



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFEECTO DE DOS DIFERENTES CEPAS DE *Leishmania mexicana*, UNA DE UN PACIENTE CON LCL Y OTRA LCD, SOBRE LA PRESENCIA PROTEÍNIC Y ACTIVIDAD DE LA INOS EN TRES POBLACIONES DE MACRÓFAGOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA VICTORIA MENDOZA TRUJILLO



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
CIUDAD DE MÉXICO, (2018)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
Ana Victoria
Mendoza
Trujillo
5541740416
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306163357
2. Datos del tutor
Dra.
Laila
Gutiérrez
Kobeh
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Rosaura
Mayén
Estrada
4. Datos del sinodal 2
Dra.
María Magdalena
Aguirre
García
5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Isabel Cristina
Cañeda
Guzmán
6. Datos del sinodal 4
Dr.
Andrés Eliú
Castell
Rodríguez
7. Datos del trabajo escrito
Efecto de dos diferentes cepas de *Leishmania mexicana*, una de un paciente con LCL y otra LCD, sobre la presencia proteínica y la actividad de la iNOS en tres poblaciones de macrófagos. 54p. 2018.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de mis anhelos más grandes de mi vida, fruto del inmenso apoyo, amor y confianza que en mí depositaron por lo cual les viviré eternamente agradecida. Con cariño y respeto.

A Sergio, por esas peleas de niños, que después se volverían pláticas y consejos.

A la Dra. Laila, por todo el apoyo, dedicación y constancia en mi trabajo y en mí, por esa facilidad y gran calidez para transmitir los conocimientos, mi admiración para usted. Muchas gracias.

Gracias al Proyecto Papiit, DGAPA, UNAM no. IN 225116

A mis sinodales, la Dra. Rosaura Mayén Estrada, la Dra. Magdalena Aguirre, la M. en C. Cristina Cañeda y el Dr. Andrés Eliú Castell, por la disposición para revisar mi tesis y realizar observaciones tan valiosas que hicieron de éste, un mejor trabajo.

A Arturo, Edith y Alma por su paciencia y apoyo durante mi estancia en el laboratorio, por sus enseñanzas y su ayuda en la realización de los experimentos y su análisis. A Oscar, Ilse, Fabián y Omar que me enseñaron lo que es trabajar en equipo e hicieron más placentera esta etapa.

A Jaime Chimal por tu apoyo, amistad e insistencia para lograr este objetivo, por esos días de baile y café.

A Bere, Alma y Rubén por todo lo vivido, por buscar siempre mi bienestar por aportar una parte de ustedes en mí, porque la distancia no nos aleja.

A May, Gen y libe, por todas las locuras, “travesuras” y confidencialidad, por sus palabras de aliento y sinceridad.

A todos mis familiares y amigos que estuvieron a lo largo de este tiempo, muchas gracias!

Dedicatoria

A MIS ABUELOS

“Aunque estén tan lejos los tengo muy cerca, los tengo guardados en mi corazón”.

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
I.1. Leishmaniasis	10
I.1.1. Leishmaniasis cutánea (LC).....	10
I.1.2. Leishmaniasis mucocutánea (LMC).....	11
I.1.3. Leishmaniasis visceral (LV).....	12
I.1.4. Distribución geográfica	13
I.2. El parásito <i>Leishmania</i>	13
I.2.1. Taxonomía.....	13
I.2.2. Estados morfológicos	16
I.2.3. Morfología y fisiología	17
I.2.4. Ciclo de vida	18
I.3. Macrófagos	19
I.3.1. Activación clásica y alternativa de los macrófagos	21
I.4. Mecanismos leishmanicidas	22
I.4.1. Óxido nítrico	23
I.5. Sintasa inducible del óxido nítrico	24
I.6. Diferencias intraespecíficas en las especies de <i>Leishmania</i> : presencia de cepas	25
II. JUSTIFICACIÓN.....	27
III. HIPÓTESIS	27
IV. OBJETIVOS	28
V. MATERIAL Y MÉTODOS	28
V.1. Cultivo de macrófagos de la línea celular THP-1.....	28
V.2. Cultivo de macrófagos diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica	29
V.3. Diferenciación de macrófagos murinos a partir de médula ósea	31
V.4. Cultivo de amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	31
V.5. Tratamiento de los macrófagos de la línea celular THP-1, macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana y macrófagos derivados de médula ósea de ratón	32
V.6. Extracción de proteína total	33
V.6.1. Lisis	33
V.7. Cuantificación de proteína por el método RC-DC de Bio-Rad	33
V.8. Identificación de la presencia proteínica de la iNOS por Western-blot (Wb)	34

V.9. Cuantificación de nitritos	35
VI. RESULTADOS	35
VI.1. Determinación de la presencia proteínica de la iNOS en la línea celular THP-1	35
VI.2. Determinación de la presencia proteínica de la iNOS en macrófagos diferenciados de monocitos de sangre periférica humana por adherencia	38
VI.3. Determinación de la presencia proteínica de la iNOS en macrófagos diferenciados de monocitos de sangre periférica de humano con GM-CSF	38
VI.4. Determinación de la presencia proteínica de la iNOS en macrófagos diferenciados de medula ósea de ratón	39
VI.5. Determinación de la función de la iNOS mediante la cuantificación de nitritos	41
VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	43
VIII. BIBLIOGRAFÍA	50

Abreviaturas

Am	Amastigotes
APC	Célula presentadora de antígenos
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
FBS	Suero fetal bovino
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
IFN-γ	Interferón gamma
iNOS	Sintasa inducible del óxido nítrico
kDa	Kilodaltones
LC	Leishmaniasis cutánea
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LPS	Lipopolisacárido
LV	Leishmaniasis visceral
Mϕ	Macrófago
ml	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NO	Óxido nítrico
PBS	Buffer de fosfatos salino
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato

Pm	Promastigotes
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
xg	Veces la fuerza de gravedad
μg	Microgramo
μl	Microlitro

Resumen

Leishmania es un parásito intracelular obligado causante de un amplio espectro de enfermedades humanas, presentando tres principales cuadros clínicos: la leishmaniasis cutánea, que se divide en leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y en leishmaniasis cutánea difusa (LCD), la leishmaniasis mucocutánea (LMC) y la leishmaniasis visceral (LV). El cuadro clínico que se desarrolle dependerá del estado inmunitario del huésped y de la especie de *Leishmania*, sin embargo, una especie es capaz de provocar distintos cuadros clínicos. Tal es el caso de *L. mexicana* que es el agente causal de LCL y la LCD. En su ciclo de vida, *Leishmania* presenta dos estados morfológicos: el promastigote, que habita en el tracto digestivo de los vectores y el amastigote, que habita en el huésped definitivo. Las principales células que hospedan a los amastigotes de *Leishmania* son los macrófagos (MØ) que presentan una gran variedad de mecanismos para eliminar infecciones intracelulares. En los macrófagos, la producción de óxido nítrico (NO) catalizada por la óxido sintasa inducible (iNOS) se ha considerado como el principal mecanismo leishmanicida por el que esta célula combate la infección causada por este parásito. Como se mencionó anteriormente, *L. mexicana* es causante de dos cuadros clínicos distintos, lo cual puede indicar que el desarrollo de la enfermedad hacia LCL o LCD, depende en gran medida de las características diferenciales que se presentan entre las cepas de la especie. En este trabajo se compararon dos cepas de *L. mexicana*, una aislada de un paciente con LCL y otra aislada de un paciente con LCD, en la expresión y actividad de la iNOS en macrófagos de la línea celular THP-1, diferenciados de monocitos de sangre periférica humana y diferenciados de médula ósea de ratón, estimulados con LPS e IFN- γ . Se detectó en macrófagos infectados y estimulados de la línea celular THP-1 y diferenciados de monocitos de sangre periférica humana, la presencia de la iNOS por Western-blot, en un peso menor probablemente debido a una degradación, mientras que en los macrófagos murinos infectados y estimulados se observó una diferenciación en la regulación de la iNOS, en donde la cepa de LCL (Lac) muestra una mayor efectividad para inhibir a la iNOS, en diferencia con la cepa de LCD (DIAC) que es más virulenta. Estas diferencias podrían ser de gran relevancia en la patogenicidad de las cepas y el desarrollo del cuadro clínico en el huésped mamífero.

I. Introducción

I.1. Leishmaniasis

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias causada por varias especies de un protista intracelular del género *Leishmania* (Akhoundi *et al*, 2016) que es transmitido por un díptero flebótomo de la especie *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. Esta enfermedad presenta un amplio espectro de formas clínicas que se han adjudicado tanto al parásito como a la respuesta inmune del hospedero, pero otros factores, como diferencias intraespecíficas podrían también estar involucradas. Las formas clínicas que presenta la leishmaniasis son: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV) (Mc Mahon-Pratt y Alexander, 2004).

I.1.1. Leishmaniasis cutánea

La leishmaniasis cutánea es la forma más frecuente del padecimiento y se manifiesta en formas clínicas con características inmunológicas y pronósticas del todo opuestas:

- La leishmaniasis cutánea localizada (LCL) que se distingue por la presencia de úlceras únicas o múltiples (fig. 1), con forma redondeada, de bordes indurados, fondo limpio e indoloro que aparecen de 15 a 20 días después de la picadura. En algunas ocasiones los pacientes con LCL curan en un lapso de seis meses a dos años, no así cuando la lesión es en la oreja, ya que en esta parte del cuerpo es crónica y mutilante (Lupi *et al*, 2009).



