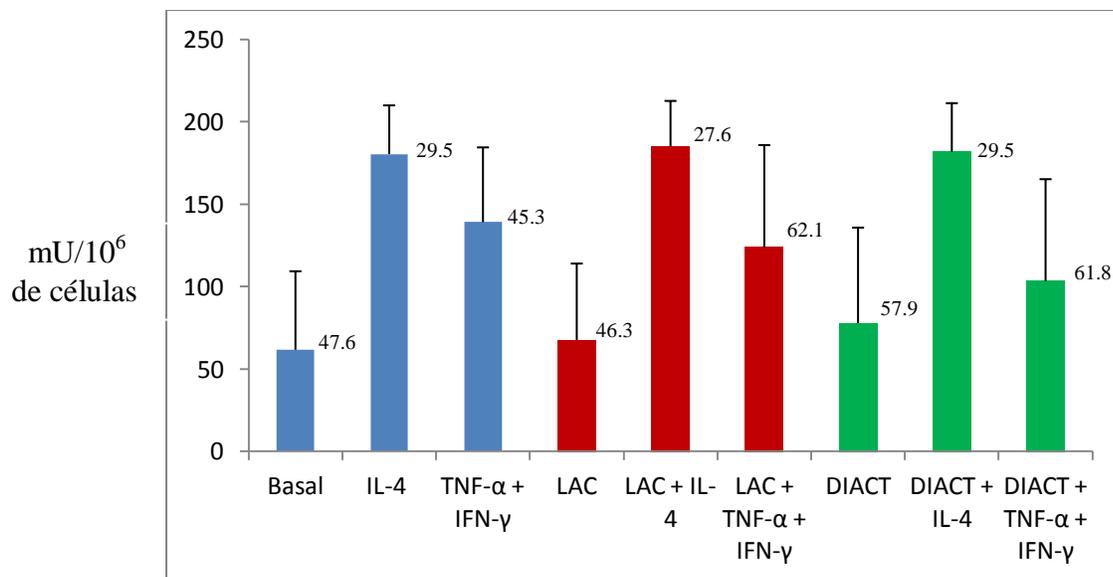


Figura 11. Gráfico de la actividad de ARG-1. Las barras de color azul muestran los tratamientos sin infectar, las de color rojo los infectados con la cepa LAC y las de color verde los infectados con la cepa DIACT. El eje Y indica la producción de urea en mU/10⁶ de células que es una medida indirecta de la actividad de ARG-1 y el eje X los distintos tratamientos de las BMDC. El valor de la desviación estándar se indica a la derecha de cada barra. n=3.

8. Discusión

La leishmaniasis es una enfermedad presente en el mundo y en nuestro país. Esta enfermedad se caracteriza por presentar un espectro de formas clínicas muy diverso, mismas que han sido adjudicadas a la respuesta inmune del hospedero y a la especie del parásito infectante. Siendo que una misma especie de *Leishmania* puede provocar diferentes manifestaciones clínicas, como es el caso de *L. mexicana*, causante de leishmaniasis cutánea localizada y difusa, es probable que existan diferencias entre cepas aisladas de pacientes con diferentes formas clínicas de leishmaniasis. Por otro lado, la presencia de la enzima ARG-1 juega un papel central en la leishmaniasis, ya que está demostrado que la inducción de esta enzima en MΦs está relacionada con la supervivencia del parásito (Iniesta *et al.*, 2001; 2002; Osorio *et al.*, 2012). El papel de esta enzima en la infección de DCs no ha sido evaluado. El objetivo de este trabajo fue determinar la inducción y actividad de la ARG-1 en BMDC infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de dos cepas diferentes, una aislada de un paciente con LCL y otra aislada de un paciente con LCD. La hipótesis planteada fue que los amastigotes de *L. mexicana* de las dos diferentes cepas ejercen un efecto diferencial en la inducción y actividad de la ARG-1. Con la finalidad de probar ésta hipótesis, el primer paso que se llevó a cabo fue la diferenciación de las BMDC a partir de precursores presentes en la médula ósea de ratones. El método seguido para la obtención de las BMDC fue una modificación del descrito por Lutz (Lutz *et al.*, 1999), en el que el cultivo se mantiene durante 12 días con el objetivo de obtener la máxima pureza, entendiéndose ésta como la ausencia de otros tipos celulares derivados de la médula ósea y principalmente la maduración de las DCs (Lutz *et al.*, 1999).