Figura 1. Lesión típica de LCL, se caracteriza por una úlcera redonda con un borde y ocurre en las áreas expuestas de la piel (Ríos *et al*, 2010).

- La leishmaniasis cutánea difusa (LCD) que se distingue por una respuesta inmune ineficaz que permite la diseminación del parásito y el desarrollo de lesiones nodulares a lo largo de todo el tegumento con excepción del cuero cabelludo (fig. 2). En esta forma clínica el parásito se disemina principalmente a través de la vía linfática (Machado, 2006).



Figura 2. Lesiones características de la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Se observan nódulos con distribución difusa (Giavedoni *et al*, 2014).

I.1.2. Leishmaniasis mucocutánea

La leishmaniasis mucocutánea (LMC) se caracteriza por la invasión y destrucción de la mucosa nasofaríngea que provoca desfiguración en el paciente. Se desarrolla después de la desaparición de las lesiones cutáneas y en ocasiones se presenta hasta después de varios años. En las lesiones hay pocos parásitos y el daño se debe a la reacción inflamatoria en la mucosa de la nariz, boca y faringe, lo que conduce a la destrucción del tabique nasal (fig. 3). Una de las especies principales causantes de LMC es *L. braziliensis* (Choi *et al*, 2001).



Figura 3. Lesiones en la mucosa características de la LMC (Choi *et al*, 2001).

I.1.3. Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral (LV) cursa con hepatoesplenomegalia, fiebre intermitente, pérdida de peso, anemia y caquexia. Los parásitos se localizan masivamente en macrófagos hepáticos (células de Kúpffer), esplénicos y de la médula ósea. La fiebre es consecuencia de la liberación de TNF- α por los macrófagos infectados que actúa sobre el centro termorregulador del hipotálamo. De manera adicional, el TNF- α induce caquexia y el desgaste del tejido graso y muscular en estos pacientes.

En la India se conoce como kala-azar o enfermedad negra en virtud de la hiperpigmentación observada en pacientes de esta región. La LV es la forma más severa de la leishmaniasis con el mayor índice de mortalidad. Recientemente, en la región del Mediterráneo la LV ha surgido como un problema de salud pública, sobre todo en individuos inmunodeprimidos como los pacientes con VIH. En esta región los perros forman parte importante del reservorio natural. Después de la recuperación de la leishmaniasis visceral, es posible observar la leishmaniasis cutánea posterior a kala-azar, que cursa con lesiones cutáneas que contienen abundantes macrófagos infectados, que pueden curar con terapia muy prolongada (Lupi *et al*, 2009; Machado, 2006).

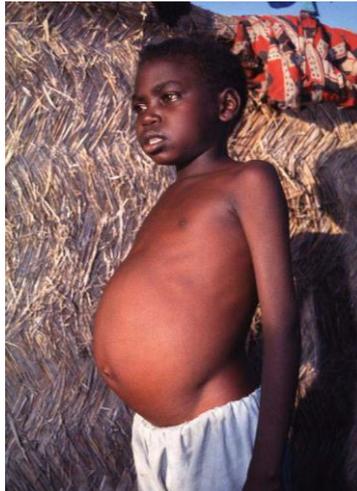


Figura 4. Leishmaniasis visceral (LV)

I.1.4 Distribución geográfica

La leishmaniasis es endémica de zonas tropicales y subtropicales, incluyendo América del Norte, Centro y Sudamérica, así como la Cuenca mediterránea, el sudeste de Europa, Oriente Medio, Asia Central y Sudoriental y África. Además informes recientes demuestran su presencia en Australia (Akhoundi *et al*, 2016). Se presenta en 88 países de diversos contextos geográficos y se estima que afecta 12 millones de personas en todo el mundo, con un aproximado de 2 millones de infecciones nuevas por año (Mc Mahon-Pratt y Alexander, 2004).

I.2. El parásito *Leishmania*

I.2.1 Taxonomía

La clasificación propuesta por Adl *et al.* (2005) estableció una síntesis de la clasificación de eucariotas, basado en la información disponible en ese momento, y la generada por estudios filogenéticos moleculares durante las dos décadas anteriores.

Un avance notable desde 2005 es la consolidación de una clasificación basada en la relación filogenética. Los súper grupos formalizados por Adl *et al.* (2005) se conservan en su mayoría, aunque algunos se han reunido en agrupaciones de orden aún mayor (tabla 1), divide a los organismos eucariotas en 5 súper grupos: Amoebozoa, Opisthokonta, Archaeplastida, Sar y Excavata.

Dominio	Eukarya
Súper grupo	Excavata
	Discoba (Simpson in Hampl <i>et al.</i> 2009)
	Discicristata (Cavalier-Smith 1998)
	Euglenozoa (Cavalier-Smith 1981, emend. Simpson 1997)
Clase	Kinetoplastea (Honigberg 1963)
	Metakinetoplastina (Vickerman in Moreira <i>et al.</i> 2004)
Orden	Trypanosomatida (Kent 1880, emend. Vickerman in Moreira <i>et al.</i> 2004)
Género	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903)
Especie	<i>Leishmania mexicana</i> (Biagi, 1953)

Tabla 1. Sistema taxonómico del género *Leishmania* con la clasificación de Adl *et al.* (2012).

La identificación de los parásitos al nivel del género se ha basado hasta ahora en la taxonomía mundial obtenida en la década de los noventa con la técnica isoenzimática, mediante comparación con las cepas de referencia (Pratlong *et al.*, 2009).

Para la realización de la clasificación del parásito *Leishmania* se considera el tipo de reproducción en el tracto digestivo del vector; siendo el intestino medio en el caso de *Leishmania* (WHO, 2010).

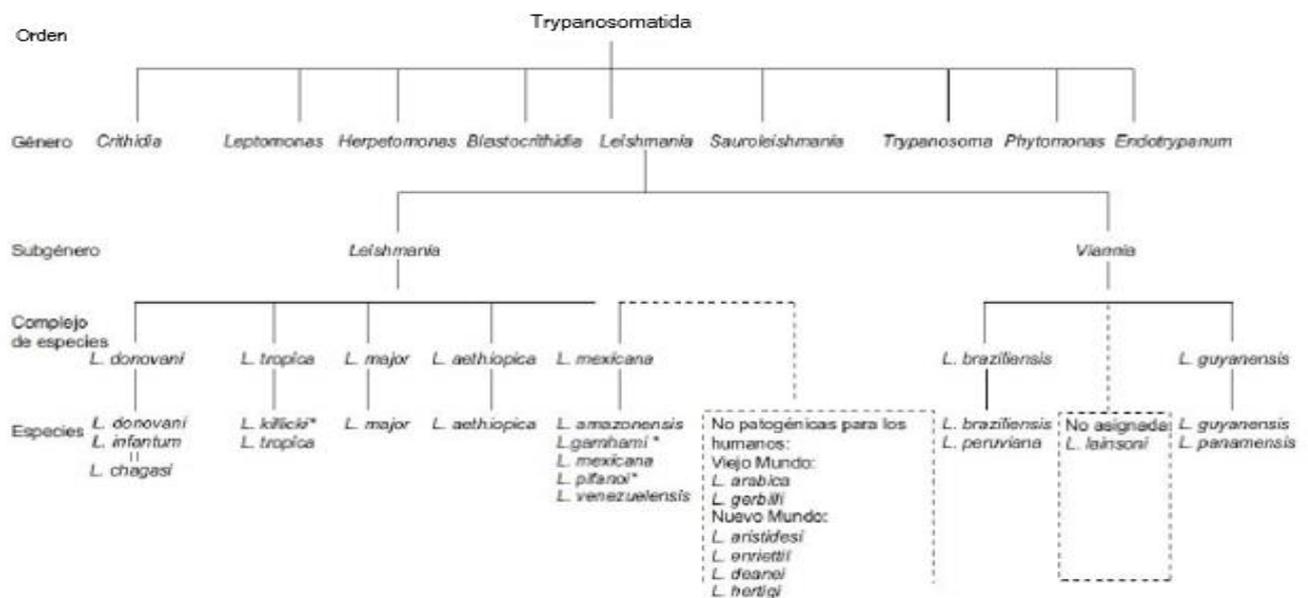


Figura 5. División de géneros de la familia y subgéneros de *Leishmania* con sus correspondientes especies (WHO, 2010).

El orden Trypanosomatida está constituido por un gran grupo de protistas flagelados parásitos. Se caracterizan por poseer un organelo denominado kinetoplasto, el cual consiste en una densa masa de DNA extranuclear contenida dentro de la mitocondria y que está asociado al cuerpo basal (Deschamps *et al*, 2011). El género *Leishmania* está constituido por diversas especies, las cuales son morfológicamente indistinguibles y se encuentran agrupadas en tres subgéneros: *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania* (fig. 5). Esta clasificación se fundó originalmente en el desarrollo del protista en el tubo digestivo del mosquito transmisor y posteriormente se fue conformando con base en estudios de biología molecular (Lainson *et al*, 1977; Bates, 2007). Las especies que producen infección en el humano y otros mamíferos se encuentran en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, el subgénero *Sauroleishmania* sólo se ha demostrado que infecta a ciertos reptiles (tabla 2).