Para determinar el efecto que las cepas de *L. mexicana* ejercieron en la modulación de la ARG-1, era necesario que las BMDC estuvieran en estado inmaduro, ya que dicho estado conlleva la máxima capacidad fagocítica (Zuluaga *et al.*, 2004; Wallet y Tisch, 2005), característica deseable para una eficaz infección con los parásitos. El último día de cultivo de las BMDC fue el día 8, ya que en este día las células ya están diferenciadas a DCs en estado inmaduro (Lutz *et al.*, 1999). Las DCs se caracterizan por no adherirse a la placa de cultivo por lo que en el día 8 se colectaron las células en suspensión y se dejaron en reposo un día más con el fin de evitar y/o disminuir la activación de las células reduciendo así el riesgo del enmascaramiento de los fenómenos ocurridos, es decir, que la activación de las células sea inducida por la infección con los parásitos y no por otros factores. Con el fin de demostrar que con el método seguido logramos la correcta diferenciación de las DCs, éstas fueron caracterizadas mediante citometría de flujo utilizando marcadores propios de estas células. Los marcadores de superficie evaluados para caracterizar las células fueron elegidos no sólo por ser indicadores de la población celular estudiada, sino también porque son indicadores del estado de maduración. El CD11c, aunque no exclusivo de las DCs, se sobre expresa de forma constitutiva en éstas (Wang *et al.*, 2015), por tal motivo es idóneo como elemento de caracterización. Las BMDC obtenidas mostraron que el 68.5% (Fig. 6) fue positivo para este marcador, valor significativo al compararlo con el 46.8% reportado por Lutz (Lutz *et al.*, 1999) en el día 8 de cultivo. Otro de los marcadores utilizados fue el CD11b, el cual es un marcador del linaje mielode y se obtuvo que el 79% de las BMDC expresó el CD11b (Fig. 6). Este marcador lo presentan preferentemente las cDCs (Zuluaga y Robledo, 2004; Merad *et al.*,

2013), lo que es un indicador más de que la diferenciación de las DCs se realizó de forma correcta. Por otro lado, la molécula coestimuladora CD86 es un marcador altamente expresado en las DCs maduras (Zuluaga y Robledo, 2004; Wallet y Tisch, 2005) y sólo el 18% de las BMDC lo presentaron, lo que permite confirmar que obtuvimos una población celular inmadura y por lo tanto en la condición óptima para el estudio. Por último, aunque el MHC II se expresa en las DCs de manera constitutiva, la máxima expresión de éste se produce en el estado maduro (Zuluaga y Robledo, 2004; Wallet y Tisch, 2005). Además, es importante destacar que durante el progreso del cultivo de las BMDC y hasta su culminación se pueden diferenciar dos poblaciones de DCs, las DCs con alta expresión de MHC II, que pueden asociarse a un fenotipo maduro y las DCs con baja expresión de MHC II, las cuales se asocian a un fenotipo inmaduro (Lutz *et al.*, 1999). En nuestro caso el 63.5 % de la células analizadas mostró presencia del MHC II, lo que refuerza la idea de que la mayoría de las células cultivadas son dendríticas, aunque la no distinción entre la alta o baja expresión del MHC II no contribuye a verificar el estado de maduración usando este marcador, sin embargo, el resultado obtenido con el CD86 indica que la mayoría de las células presenta fenotipo inmaduro (Fig. 6). Las células utilizadas para todos los ensayos fueron tratadas y cultivadas de la misma manera que las utilizadas para la caracterización por lo que se asume que las células utilizadas en este estudio presentaron las características antes mencionadas. La capacidad fagocítica de las BMDC se demostró al observarlas al microscopio óptico de luz 24 h después de la incubación con los amastigotes de *L. mexicana*. Se observó que las BMDC estaban infectadas debido a la presencia de vacuolas parasitóforas con amastigotes en el interior, aunque

dichas vacuolas no se aprecian en la Fig. 7 y 8. En muchos casos se observó que el número de parásitos contenidos en una célula rebasó el cociente de infección, el cual fue de 1:5 (BMDC:parásitos), se contabilizaron incluso hasta más de 10 parásitos en una sola célula, lo cual fue indicativo de la buena capacidad fagocítica de las BMDC en estado inmaduro.

En las células utilizadas para evaluar la presencia proteínica y función de la ARG-1, la infección con los amastigotes de *L. mexicana* se mantuvo durante 48 h, que fue el mismo tiempo de estímulo con las citocinas IL-4 o TNF- α + IFN- γ , con lo que se alcanzó el día 10. Finalizado el tiempo de estimulación, las BMDC fueron nuevamente observadas al microscopio óptico y fue interesante ver que en las BMDC tratadas con las citocinas Th1, TNF- α e IFN- γ , los amastigotes contenidos en éstas tenían una morfología atípica y no definida, casi fragmentada, lo que indicó que en estos tratamientos los parásitos fueron eliminados por las BMDC, lo cual concuerda con lo reportado previamente por nuestro grupo (Wilkins *et al.*, 2010). Por otro lado, en las BMDC que no fueron estimuladas, pero si infectadas con los amastigotes de *L. mexicana*, así como en las estimuladas con IL-4, se observó que los parásitos presentaban una morfología normal. La microscopía óptica de luz fue suficiente para verificar la correcta infección de las células, sin embargo, con el objetivo de obtener una evidencia más tangible de la infección de las células, se realizó la microscopía de fluorescencia de las BMDC infectadas con las dos diferentes cepas de *L. mexicana*.

Una vez diferenciadas las BMDC, caracterizadas y demostrada la correcta infección con los amastigotes de *L. mexicana*, proseguimos con el objetivo principal de éste proyecto de demostrar el efecto de los amastigotes de *L.*

mexicana de dos diferentes cepas, una aislada de un paciente con LCL (LAC) y otra de un paciente con LCD (DIACT), en la presencia proteínica y actividad de la ARG-1. El interés de analizar esto se debió a que la actividad de la ARG-1 promueve la síntesis de poliaminas que son beneficiosas para el parásito (Iniesta *et al.*, 2001; 2002). Por otro lado, siendo que diferentes cepas de una misma especie de *Leishmania* pueden producir formas clínicas con distinto grado de patogenicidad (Ritter *et al.*, 2004; Baptista *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009; Alimohammadian *et al.*, 2010; Markikou *et al.*, 2012), es probable que una de las causas involucradas en la mayor patogenicidad pueda deberse a una mejor capacidad de inducir la presencia proteínica y actividad de la ARG-1. La capacidad de *Leishmania* de inducir la ARG-1 se evaluó mediante un ensayo de WB y la actividad enzimática mediante la reacción de Archibald, un ensayo colorimétrico que cuantifica la urea producida. Se evaluaron estos dos parámetros debido a que aunque la enzima esté presente puede estar activa y esta última condición está correlacionada con la patogenicidad (Kropf *et al.*, 2005; Modolell *et al.*, 2009; Abebe *et al.*, 2012; Osorio *et al.*, 2012).

Las BMDC se estimularon con IL-4, citocina Th2, que está demostrado estimula la inducción de la ARG-1 o con TNF- α + IFN- γ , citocinas Th1, que inducen a la iNOS, enzima que comparte el sustrato L-arginina con la ARG-1 y se infectaron con amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC, aislada de un paciente con LCL o de la cepa DIACT, aislada de un paciente con LCD. Se infectaron también las BMDC sin estimular con las citocinas. Interesantemente observamos que ambas cepas de *L. mexicana* tuvieron la capacidad de inducir la ARG-1 de manera similar en las BMDC no estimuladas (Fig. 9). Este hecho es muy importante, ya que contrasta