Tabla 2. Principales especies de *Leishmania* y su distribución geográfica

Especies	Forma clínica	Distribución geográfica	Vector
<i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>major</i>	Leishmaniasis cutánea	Norte de África, Sáhel de África, este y centro de Asia	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>P. duboscqi</i> , <i>P. salehi</i>
<i>L. (L.) tropica</i>	Leishmaniasis cutánea	Este y centro de Asia	<i>Phlebotomus sergenti</i>
<i>L. (L.) aethiopica</i>	Leishmaniasis cutánea difusa	Etiopía y Kenia	<i>Phlebotomus longipes</i> , <i>P. pedifer</i>
<i>L.(L.) donovani</i>	Leishmaniasis visceral (kala azar)	India y Este de África	<i>Phlebotomus argentipes</i> , <i>P. orientalis</i> , <i>P. martin</i>
<i>L (L.) infantum</i>	Leishmaniasis visceral infantil	Mediterráneo, este y centro de Asia, América central y sur	<i>Phlebotomus ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i>
<i>L. (L.) mexicana</i>	Leishmaniasis cutánea	América central América del norte	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>
<i>L (L.) chagasi</i>	Leishmaniasis cutánea Leishmaniasis visceral	América del sur América del norte	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Leishmaniasis cutánea	América del sur	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>
<i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>braziliensis</i>	Leishmaniasis mucocutánea	América central y América del sur	<i>Lutzomyia wellcomei</i> , <i>Lu. complexus</i> , <i>Lu. Carrerai</i>

<i>L. (V.) peruviana</i>	Leishmaniasis cutánea	Perú	<i>Lutzomyia peruensis, Lu. verrucarum</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Leishmaniasis cutánea	América del sur	<i>Lutzomyia umbratilis</i>
<i>L. (V.) panamensis</i>	Leishmaniasis cutánea	América central	<i>Lutzomyia trapidoi</i>

*Tomado de Bates, 2006.

I.2.2. Estados morfológicos

Las especies de *Leishmania* durante su desarrollo atraviesan por diferentes etapas. En el insecto vector se localiza la forma de promastigote (del griego *mastigos*, látigo). Este estado morfológico se caracteriza por presentar un flagelo, el cuerpo mide aproximadamente 10 μm y tiene un kinetoplasto próximo al núcleo. Los promastigotes se encuentran anclados a las microvellosidades del tubo digestivo del flebótomo (Killick–Kendrick *et al*, 1974). Al diferenciarse, el cuerpo se hace más ancho y el flagelo se acorta para facilitar la adhesión a las células epiteliales revisten el tubo digestivo, el kinetoplasto está en posición anterior y carece de capacidad infectiva (Pimenta *et al*, 1992). Aproximadamente diez días después del ingreso de los promastigotes al vector se transforman en promastigotes metacíclicos que pierden la adherencia al cambiar la configuración del lipofosfoglicano, el flagelo se hace muy largo en comparación con el cuerpo delgado y corto (figura 6), presentan una bolsa flagelar grande con vesículas exocíticas y material de secreción, dejan de reproducirse por división binaria y están listos para ser inoculados (Sacks y Perkins, 1984). Una vez que los promastigotes metacíclicos son inoculados al hospedero vertebrado, el kinetoplasto se ubica paralelo al núcleo, la bolsa flagelar se hace muy profunda, el cuerpo adquiere una forma más ovalada y el flagelo empieza a reducir su tamaño (Killick–Kendrick, 1979). Antes de las primeras 24 horas después de haber entrado en los macrófagos, los promastigotes se transforman en amastigotes que son el estadio intracelular del parásito, de forma redondeada, con un diámetro de 2-4 μm con un núcleo y un cinetoplasto. En ocasiones entre el kinetoplasto y la pared celular se observa un rudimento de flagelo llamado rizoplasto. Los amastigotes se encuentran en las vacuolas parasitóforas que varían de tamaño dependiendo de la especie de *Leishmania*.

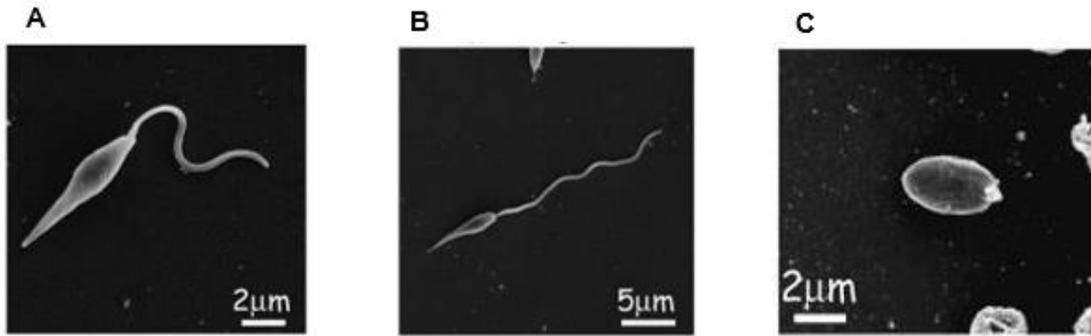


Figura 6. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de las etapas del ciclo de vida *Leishmania*. En A promastigote procíclico. En B promastigote metacíclico. En C amastigote (Besteiro *et al*, 2007).

I.2.3. Morfología y fisiología

Los promastigotes y los amastigotes poseen una membrana citoplásmica en cuya superficie se encuentra el glucocálix o cubierta de gluconjugados que actúa como interfase entre el parásito y el medio externo en el que se encuentre el tubo digestivo del flebótomo o la vacuola parasitófora del macrófago y que es clave para la supervivencia del parásito. La membrana es una bicapa lipídica convencional y en ella se han identificado una serie de moléculas relacionadas con la capacidad invasiva del parásito. Las más abundantes son la glicoproteína de 63 kDa (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG), que se unen a la membrana del parásito mediante anclajes de glicosil–fosfatidil–inositol (GPI) que son reconocidos también por diferentes receptores de las células hospederas, lo que favorece la fagocitosis de *Leishmania*. Debajo de la membrana se localizan en espiral los microtúbulos subpeliculares que confieren una morfología relativamente estable y cierto movimiento contráctil. En los promastigotes, la membrana celular se invagina y forma una bolsa llamada bolsa flagelar de la que nace el flagelo. Éste tiene una longitud de aproximadamente 20 μm , se incrusta en la matriz celular en el corpúsculo basal que es un conjunto de microtúbulos y establece contacto con la membrana de la bolsa flagelar mediante hemidesmosomas. En los amastigotes y en los promastigotes metacíclicos se presenta un organelo lisosomal voluminoso llamado megasoma, que contiene proteasas de cisteína asociadas con la capacidad invasiva. En la proximidad del

corpúsculo basal se encuentra el cinetoplasto, estructura rica en DNA que pertenece a la única y gran mitocondria celular existente (Simpson, 1973).

Las especies de *Leishmania* son heterótrofas. La glucosa es utilizada como fuente energética, aunque el metabolismo de los carbohidratos es incompleto hasta ácidos orgánicos y CO₂ mediante fermentación aerobia por glucólisis y por la ruta de las pentosas fosfato (Berens *et al*, 1980). La glucólisis se encuentra compartamentalizada en organelos llamados glucosomas que ocupan el 4% del volumen del parásito. El aporte energético más importante es a partir de los carbonos de los aminoácidos (Zilberstein *et al*, 1986). Entre los metabolitos más importantes derivados de los aminoácidos se encuentran las putrescinas y espermidinas. En relación al metabolismo de los ácidos nucleicos, estos parásitos pueden sintetizar *de novo* pirimidinas, pero no así purinas (Marr *et al*, 1978).

El parásito se reproduce por bipartición longitudinal de los promastigotes, con excepción de las formas metacíclicas que no se dividen. Los amastigotes pueden reproducirse asexualmente por bipartición o por división múltiple (Tait, 1983).

I.2.4. Ciclo de vida

El parásito *Leishmania* fue descrito en 1903 por Leishman, Donovan y Wright a partir de biopsias viscerales y cutáneas de enfermos de la India (Adler, 1947). *Leishmania* es un parásito digénico y dimórfico porque realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del vector invertebrado en la forma de promastigote (Pulvertaft y Hoyle, 1960) y en el vertebrado dentro de diferentes células, principalmente macrófagos y células dendríticas. Cuando un flebótomo parasitado pica a un vertebrado, inocula los promastigotes presentes en la probóscide. Una vez en el hospedero, son rápidamente fagocitados por los macrófagos en los que se transforman en amastigotes. Los amastigotes se dividen en el interior de los macrófagos hasta lizarlos e infectan más macrófagos y a otras células como las células dendríticas. Cuando un flebótomo pica a un hospedero infectado, durante la ingesta de sangre adquiere también macrófagos infectados con amastigotes y éstos se liberan en el intestino donde se transforman en promastigotes que después de la metaciclogénesis adquieren capacidad infectiva. Se ubican en la proximidad de la probóscide quedando así dispuestos para ser inoculados a otro, lo que se cierra el ciclo (Fig. 7).

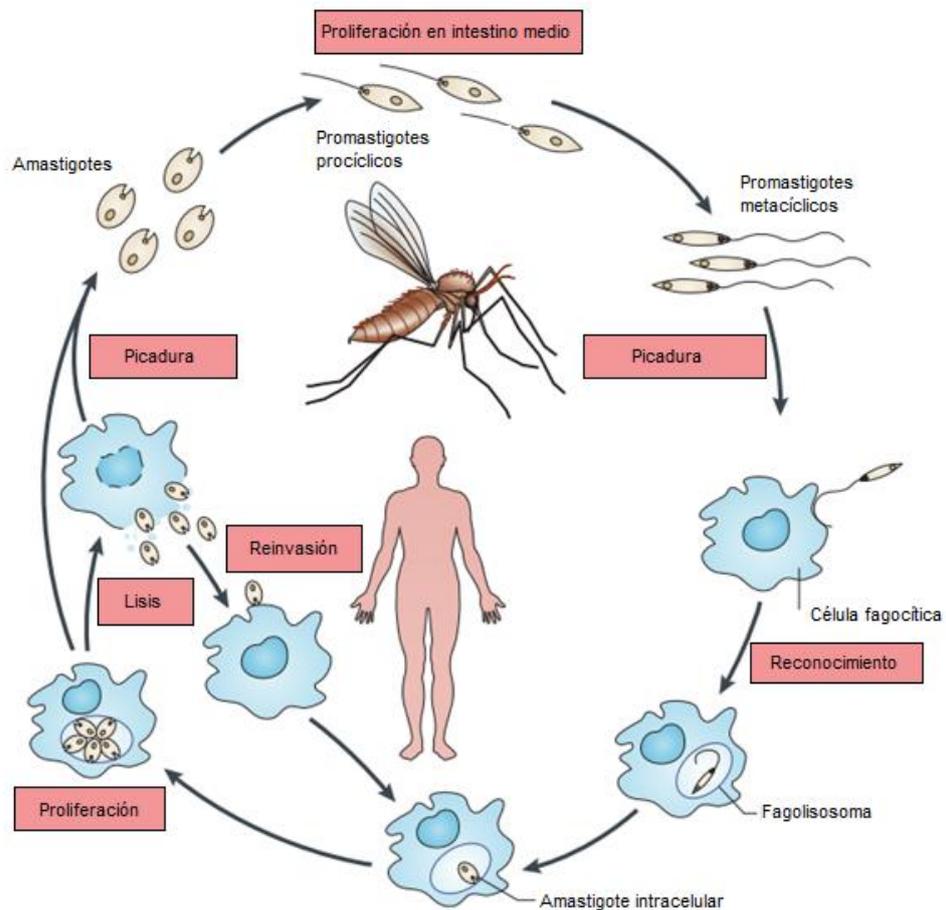


Figura 7. Ciclo de vida de *Leishmania* (Kaye y Scott, 2011)

I.3. Macrófagos

Como ya se mencionó, los macrófagos son una de las principales células hospederas de *Leishmania*. Son células fagocíticas mononucleares de linaje mieloide y con gran capacidad de procesamiento de antígenos tanto solubles como particulados. Los macrófagos inmaduros de sangre periférica se denominan monocitos y los macrófagos diferenciados se localizan en los tejidos y se encargan de eliminar diferentes organismos patogénicos y restos celulares *in situ* (Bañuls *et al*, 2007). Estos macrófagos diferenciados son residentes esenciales de los tejidos linfoides, pero también se encuentran en otras localizaciones, en suspensión o integrados en tejidos sólidos; allí reciben distintos nombres y, aunque mantienen sus propiedades principales, adquieren características

específicas al diferenciarse en varios tejidos. Los macrófagos en suspensión son células muy activas en la eliminación de partículas extrañas y restos celulares, entre ellos se encuentran principalmente los peritoneales y los alveolares. Los macrófagos de tejido sólido son más especializados, por ejemplo las células de Küpffer del hígado son responsables de la eliminación de productos fagocitados y bacterias de la circulación sanguínea. Entre este grupo se encuentran las células de la microglía del sistema nervioso central, los osteoclastos del tejido óseo o las células mesangiales del glomérulo renal, entre otros (Munder *et al*, 2009).

Los macrófagos activados en el lugar de infección inician un proceso de fagocitosis muy activo mediante receptores específicos, receptores tipo toll (TLR) y receptores scavenger, capaces de reconocer patrones moleculares (PAMPs) expresados en los patógenos. Los macrófagos también pueden fagocitar antígenos opsonizados con moléculas del complemento o anticuerpos, vía receptores del complemento o receptores Fc (CD64, CD32, CD16). Los monocitos y los macrófagos no activados expresan niveles bajos de MHC-II, en cambio los macrófagos activados secretan quimiocinas que reclutan células inflamatorias y citocinas implicadas en la activación de las células T como IL-12 dirigiendo la respuesta adaptativa en las fases iniciales.

En la médula ósea, las células hematopoyéticas crecen y maduran en una red de células del estroma, que son células no hematopoyéticas que apoyan el crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas, que incluyen a los macrófagos. Las células del estroma influyen en la diferenciación de las células madre hematopoyéticas al proporcionar un microambiente inductor hematopoyético (MIH), que consiste en una matriz celular y factores que promueven el crecimiento y la diferenciación. Muchos de estos factores de crecimiento hematopoyéticos son agentes solubles que llegan a las células blanco por difusión; otros son moléculas del estroma que requieren contacto con las células que responden y las células del estroma. Durante una infección se estimula la hematopoyesis por la producción de factores de crecimiento hematopoyéticos por parte de los macrófagos.

Un mecanismo innato de defensa importante es la ingestión de material particulado extracelular por fagocitosis, proceso en el cual la membrana plasmática de la célula se expande alrededor del material particulado y hay un rearrreglo del citoesqueleto de actina. Durante este proceso, los macrófagos

pueden incluir a microorganismos patógenos completos dentro de grandes vesículas llamadas fagosomas.

I.3.1. Activación clásica y alternativa de los macrófagos

Leishmania sp. ha desarrollado múltiples estrategias para evadir la respuesta inmune del hospedero y asegurar su persistencia dentro del macrófago. Uno de estos mecanismos tiene como blanco el metabolismo de la L-arginina (Wanaseen y Soong, 2008). El macrófago puede eliminar al amastigote o permitir su sobrevivencia dependiendo del balance de dos enzimas inducibles, la óxido nítrico sintasa 2 (iNOS) y la arginasa I (ARG-I), las cuales comparten un mismo sustrato: la L-arginina (Munder *et al.*, 2009). La expresión y función de ambas enzimas son reguladas recíprocamente por la acción de citocinas tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α) y Th2 (IL-4, IL-10, IL-13, IL-21) que determinan el estado de activación del macrófago (Mosser y Edwards, 2008; Gordon y Martínez, 2010). Las citocinas tipo Th1 activan al macrófago de forma clásica (CAM ϕ) e inducen la expresión y función de la iNOS, la cual oxida a la L-arginina en L-citrulina y óxido nítrico (NO), siendo este último el metabolito con mayor capacidad leishmanicida con el que cuenta esta célula para la eliminación del parásito. La activación clásica es dirigida por estímulos tales como el TNF- α , IFN- γ y LPS que inducen las actividades microbicidas de los macrófagos mediante la producción de NO y ROS y la producción de citocinas proinflamatorias como por ejemplo IL-1, IL-6 y TNF- α que inducen muchos de los cambios locales y generales que se observan durante la reacción inflamatoria. Las tres citocinas actúan a nivel local y promueven la coagulación y un incremento de la permeabilidad vascular. Tanto el TNF- α como la IL-1 inducen un aumento en la expresión de la selectina E, una molécula de adhesión sobre las células endoteliales. La activación clásica es dirigida por estímulos tales como el TNF- α , IFN- γ y LPS que inducen las actividades microbicidas de los macrófagos mediante la producción de NO y ROS y la producción de citocinas proinflamatorias como por ejemplo IL-1, IL-6 y TNF- α que inducen muchos de los cambios locales y generales que se observan durante la reacción inflamatoria. Las tres citocinas actúan a nivel local y promueven la coagulación y un incremento de la permeabilidad vascular. Tanto el TNF- α como la IL-1 inducen un aumento en la expresión de la selectina E, una molécula de

adhesión sobre las células endoteliales. Las citocinas tipo Th2 activan a los macrófagos de forma alternativa (AAM ϕ) e inducen la expresión y función de la ARG-1, la cual hidroliza a la L-arginina en urea y L-ornitina (Moll *et al*, 2002). Esta última es la principal fuente intracelular para la síntesis de poliaminas, que son pequeñas moléculas catiónicas requeridas para la proliferación celular y procesos homeostáticos del macrófago, además de ser vitales para el crecimiento intracelular de *Leishmania sp.* (Rogers *et al*, 2009; Modolell *et al*, 2009; Wanasen *et al*, 2009). De esta forma, la L-arginina se encuentra situada como una frontera entre la eliminación y sobrevivencia de *Leishmania* en la célula hospedera y su metabolismo es un factor determinante para la evolución de la enfermedad.

I.4. Mecanismos leishmanicidas

Las principales células efectoras en contra de *Leishmania spp.* son los macrófagos, pero las células dendríticas presentan también mecanismos que les permiten combatir al parásito, aunque con menor eficacia (Wilkins-Rodríguez *et al*, 2010). Entre las células dendríticas, las células de Langerhans (LC) no son eficientes en la eliminación de *Leishmania spp.* debido a la incapacidad de producir NO. Se considera que estas células favorecen la persistencia del parásito y posibilitan una infección latente que reaparece con la inmunosupresión del huésped. Esta parasitosis es una infección oportunista en pacientes con SIDA. Sin embargo, las LC desempeñan también un papel central en la protección debido a que son células presentadoras de antígenos (APC) muy potentes y activadoras de la respuesta inmune adaptativa mediante la producción de IL-12 (Moll *et al*, 2002).