con lo que ha sido demostrado en los MΦs, en los que *Leishmania* no induce la ARG-1. En MΦs murinos se requiere de la estimulación con IL-4 y no por efecto del parásito únicamente (Iniesta *et al.*, 2001; 2002; 2005). La capacidad de la IL-4 de inducir la ARG-1 ha sido demostrada tanto en los MΦs como en las DCs (Munder *et al.*, 1999; Surace y Li, 2013) y nuestros resultados coinciden con esto tal como se observó en la condición de las BMDC estimuladas con la IL-4 (Fig. 9). La mayor inducción de la ARG-1 se observó en las BMDC estimuladas con la IL-4 e infectadas con los amastigotes de *L. mexicana*, tanto los provenientes de LCL como de LCD. Se sabe que el parásito en conjunto con la IL-4 pueden aumentar la inducción y la actividad de la ARG-1 (Kropf *et al.*, 2005). Por otro lado, observamos que en los tratamientos estimulados con TNF- α e IFN- γ se indujo la presencia proteínica de la ARG-1 en un nivel menor. Aunque la principal inducción de esta enzima se logra con la IL-4, las citocinas Th1 TNF- α e IFN- γ pueden inducir la ARG-1 en los MΦs, ya que la vía de señalización inducida por el IFN- γ en el MΦs puede generar factores de transcripción que traslapen con el promotor del gen de la ARG-1 y el TNF- α induce la producción de IL-10, cuya vía de señalización también puede inducir la ARG-1 de la misma manera que el IFN- γ , de éste modo podría explicarse la inducción de la ARG-1 en las DCs. La observación al microscopio óptico de las BMDC sometidas a los diferentes tratamientos permitió corroborar que el estímulo con las citocinas Th1 provocó la eliminación de los amastigotes por las BMDC, lo cual fue demostrado previamente por nuestro grupo (Wilkins *et al.*, 2010).

Al comparar el efecto de los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC (LCL) y la cepa DIACT (LCD) se observó que la cepa DIACT tuvo una inducción

ligeramente mayor de la ARG-1 en comparación con la cepa LAC (Fig. 9 y 10). Esta misma tendencia se conservó entre los tratamientos de las BMDC con IL-4 e infectados con las diferentes cepas (Fig. 9 y 10). El tratamiento de las BMDC con las citocinas Th1 e infección con las cepas LAC o DIACT mostró una inducción semejante de la ARG-1, quizás debido a que se trata de una inducción basal que a posteriori puede resultar beneficiosa para la reparación del tejido. Para corroborar lo anterior con un análisis cuantitativo, se realizó la densitometría de las bandas obtenidas en tres experimentos independientes. La información proporcionada por éste análisis indicó que las ligeras tendencias antes observadas se mantuvieron, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre la inducción de la ARG-1 producida por la cepa LAC y por la DIACT. Se pudo observar solo una ligera mayor inducción de la ARG-1 por la cepa DIACT con respecto de la cepa LAC, pero sólo en ausencia de IL-4 (Fig. 10). El estímulo de las BMDC con la IL-4 en conjunto con la infección con alguna de las cepas provocó la inducción de la ARG-1 de forma similar. Además de analizar el efecto de las cepas en la presencia proteínica de la ARG-1, resultó muy importante demostrar la actividad de la enzima. Ésta se evaluó por el método descrito por Corraliza (Corraliza *et al.*, 1995) que cuantifica la cantidad de urea producida durante la hidrólisis de la L-arginina en ornitina como medida indirecta de la actividad de la ARG-1. En el análisis de la presencia proteínica de la ARG-1 en las BMDC observamos que los parásitos inducen la enzima de manera semejante y con el estímulo de IL-4 se produjo un sinergismo que incrementó la inducción de la enzima. Sin embargo, esto no se correlaciona con lo ocurrido con la actividad enzimática, la cual parece aumentar únicamente por el estímulo producido por la IL-4 y en menor medida por el

estímulo con las citocinas Th1. Lo anterior se ve reforzado por el hecho de que la actividad de ARG-1 fue semejante en el caso de las BMDC sin estímulo y las infectadas con las cepas LAC y DIACT.

Se ha demostrado que en los MΦs murinos la presencia proteínica de la ARG-1 está correlacionada con la actividad enzimática (Kropf *et al.*, 2005), fenómeno que no observamos en este estudio con las BMDC, sin embargo, como en los MΦs, la IL-4 es el promotor más importante de la actividad de ARG-1 (Iniesta *et al.*, 2001, 2002, 2005).