En la leishmaniasis el macrófago desempeña una triple función: célula huésped, presentadora de antígenos y célula efectora, con capacidad de eliminar el parásito principalmente mediante la producción de NO. Como ya se mencionó, los macrófagos pueden reconocer organismos patogénicos a través de diferentes receptores y fagocitarlos. Al fagocitarlos, los parásitos quedan englobados en vacuolas parasitóforas. La fagocitosis induce el estallido oxidativo gracias a la activación de la NADPH oxidasa en la membrana plasmática, la cual da lugar a la generación de las especies reactivas de oxígeno tales como el peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radicales hidroxilo que reaccionan con los

fosfolípidos de la membrana del parásito. Existen también mecanismos independientes del oxígeno tales como la acidificación del fagolisosoma que desnaturaliza proteínas y las hace susceptibles a las hidrolasas ácidas. Sin embargo, estos mecanismos requieren una magnificación para poder eliminar con eficacia a *Leishmania*, ya que el parásito desarrolla potentes mecanismos para sobrevivir y reproducirse dentro del fagolisosoma. Esto se logra con la activación de los macrófagos con IFN- γ y TNF- α secretadas por las células NK durante la respuesta inmune innata. Además, las secretan los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en la respuesta inmune adaptativa. De la eficacia de la respuesta inmune y la virulencia del parásito depende la progresión de la enfermedad.

Se considera que el mecanismo leishmanicida más importante es el NO. Los macrófagos murinos producen NO tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. En modelos animales se ha demostrado que *Leishmania* es capaz de inhibir la síntesis de NO gracias a los glucolípidos altamente conservados presentes en la superficie, así como por la producción y modulación de citocinas (Panaro *et al*, 1999). En comparación con los macrófagos murinos, los macrófagos humanos de diferente origen son menos eficientes en la producción de NO, incluso cuando son tratados con los mismos inductores utilizados en los macrófagos murinos (Murray y Teitelbaum 1992; Schneemann *et al*, 1993; Weinberg *et al*, 1995). Sin embargo, se ha reportado que la producción de NO y la expresión de la iNOS *in vivo* juegan un papel importante en la muerte del parásito durante la infección de macrófagos humanos (Mossalayi *et al*, 1999). Es importante resaltar que el mecanismo y las condiciones que favorecen la síntesis y acción de la iNOS en macrófagos humanos aún no están bien definidas (Azenabor *et al*, 2009).

I.4.1. Óxido Nítrico

Como se mencionó anteriormente, el NO es el principal mecanismo leishmanicida y se ha demostrado que existe una correlación entre su síntesis y la muerte del parásito en condiciones tanto *in vitro* como *in vivo* (Bogdan, 2001). El NO es una molécula inestable derivada de la reacción de la base nitrogenada guanidina de la L-arginina, por lo que su producción es dependiente de la L-arginina, y es catalizada por la enzima sintasa del óxido nítrico (NOS) (Panaro *et al*, 1999). Esta enzima presenta tres isoformas: la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS), que son expresadas constitutivamente, y la inducible (iNOS) que se induce por la

inflamación y la activación de citocinas, entre otros (Juliet *et al*, 2003). Estas enzimas producen L-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 L-citrulina y NO (Iniasta *et al*, 2001; Surace y Li, 2013; Wilkins-Rodríguez *et al*, 2010).

I.5. Sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS)

La generación del óxido nítrico en macrófagos está mediada por la isoforma inducible de las sintasas del óxido nítrico (iNOS o NOS2) y es reconocida como una respuesta protectora del sistema inmune (Azenabor *et al*, 2009). Esta isoforma se expresa en una gran variedad de tipos celulares, que incluyen a las células dendríticas, neutrófilos, fibroblastos y macrófagos, en respuesta a diferentes estímulos tales como citocinas (IL- β , TNF- α e IFN- γ) y lipopolisacárido (LPS) (Juliet *et al*, 2003). La inducción con estas moléculas se debe a que la región promotora del gen de la iNOS presenta dos regiones. La región I tiene un sitio de unión κ B al que se une el factor de transcripción NF- κ B (Lowenstein *et al* 1993). Este factor de transcripción se activa posteriormente al acoplamiento de receptores tales como los TLR con sus ligandos respectivos. Uno de estos es el LPS que es reconocido por el receptor TLR-4. La región II presenta el IRE que es el elemento de respuesta a IFN- γ que es un sitio de unión para el factor regulador del IFN (IRF-1). El IRF-1 se activa principalmente por IFN- γ , pero otras citocinas tales como IL-1, IL-6 y TNF- α inducen también la expresión de IRF-1 (Fig. 8).

La iNOS comparte al sustrato L-arginina con otra enzima que es la arginasa (ARG-1). Ambas tienen una cinética y afinidad semejante por el sustrato (Bhatt *et al*, 2014), por lo que la actividad de ambas enzimas resulta en una autorregulación competitiva (Iniasta *et al*, 2001; Bhatt *et al*, 2014; Iyamu *et al*, 2008).

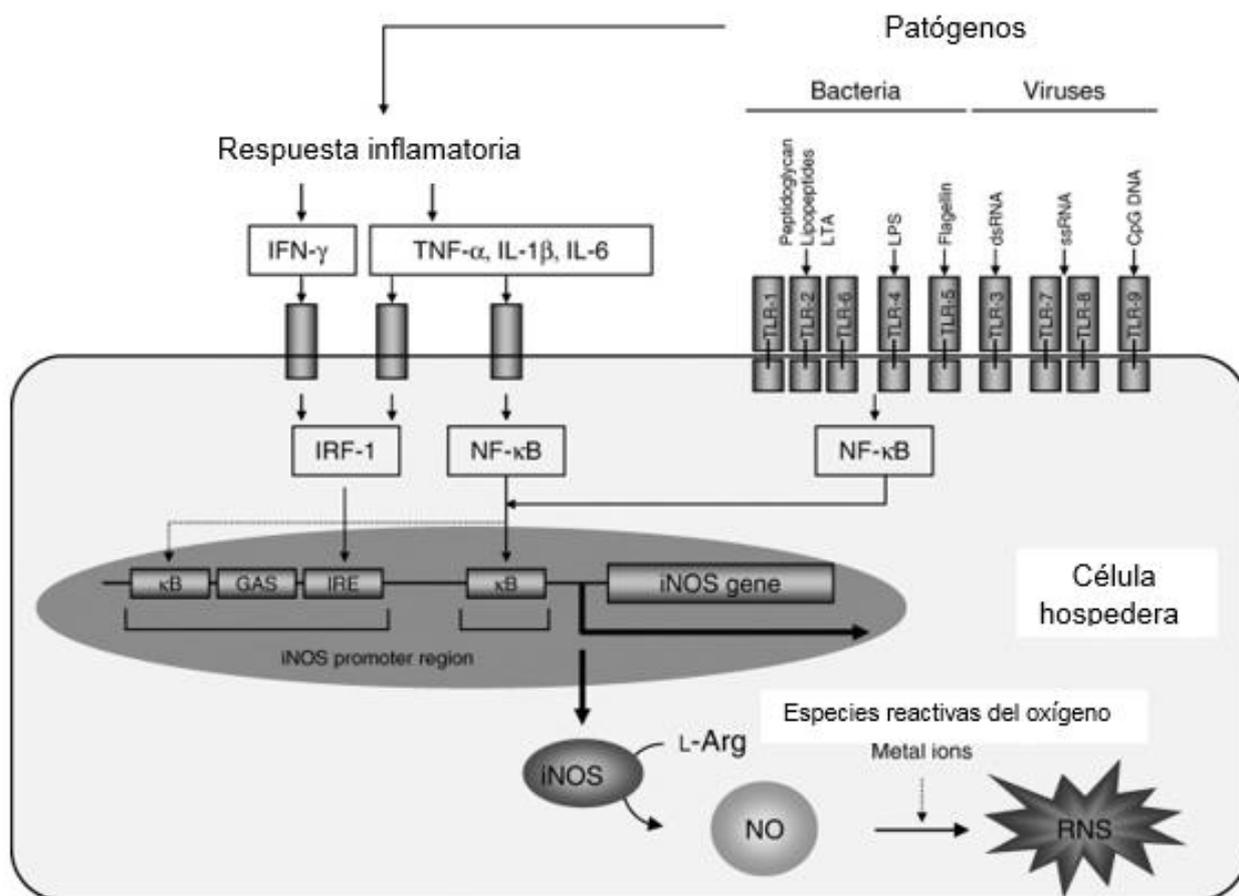


Figura 8. Diversas vías de inducción de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS). La región promotora del gen de la iNOS tiene dos sitios de unión: κB para el factor nuclear (NF-κB) e IRE (elemento de respuesta estimulado por IFN-γ) para el factor regulador del IFN (IRF)-1. El IRF-1 se activa principalmente por IFN-γ, pero otras citocinas tales como IL-1, IL-6 y TNF-α inducen también la expresión de IRF-1. El NF-κB se activa por TNF-α y componentes microbianos mediante vías dependientes o independientes de receptores tipo toll (TLR). LPS, lipopolisacárido; NF-κB, factor nuclear-κB; RNS, especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno (tomada de Zaki et al, 2007).