9. Conclusión

En este estudio se sugiere que los amastigotes de *L. mexicana* tienen la capacidad de inducir por sí mismos, sin el requerimiento de otro estímulo, la expresión de la ARG-1 en las BMDC murinas, fenómeno que no ocurre en los MΦs, en los que la expresión de la ARG-1 requiere del estímulo con IL-4. Las dos cepas de *L. mexicana* analizadas, una aislada de un paciente con LCL y otra de un paciente con LCD, no mostraron diferencias significativas en la inducción de la ARG-1. Interesantemente la inducción de la ARG-1 se potencia cuando la IL-4 actúa en sinergismo con los amastigotes. El hecho de que los amastigotes de *L. mexicana* tengan la capacidad de inducir la enzima por sí mismos en las BMDC sugiere que sus posibilidades de supervivencia se incrementan en estas células, las cuales podrían aumentar aún más en un ambiente inmunológico del tipo Th2. Por otro lado, los amastigotes de *L. mexicana* de ambas cepas indujeron la presencia proteínica de la ARG-1 de manera semejante en las BMDC, pero no aumentaron la actividad, esta última se debió mayoritariamente al efecto de la IL-

4. Finalmente, la presencia proteínica y función de la ARG-1 no se modulan significativamente de manera diferencial en las BMDC murinas ante la presencia de los amastigotes de las cepas LAC y DIACT.

10. Perspectivas

El hecho de que los amastigotes de *L. mexicana* tengan la capacidad de inducir la ARG-1 en las DCs por si mismos es el hallazgo más relevante de este trabajo. Por esta razón, la continuación de esta línea de investigación sobre el estudio de la ARG-1 en las DCs como consecuencia de la infección por *L. mexicana* debe seguir por esta vertiente, es decir, con el objetivo de valorar la contribución de este hecho en la patogenicidad que *L. mexicana* produce en el hospedero, ya que quizás, de ser un elemento clave en la patogenicidad, podría generar un enfoque nuevo en la búsqueda de tratamientos contra esta enfermedad.

Aunque en este estudio no se hayan observado diferencias significativas en el efecto ejercido sobre la ARG-1 por las cepas utilizadas, esto no cierra la posibilidad de que otras cepas si lo tengan, ya que *L. mexicana* tiene la capacidad de producir dos diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis, por lo que también podrían analizarse nuevas cepas de *L. mexicana*.

11. Bibliografía

1. Abebe, T, Hailu, A, Woldeyes, M, Mekonen, W, Bilcha, K, Cloke, T, Fry, L, Seich al Basatena, NK, Corware, K, Modolell, M, Munder, M, Tacchini-Cottier, F, Müller, I, Kropf, P. (2012). Local Increase of Arginase Activity in Lesions of Patients with Cutaneous Leishmaniasis in Ethiopia. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 6, Issue 6, e1684.
2. Alimohammadian, MH, Darabi, H, Ajdary, S, Khaze, V, Torkabadi, E. (2010). Genotypically distinct strains of *Leishmania major* display diverse clinical and immunological patterns in BALB/c mice. *Infection, Genetics and Evolution*. 10: 969-975.
3. Alvar, J. (2001). Las leishmaniasis: de la biología al control, Ed. Laboratorio Intervet, S.A. 235 p.
4. Alvar, J, Velez, ID, Bern, C, Herrero, M, Desjeux, P, Cano, J, Jannin, J, den Boer, M, the WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PloS ONE*. 7:5, e35671.
5. Ampuero, JS. (2000). Leishmaniasis. Módulos técnicos. Ministerio de Salud del Perú, Serie Documentos Monográficos, no. 8. 80 p.
6. Argueta-Donohué, J, Wilkins-Rodríguez, AA, Aguirre-García, M, Gutiérrez-Kobeh, L. (2015). Diferencial phagocytosis of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes by monocyte-derived dendritic cells. *Microbiol-immunol*. Sep 24.
7. Baptista-Fernandes, T, Marques, C, Roos Rodrigues, O, Santos-Gomes, GM. (2007). Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*. 30: 41-53.
8. Bhatt, S, Qin, J, Bennett, C, Qian, S, Fung, JJ, Hamilton, TA, Lu, L. (2014). All-trans Retinoic Acid Induces Arginase-1 and Inducible Nitric Oxide Synthase–Producing Dendritic Cells with T Cell Inhibitory Function. *J. immunol*. 192: 5098-5108
9. Becerril, MA. (2008). Parasitología Médica. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, 308 p.
10. Blank, C, Fuchs, H, Rappersberger, K, Rollinghoff, M, Moll, H. (1993). Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis*, 167: 418-425.
11. Brittingham, A, Morrison CJ, McMaster, WR, McGwire, BS, Chang, KP, Mosser, DM. (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol*. 155(6): 3102-3111.
12. Bogdan, C. (2012). Natural Killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2:69.
13. Cardozo, C, Rodríguez, P, Marín, M. (2009). Caracterización molecular del complejo de especies *Ralstonia solanacearum* en la zona bananera de Urabá. *Agronomía Colombiana*. 27(2): 302-210.
14. Chakraborty, P, Ghosh, D, Basu, MK. (2001). Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes. *J of Parasitology*. 87(5): 1023-1027).

15. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Leishmaniasis/Epidemiology & Risk Factors. <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>. (Consultado el 17 de Junio de 2015).
16. Colmenares, M, Puig-Kröger, Muñiz Pellos, O, Corbí, AL, Rivas, L. (2002). Dendritic Cell (DC)-specific Intercellular Adhesion Molecule 3 (ICAM-3)-grabbing Nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type Surface Lectin in Human DCs, Is a Receptor for *Leishmania* Amastigotes. *J of Biological Chemistry*. 227(39): 36766-36769.
17. Corraliza, IM, Soler, G, Eichmann, K, Modolell, M. (1995). Arginase Induction by Suppressors of Nitric Oxide Synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in Murine Bone Marrow Derived Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 206 (2): 667-673.
18. Correa Manjolin, L, Goncalves dos Reis, MB, do Carmo Maquiaveli, C, Andrade Santos Filho, O, da Silva, ER. (2013). Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Food Chemistry*, 14: 2253-2262.
19. Dijkshoorn, L, Ursing, BM, Ursing, JB. (2000). Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *J. Med. Microbiol*. 49: 397-401.
20. Dong, L, Chahnaz, K, Nazzy, P, Althea, AC, Stephen, MB, Phillip, S, Jude, EU. (2009). *Leishmania* major Phosphoglycans Influence the Host Early Immune Response by Modulating Dendritic Cell Functions. *Infection and Immunity*. 77(8): 3272-3283.
21. Dong, L, Uzonna, JE. (2012). The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Volume 2, Article 83.
22. Duminil, J, Kenfack, D, Viscosi, V, Grumiau, L, Hardy, OJ. (2011). Testing species delimitation in sympatric species complexes: The case of an African tropical tree, *Carapa* spp. (Meliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 62: 275-285.
23. Gobert, AP, Daulouede, S, Lepoivre, M, Boucher, JL, Bouteille, B, Buguet, A, Cespuglio, R, Veyret, B, Vincendeau, P. (2000). L-Arginine Availability Modulates Local Nitric Oxide Production and Parasite Killing In Experimental Trypanosomiasis. *Infection and Immunity*. 6(8): 4653-4657.
24. González, C, Rebollar-Téllez, EA, Ibáñez-Bernal, S, Becker-Fausser, I, Martínez-Meyer, E, Townsend Peterson, A, Sánchez-Cordero, V. (2011). Current Knowledge of *Leishmania* Vectors in Mexico: How Geographic Distributions of Species Relate to Transmission Areas. *Am.J.Trop.Med.Hyg*. 85(5): 839-846.
25. Granados, D, Delgado, G. (2008) Células Dendríticas (CDs) diferenciadas a partir de Monocitos humanos como herramienta para el estudio de agentes antileishmaniales. *Nova-Publicación científica en ciencias biomédicas*. 236: 162-169.
26. Guilliams, M, Ginhoux, F, Jakubzick, C, Naik, SH, Onai, N, Schraml, BU, Segura, E, Tussiwand, R, Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature base don ontogeny. *Nature Reviews Immunology*. 14: 571-578.
27. Gwendalyn, Jr, Ochando, J, Partida-Sánchez, S. (2008) Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. *Annu. Rev. Immunol*. 26: 293-316.

28. Hansmannel, F, Sillaire, A, Kamboh, MI, Lendon, C, Pasquier, F, Hannequin, D, Laumet, G, Mounier, A, Ayral, AM, DeKosky, ST, Hauw, JJ, Berr, C, Mann, D, Amouyel, F, Campion, D, Lambert, JC. (2010). Is the urea cycle involved in Alzheimer's disease?. *J Alzheimers Dis.* 21(3): 1013–1021.
29. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE). LEISHMANIASIS EN MÉXICO. http://www.indre.salud.gob.mx/interior/leishmaniasis_en_mexico.html. (Consultado el 17 de Junio de 2015).
30. Iniesta, V, Gómez-Nieto, Molano, I, Mohedano, A, Carcelén, J, Mirón, C, Alonso, C, Corraliza, I. (2002). Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunology.* 24: 113-118.
31. Iniesta, V, Carcelén, J, Molano, I, Peixoto, PMV, Redondo, E, Parra, P, Mangas, M, Monroy, I, Campo, ML, Gómez Nieto, C, Corraliza, I. (2005). Arginase I Induction during *Leishmania major* Infection Mediates the Development of Disease. *Infection and Immunity.* 73(9): 6085-6090.
32. Iniesta, V, Gómez-Nieto, LC, Corraliza, I. (2001) The Inhibition of Arginase by N-Hydroxy-L-Arginine Controls the Growth of *Leishmania* Inside Macrophages. *J. Exp. Med.* 193(6): 777-783.
33. Iyamu, EW, Asakura, T, Woods, GM. (2008). A Colorimetric Microplate Assay Method for High Throughput Analysis of Arginase Activity in Vitro. *Anal Biochem.* 382(2): 332-334.
34. Kaye, P, Scott, P. (2011) Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews/Microbiology.* 9: 604-605.
35. Kropf, P, Fuentes, JM, Fähnrich, E, Arpa, L, Herath, S, Weber, V, Soler, G, Celada, A, Modolell, M, Müller, I. (2005). *The FASEB Journal.* express article 10.1096/fj.04-3416fje. 25 p.
36. Kumar, A. (2013). *Leishmania and Leishmaniasis.* Ed. Springer, 83 p.
37. Liese, J, Schleicher, U, Bogdan, C. (2008). The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology.* 213: 377-387.
38. Lutz, MB, Kukutsch, N, Ogilvie, ALJ, Rößner, S, Koch, F, Romani, K, Schuler, G. (1999). An advanced cultura method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J of Immunological Methods.* 223: 77-92.
39. Marcili, A, Speranca, M Ap, da Costa, AP, Madeira, M de F, Soares, HS, Sanches, C de OCC, Acosta, I da CL, Giroto, A, Minervino, AHH, Horta, MC, Shaw, JJ, Gennari, SM. (2014). Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (L.) *infantum* *chagasi* in South America. *Infection, Genetics and Evolution.* 25: 44-51.
40. Markikou-Ouni, W, Ben Achour-Chenik, Meddebeb-Garnaoui, A. (2012). Effects of *Leishmania major* clones showing different levels of virulence on infectivity, differentiation and maturation of human dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology.* 169: 273-280.