I.6. Diferencias intraespecíficas en las especies de *Leishmania*: presencia de cepas

La leishmaniasis es una enfermedad que presenta diferentes formas clínicas que van desde lesiones cutáneas de fácil tratamiento hasta formas viscerales que pueden ser fatales. La presencia de este amplio espectro de formas clínicas en la leishmaniasis se ha adjudicado a un binomio constituido por la respuesta inmune del hospedero y la especie del parásito infectante. De manera interesante, existen especies de *Leishmania* como por ejemplo *L. mexicana* o *L. amazonensis* que pueden producir formas clínicas diferentes. *Leishmania mexicana* es la principal especie causante de leishmaniasis cutánea en México y produce dos formas

clínicas con características muy diferentes como son la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Debido a esto es probable que existan diferencias intraespecíficas que participen en el desarrollo de una forma clínica u otra y que den lugar a la presencia de aislados o cepas dentro de una misma especie. Las cepas han sido definidas 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. Por otro lado, el término clona se utiliza para denotar la progenie de un individuo que se reproduce asexualmente (Dijkshoorn *et al.*, 2000). Existen diversos reportes sobre la influencia de cepas de *Leishmania spp.* en el desarrollo de las diferentes formas clínicas (Markikou-Ouni *et al.*, 2012; Ritter *et al.*, 2004). Este fenómeno se ha reportado en especies como por ejemplo *Leishmania infantum*. Esta especie provoca LV en diferentes regiones del Viejo Mundo y se ha demostrado que diferentes cepas aisladas de distintos vectores pueden causar LC en lugar de LV (Baptista-Fernandes *et al.*, 2007). En el caso de *Leishmania major* se demostró que diferentes cepas endémicas de Irán mostraron distintos grados de virulencia e infectividad en ratones Balb/c (Alimohammadian *et al.*, 2010). En otro estudio realizado también con diferentes cepas de *L. major* con las que se infectaron ratones C57BL/6 silvestres y deficientes en TNF- α se observó que una de las cepas (BNI) causó una infección más severa en los ratones deficientes en TNF- α en comparación con la infección causada por la cepa Friedlin. En este estudio se infectaron macrófagos con ambas cepas y la cepa Friedlin fue eliminada más eficientemente en comparación con la cepa BNI (Ritter *et al.*, 2004). De la misma manera, con *L. braziliensis* se analizó la infectividad de tres diferentes aislados en células mononucleares y en ratones y se demostró que hubo diferencias en el grado de infectividad de las células y tamaño del cojinete plantar entre los diferentes aislados (Pereira *et al.*, 2009). Se ha demostrado también que especies de *Leishmania* que comúnmente producen una forma clínica, por ejemplo, *L. major* LC y *L. donovani* LV, pueden causar formas clínicas diferentes (Alimohammadian *et al.*, 2010).

II. Justificación

La leishmaniasis es una enfermedad que abarca formas clínicas diversas, que se extienden desde un polo benigno como lo es la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) hasta un polo que incluye formas muy severas como lo son la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) o la visceral que pueden conducir a la muerte. Se ha determinado que en esta gran diversidad de formas clínicas en la leishmaniasis juegan un papel preponderante la respuesta inmune del hospedero y la especie del parásito. Sin embargo, en el caso de varias especies tales como *L. amazonensis*, *L. aethiopic* y *L. mexicana*, la especie causa cuadros clínicos diferentes lo que presupone la participación de más factores en el desarrollo de las formas clínicas. Uno de estos factores sin duda está representado por la existencia de diferencias intraespecíficas. Las especies y cepas de *Leishmania* son un determinante importante en la evolución de la enfermedad por lo que es esencial conocer la identidad de los parásitos presentes en las zonas endémicas. Dichos datos son muy relevantes para la comprensión de la epidemiología, en el control y en el tratamiento. Diversos estudios han demostrado que existe gran variabilidad en el comportamiento entre las diferentes especies y cepas de *Leishmania* (Sanyal *et al*, 1994; Ritter *et al*, 2004; Baptista-Fernandes *et al*, 2007; Pereira *et al*, 2009; Markikou-Ouni *et al*, 2012).

Por otro lado, aunque *Leishmania* tiene la capacidad de infectar distintos tipos celulares, son los macrófagos las principales células hospederas en la que se reproduce y perpetúa la enfermedad. La activación de los macrófagos hacia una forma clásica caracterizada por la expresión de la iNOS y subsecuente producción de NO o una forma alternativa en la que se induce Arg-1, representa una disyuntiva entre el control o la progresión de la enfermedad. Debido a esto, en este trabajo se analizó el efecto de dos cepas de *L. mexicana* de reciente aislamiento de pacientes con LCL y LCD en la presencia proteínica y actividad de la iNOS en diferentes poblaciones de macrófagos.

III. Hipótesis

¿Los amastigotes de *Leishmania mexicana* aislados de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y otro con leishmaniasis cutánea difusa

(LCD) tendrán un efecto diferente sobre la presencia proteínica y la actividad de la iNOS en tres poblaciones de macrófagos?

IV. Objetivo General

Analizar la fagocitosis y función de la iNOS en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana, macrófagos obtenidos a partir de la línea celular THP-1 y macrófagos diferenciados a partir de precursores de médula ósea de ratón, infectados con dos cepas de *Leishmania mexicana*.

IV.1. Objetivos específicos

IV.1.1. Diferenciar y cultivar la línea celular de macrófagos humanos THP-1.

IV.1.2. Diferenciar macrófagos humanos a partir de monocitos de sangre periférica.

IV.1.3. Diferenciar macrófagos murinos a partir de precursores de médula ósea de ratón.

IV.1.4. Demostrar la presencia de la enzima iNOS en las tres poblaciones celulares mediante WB.

IV.1.5. Comparar el efecto en la fagocitosis por macrófagos de los amastigotes de las dos cepas de *Leishmania mexicana*.

IV.1.6. Analizar la actividad de la iNOS en macrófagos infectados con las dos cepas de *L. mexicana*, mediante la producción de NO en las tres poblaciones celulares.

V. Material y Métodos

V.1. Cultivo de macrófagos de la línea celular THP-1

La línea celular THP-1 es una línea celular de monocitos humanos derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda (Yuzuru *et al*, 1987). Para iniciar el cultivo, se descongeló un vial en baño maría (37 °C) durante 2 minutos. A continuación, se le agregaron 10 ml de medio RPMI 1640 estéril y libre de pirógenos (Gibco Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina, 2 mM de L-glutamina, 50 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y 10% de suero fetal

bovino (FBS) (Gibco Life Technologies Corporation) descomplementado por calor (56° C, 30') y se mezcló por inversión. Posteriormente, se centrifugó a 300 xg a una temperatura de 21 °C durante 5 minutos. Después de centrifugar, el sobrenadante que contenía todavía restos de DMSO se eliminó y el botón se resuspendió en 5 ml de RPMI con 10% SFB. La suspensión celular se sembró en una botella de 25 cm³ y se mantuvo en incubación a 37 °C con 5% de CO₂ para su proliferación. Una vez que se encontraron en una confluencia del 80%, las células se contaron utilizando una cámara de Neubauer. Una vez determinado el número de células se sembraron en una placa de 24 pozos a una concentración de 100,000 células/ml para la diferenciación a macrófagos por el estímulo con el forbol miristato acetato (PMA) 10 µM durante siete días.

V.2. Cultivo de macrófagos diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica

a) Aislamiento de monocitos a partir de sangre periférica

Además de la línea celular THP-1, otra de las poblaciones celulares utilizadas en este proyecto fueron macrófagos diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica. Los monocitos se obtuvieron a partir de agregados celulares de donadores sanos (buffy coats), los cuales fueron proporcionados por el Banco de Sangre del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga". Los monocitos se aislaron de la siguiente manera:

Primero se realizó un gradiente de densidad con Ficoll-Histopaque (Sigma, St Louis, MO, EU) para separar las células mononucleares. El gradiente se realizó colocando una capa de Ficoll-Histopaque y posteriormente agregando la sangre diluida con PBS comercial (Caisson, North Logan, UT, USA) en una relación 1:3 (1 volumen de sangre -10ml- con 2 de PBS -20ml-). Se centrifugó a una velocidad de 400 xg, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. La interfase formada (zona del gradiente rica en células mononucleares y plaquetas) se colocó en un tubo nuevo y se aforó con PBS hasta 40 ml, nuevamente se centrifugó a 400 xg, 10 minutos, a 4 °C. El sobrenadante se decantó y el botón se resuspendió en 1 ml de PBS y se agregaron 20 ml de solución lítica para lisar a los eritrocitos (NH₄Cl 0.15 M, KHCO₃ 7.8 mM y EDTA 0.12 mM, pH=7.4) durante 10 minutos en hielo.

Una vez transcurrido este tiempo, se aforó a 40 ml con PBS y se centrifugó nuevamente a 400 xg, 10 minutos, a 4 °C. Posteriormente, se formó un gradiente de células colocando ahora el plasma sanguíneo como una capa para eliminar las plaquetas. Dicho gradiente se centrifugó a 200 xg, 10 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el botón se resuspendió en 1 ml de PBS para contar las células mononucleares en una cámara de Neubauer. Posteriormente, se contaron las células y se marcaron, agregando microperlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-CD14 (MACS CD-14 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) con una relación de 1 µl por cada 1×10^6 de células mononucleares. Enseguida se co-incubaron durante 15 minutos a 4 °C. Después las células se colocaron en una columna LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), la cual se acopló a la unidad de separación magnética Super MACS II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Las células que pasaron inmediatamente de la columna fueron las marcadas por el anti-CD14⁺ (selección positiva). Estas células se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB, 2 mM de L-Glutamina (Gibco Invitrogen), 10 mM de buffer HEPES, 500 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina, 24 mM de NaHCO₃ (R-10) para su diferenciación posterior a macrófagos.

b) Diferenciación de macrófagos a partir de monocitos de sangre periférica humana

Las células se incubaron en placas de 12 pozos de baja adherencia (Costar, Corning, NY, USA), 2 ml por pozo a una concentración de 1×10^6 de células/ml, a 37 °C, con 5% de CO₂ durante siete días. Se llevaron a cabo cambios de medio, un día después de la siembra de las células y al sexto día en los cuales se extrajo el total de medio de cada pozo y se le adicionaron 2 ml de medio fresco.

c) Diferenciación de macrófagos a partir de monocitos de sangre periférica humana por GM-CSF.