41. Merad, M, Sathe, P, Miller, j, Mortha, A. (2013) The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31.
42. Modolell, M, Choi, BS, Ryan, RO, Hancock, M, Titus, RG, Abebe, T, Hailu, A, Müller, I, Rogers, ME, Bangham, CRM, Munder, M, Kropf, P. (2009). Local suppression of T Cell Responses by Arginase-Induced L-Arginine Depletion in Nonhealing Leishmaniasis. *Plos Neglected Tropical Diseases.* 3, issue 7, e480.
43. Mosser, DM, Edelson, PJ. (1985). The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of Leishmania promastigotes. *J Immunol.* 135(4): 2785-2789.
44. Munder, M, Eichmann, K, Morán, JM, Centeno, F, Soler, G, Modolell, M. (1999). Th1/Th2-Regulated Expression of Arginase Isoforms in Murine Macrophages and Dendritic Cells. *J Immunol.* 163: 3771-3777.
45. Muskus, CE, Marín-Villa, M. (2002). Metaciclologénesis: un proceso fundamental de la biología de Leishmania. *Biomédica.* 22: 167-177.
46. Naderer, T, McConville, MJ. (2008). The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular Microbiology.* 10(2): 301.308.
47. Organización mundial de la salud (OMS). (2012). Control de la Leishmaniasis, Informe de una reunión del comité de expertos de la OMS sobre el control de la Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. *OMS Serie de informes técnicos.* 949
48. Osorio, EY, Zhao, W, Espitia, C, Saldarriaga, O, Hawel, L, Byus, CV, Travi, BL, Melby, PC. (2012) Progressive Visceral Leishmaniasis is Driven by Dominant Parasite-induced STAT6 Activation and STAT6-dependent Host Arginase 1 Expression. *Plos Pathogens.* 8, Issue 1, e1002417.
49. Pereira, CG, Silva, ALN, de Castilhos, P, Mastrantonio, EC, Souza, RA, Romao, RP, Rezende, RJ, Pena, JDO, Beletti, ME, Souza, MA. (2009). Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Veterinary Parasitology.* 165: 231-240.
50. Prajeeth, CK, Haeberlein ,S, Sebald, H, Schleicher, U, Bogdan ,C. (2011). *Leishmania*-Infected Macrophages Are Targets of NK Cell-Derived Cytokines but Not of NK Cell Cytotoxicity. *Infection and Immunity.* 79(7): 2699-2708.
51. Reguera, RM, Balaña-Fouce, R, Showalter, M, Hickerson, S, Beverley, SM. (2009). *Leishmania major* lacking arginase are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. *Mol Biochem Parasitol.* 165(1): 48-56.
52. Reizis, B, Bunin, A, Ghosh, HS, Lewis, KL, Sisirak, V. (2011). Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. *Annu. Rev. Immunol.* 29: 163-183.
53. Ritter, U, Mattner, J, Soares Rocha, J, Bogdan, C, Jörner, H. (2004). The control of *Leishmania (Leishmania) major* by TNF in vivo is dependen on the parasite strain. *Microbes and Infection.* 6: 559-565.
54. Sallusto, F, Lanzavecchia, A. (2002). The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.* 4(3): S-127-S132.

55. Santos, ALS, Branquinha, MH, d'Avila-Levy, CM, Kneipp, LF, Sodré CL. (2014). Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma*. Ed. Springer, 381 p.
56. Srivastava, S, Pandey, SP, Jha, MK, Chandel, HS, Saha, B. (2013). *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clinical and Experimental Immunology*. 172: 403–409.
57. Steinman, RM. (2012). Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Immunol*. 30: 1–22.
58. Steinman, RM, Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 449: 419-426.
59. Stempin, CC, Cerban, FM. (2007). Macrófagos e inducción de arginasa como mecanismo de evasión de parásitos. *Medicina*. 67: 737-746.
60. Surace, MJ, Li, L. (2013). Potent suppression of arginase 1 expression in murine macrophages by low dose endotoxin. *Am J Clin Exp Immunol*. 2(1): 117-123.
61. Wallet, MA, Tisch, R. (2005). Immunoregulation of Dendritic Cells. *Clinical Medicine & Research*. 3: 166-175.
62. Wanasen, N, Soong, L. (2008). L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res*. 41: 15-25.
63. Wang, Y, Xu, B, Hu, WW, Chen, LJ, Wu, CP, Lu, BF, Shen, YP, Jiang, JT. (2015). High expression of CD11c indicates favorable prognosis in patients with gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 21(31): 9403-9412.
64. Wilkins-Rodríguez, A, Escalona-Montaña, AR, Aguirre-García, MM, Becker, I, Gutiérrez-Kobeh, L. (2010). Regulation of the expression of nitric oxide Synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Exp Parasitol*. 126: 426-434.
65. Wilson, ME, Pearson, RD. (1988). Roles of CR3 and Mannose Receptors in the Attachment and Ingestion of *Leishmania donovani* by Human Mononuclear Phagocytes. *Infection and Immunity*. 56(2): 363-369.
66. Woelbing, F, Lopez Kostka, S, Moelle, K, Belkais, Y, Sunderkoetter, C, Verbeek, S, Waisman, A, Nigg, AP, Knop, J, Udey, MC, von Stebut, E. (2006). Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J of Experimental Medicine*. 1: 177-188.
67. Zuluaga, M, Robledo, SM. (2004). Las células de Langerhans en la inmunidad a la leishmaniasis. *Biomédica*. 24: 302-317.