Las células se incubaron en cajas de 24 pozos de baja adherencia, 1 ml por pozo con una concentración de 1×10^6 de células/ml, a 37 °C, con 5% de CO₂ durante siete días, realizando cambios de medio cada dos días, en los cuales se extraían 500 µl de medio de cada pozo, y se le adicionaron 500 µl de medio fresco manteniendo la concentración de 1000 U/ml de GM-CSF.

V.3. Diferenciación de macrófagos murinos a partir de médula ósea

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas del bioterio del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" las cuales fueron sacrificadas por dislocación cervical. Se cortaron las extremidades inferiores. Posteriormente, se retiró la piel y el músculo de las extremidades inferiores con la finalidad de obtener el fémur y la tibia de ambas extremidades. Los huesos obtenidos se colocaron en una caja de Petri bacteriológica con 10 ml de PBS comercial. A continuación, se extrajo la médula ósea bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar. Para esto, las epífisis de los huesos se cortaron con un bisturí dejando expuesta la médula. Los huesos se sujetaron con ayuda de pinzas de disección estériles sobre un tubo de 50 ml y con ayuda de una jeringa de 10 ml con una aguja de calibre 23G se inyectó PBS adicionado antibióticos dentro de los huesos para extraer la médula dentro del tubo de 50 ml. La médula obtenida se centrifugó a 300 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente y después de un lavado con PBS comercial, el botón de células se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640. Se tomó una alícuota de la suspensión de células (precursores de médula ósea) y se contaron en una cámara de Neubauer excluyendo las células muertas con Azul Tripán.

Se sembraron 2×10^6 células de los precursores de médula ósea en cajas de Petri bacteriológicas de 100 mm de diámetro en 10 ml de medio R-10 al que se le adicionó 10% del sobrenadante de cultivo de la línea celular L929 (línea celular que secreta el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) murino, donada por el Dr. David M. Mosser (University of Maryland, USA). Las cajas de cultivo se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. Los macrófagos diferenciados se cosecharon al 7° día de cultivo.

V.4. Cultivo de los amastigotes de *Leishmania mexicana*

Las dos cepas de *L. mexicana* utilizadas en este estudio fueron la DIACT, aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa y la Lacandona (Lac), aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada, el cual contrajo la infección en la selva lacandona, razón por la cual se denominó de esta manera a dicha cepa.

Los amastigotes de ambas cepas de *L. mexicana* fueron proporcionados por el Biólogo Arturo Wilkins (Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”), quién siguió el siguiente protocolo para el cultivo de los parásitos: se inocularon 10×10^6 promastigotes de cada aislado en el cojinete plantar de ratones BALB/c y se dejó que las lesiones prosiguieran durante 4 a 6 semanas. Pasado este tiempo, se aislaron los amastigotes de los ratones infectados. Para esto, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extirparon las patas con las lesiones en condiciones asépticas y se maceraron con el émbolo de una jeringa de 10 ml a través de una malla de nylon con un poro de $100 \mu\text{m}$ (BD Falcon, Bedford, MA, USA) con medio de cultivo para amastigotes SDM-20 (medio Schneider’s suplementado con 20% de suero fetal bovino descomplementado por calor a $56 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, $25 \mu\text{g/ml}$ de sulfato de gentamicina y 2 mM de L-glutamina, pH final de 5.4). El tejido se presionó sobre la malla y se colectó en un tubo cónico de 50 ml. El macerado obtenido se pasó tres veces por jeringas de calibres 21G, 23G y 25G para lisar mecánicamente las células infectadas y liberar a los amastigotes. La suspensión se centrifugó a $100 \times g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar los restos celulares. El sobrenadante que contenía los amastigotes se colectó en un tubo nuevo y se centrifugó a $2000 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. La pastilla obtenida se resuspendió y se lavó $3\times$ con 10 ml de medio SDM-20. La pastilla formada en el último lavado se resuspendió en 1 ml de medio y los amastigotes se pasaron 8 veces por jeringas de insulina para eliminar los cúmulos formados y realizar el conteo de los amastigotes en una cámara de Neubauer. Los amastigotes se cultivaron en medio SDM-20, a una concentración de 5×10^5 amastigotes/ml en botellas de cultivo de 25 cm^3 en un volumen final de 10 ml y se incubaron a $32 \text{ }^\circ\text{C}$. Se realizaron pases cada 5-6 días sembrando 5×10^5 amastigotes en 10 ml de medio.

V.5. Tratamiento de los macrófagos de la línea celular THP-1, macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana y macrófagos derivados de médula ósea de ratón

Una vez transcurridos los siete días de cultivo de los macrófagos de la línea celular THP-1, derivados de monocitos de sangre periférica humana y madurados con GM-CSF y macrófagos derivados de médula ósea de ratón, se cosecharon y se

les aplicaron los diferentes tratamientos. Se colocaron 1×10^6 M ϕ /pozo en cajas de cultivo de 24 pozos y se dejaron reposar durante dos horas. Posteriormente, se estimularon con LPS (100 ng/ml), LPS + IFN- γ (100 U/ml) y se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas Lac o DIACT en una relación 1:10 (1 M ϕ :10 amastigotes) y se incubaron durante dos horas. Se utilizaron macrófagos sin infectar como control negativo.

V.6. Extracción de proteína total

V.6.1. Lisis

Se recuperó el sobrenadante celular de cada tratamiento y se agregó 1 ml de PBS a cada condición. Se centrifugaron a $300 \times g$ a una temperatura de 4 °C durante 10 min, los sobrenadantes se guardaron a -70 °C y el precipitado de cada tratamiento se resuspendió con PBS, se centrifugó a $2500 \times g$ a una temperatura de 4 °C durante 1 min, y el precipitado se resuspendió el pellet con 1 ml de PBS por condición y se centrifugó nuevamente a $2500 \times g$ a una temperatura de 4 °C durante 1 min, cada precipitado obtenido se resuspendió con 50 μ l de buffer de lisis RIPA (N-P40 1%, Tris-HCl 1M, NaCl 1M, EDTA 50 mM, Na₃VO₄ 100 mM, NaF 100 mM, aprotinina 10 mg/ml, leupeptina 1 mg/ml, PMSF 10 mM y DTT 100 mM), por último se colocaron en hielo y se agitaron 6 veces cada 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron a $3000 \times g$ a 4 °C durante 10 min, se retiró el conglomerado celular y se cuantificó proteína.

V.7. Cuantificación de proteína por el método RC-DC de BioRad

Para la determinación de proteína en los diferentes extractos celulares se elaboró una curva estándar de BSA con concentraciones de 1 a 15 μ g. Como blanco se utilizó el amortiguador RIPA y se determinó la proteína total en un volumen de 2 μ l de cada muestra. Cada una de las condiciones se realizó por duplicado en una placa de 96 pozos. A la curva estándar y las muestras se les adicionaron 25 μ l de reactivo A y 200 μ l de reactivo B (kit BioRad DC protein assay) y se homogenizaron por pipeteo. La placa se incubó durante 15 min y se leyó en un espectrofotómetro (BIO-TEK) a 650 nm utilizando el programa KC4.

V.8. Identificación de la presencia proteínica de la iNOS por Western-blot (Wb)

Para el análisis de la presencia proteínica de la iNOS por Wb se ajustó la concentración de proteína de las muestras a 100 μ g, se les agregó buffer de carga 1:1 v/v (0.4 g de SDS, 2 ml de glicerol, 1 ml de β -mercaptoetanol, pironina-Y y azul de bromofenol), se hirvieron durante 3 min a 90 °C, posteriormente se colocaron en una cama de hielo. Las muestras se corrieron en geles SDS-PAGE al 7.5%, a 60 volts durante 20 min y posteriormente a 100 volts hasta terminar la corrida.

La transferencia de los geles se realizó en membranas de Immobilon (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) activadas previamente con metanol durante 1 min. Antes de la transferencia los geles se incubaron en buffer de transferencia (Tris HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) durante 10 min. Posteriormente, la transferencia se llevó a cabo durante 90 min a 25 volts. Las membranas transferidas se incubaron durante 5 min en TBST (Tris HCl 100 mM pH 7.4, NaCl 1.5 M, Tween 20 0.05%), se tiñeron con la solución rojo de Ponceau para verificar la correcta transferencia de las proteínas y se lavaron con TBST hasta desteñir las membranas. A continuación las membranas se bloquearon con leche al 5% en TBST durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces con TBST con cambios cada 5 minutos. Se adicionó un anticuerpo α -actina (Santa Cruz, Dallas, TX, USA) a una dilución de 1:1000 diluido en TBST con BSA al 5% y un anticuerpo α -iNOS (Genetex, Irvine, CA, USA) a una dilución de 1:500 en TBST con BSA al 5% y las membranas se incubaron toda la noche en agitación moderada a 4 °C. Al día siguiente se retiraron los anticuerpos y las membranas se lavaron con TBST. Se agregaron los anticuerpos secundarios: anticuerpo de cabra anti-ratón HRP (para el reconocimiento de la actina) a una dilución de 1:10000 y un anticuerpo de conejo anti-ratón HRP (para el reconocimiento de la iNOS) (ambos anticuerpos de Cell Signaling, Danvers, MA, USA) a una dilución de 1:5000 en TBST con 5% de leche. Las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente. Se retiraron los anticuerpos y las membranas se lavaron durante 40 min con TBST con cambios cada 5 min. Al terminar los lavados, las membranas se incubaron durante

3 minutos a temperatura ambiente con un reactivo para quimioluminiscencia (Millipore-Merck KGaA) y se expusieron a placas de rayos x (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

V.9. Cuantificación de nitritos

El sobrenadante obtenido de las diferentes condiciones de estimulación de los macrófagos se utilizó para medir indirectamente la cantidad de NO producido a través de la cuantificación de nitritos por el método de Griess. Los macrófagos estimulados se centrifugaron y el sobrenadante libre de células se incubó con el reactivo de Griess (1:1 v/v), en una placa de 96 pozos de fondo plano (Corning, Life Sciences, NY USA) durante 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 540 nm y la concentración de nitritos se determinó utilizando una curva estándar preparada con nitrito de sodio NaNO_2 con diferentes concentraciones (100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%) de nitrito de sodio y la concentración se expresó en micromoles por microlitro.

VI. Resultados

VI.1. Determinación de la presencia proteínica de la iNOS en la línea celular THP-1

Los monocitos THP-1 se diferenciaron a macrófagos mediante la incubación con 10 μM de PMA durante siete días. Se determinó que estas células fueron macrófagos debido a la morfología y a la adherencia que presentaban a las placas de cultivo (Figura 9A). El análisis de la presencia proteínica de la iNOS se determinó a las 24 y 48 horas después de haber sido estimuladas con LPS e $\text{IFN-}\gamma$. Se observó que desde las 24 horas dichos estímulos indujeron la iNOS, ya que se mostró un aumento en la intensidad de la banda obtenida mediante la técnica de Western blot (Figura 9B) en los macrófagos estimulados con LPS e $\text{IFN-}\gamma$ en comparación con el basal. A las 48 horas no se observó la misma inducción, ya que aunque se encontraban presentes las bandas, éstas no fueron más intensas que el control sin estímulo. Se pudo apreciar también que la banda obtenida fue de un peso de 80 kDa.

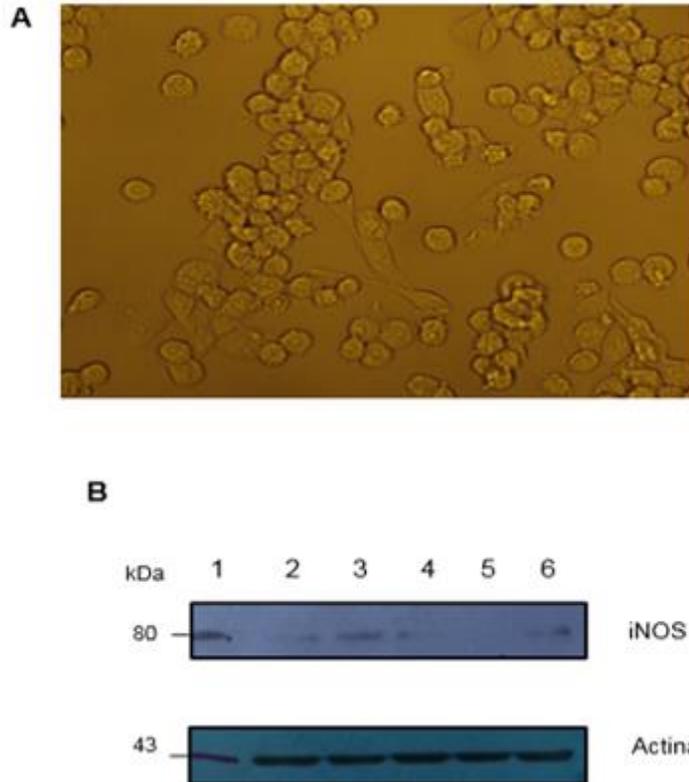


Figura 9. (A) Micrografía de la diferenciación de monocitos a macrófagos por PMA. (B) Western-blot de la presencia proteínica de la iNOS en macrófagos de la línea celular THP-1 estimuladas con LPS y LPS + IFN- γ . Las bandas de la parte superior corresponden a la presencia proteínica de la iNOS en los distintos tratamientos y se sitúa en un peso de 80 KDa. Las bandas de la parte inferior corresponden al control de carga actina con un peso de 43 KDa. Tratamientos: **1.** Marcador de peso, **2.** Basal, **3.** LPS 24 hrs. **4.** LPS 48 hrs. **5.** LPS + IFN- γ 48 hrs. **6.** LPS + IFN- γ 24 hrs.

Una vez demostrada la presencia proteínica de la iNOS en los macrófagos de la línea celular THP-1, aunque con un peso menor al esperado, se procedió a infectar las células con amastigotes de *L. mexicana* aislados de un paciente con LCL y un paciente con LCD para determinar el efecto de las cepas en la presencia proteínica de la iNOS. Como se observa en la Figura 10, ninguno de los estímulos indujo la presencia proteínica de la enzima.

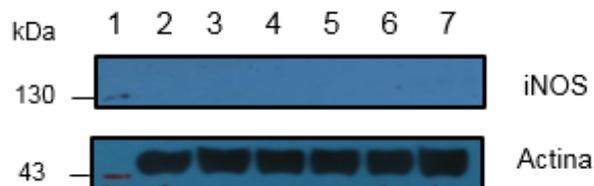


Figura 10. Western-blot de la presencia proteínica de la iNOS en macrófagos de la línea celular THP-1 infectados con amastigotes de *L. mexicana* de las cepas Lac y DIACT y estimulados con LPS y LPS + IFN- γ . Las bandas de la parte superior corresponden a la presencia proteínica de la iNOS en los distintos tratamientos: 1. Marcador de peso, 2. Basal, 3. LPS + IFN- γ , 4. DIACT + LPS + IFN- γ , 5. LAC + LPS + IFN- γ , 6. DIACT, 7. Lac. Las bandas de la parte inferior corresponden al control de carga actina con un peso de 43 KDa.

Posteriormente, se analizó el efecto de las cepas en la función de la enzima mediante la cuantificación de nitritos por el método de Griess. Como se observa en la Figura 11 los valores de producción de nitritos fueron muy bajos en todas las condiciones probadas.

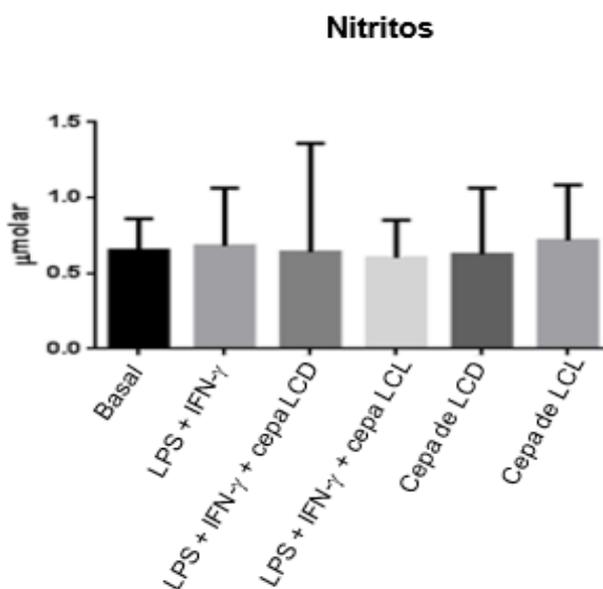


Figura 11. Cuantificación de nitritos en macrófagos de la línea celular THP-1. Los macrófagos diferenciados de la línea celular THP-1 fueron estimulados con IFN- γ y LPS e infectados con amastigotes de *Leishmania mexicana* de los aislados Lac y DIACT. Posteriormente, se determinó la concentración de nitritos por el método de Griess. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos. Los resultados presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos.

VI.2. Determinación de la presencia proteínica de la iNOS en macrófagos diferenciados de monocitos de sangre periférica humana por adherencia

Debido a que en la línea celular THP-1 no fue posible demostrar la presencia proteínica y función de la iNOS, ya que sólo se observó una banda de menor peso molecular, se utilizaron macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana. Los monocitos obtenidos por selección positiva con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-CD14 (98.7% de pureza) se diferenciaron a macrófagos por adherencia. Como se observa en la Figura 12, el tratamiento de los macrófagos con LPS + IFN- γ , IFN- γ o LPS indujo la presencia de dos bandas, una de mayor intensidad con un peso molecular alrededor de 80 KDa y otra de menor intensidad con un peso alrededor de 130 KDa, que es el peso correspondiente a la iNOS. Probablemente la banda de 80 kDa es producto de la degradación de la propia iNOS, ya que el reconocimiento es muy alto.



Figura 12. Western-blot de la presencia proteínica de la iNOS en macrófagos derivados de monocitos humanos y estimulados con LPS + IFN- γ , IFN- γ , y LPS. Las bandas de la parte superior corresponden a la presencia proteínica de la iNOS con los distintos tratamientos: 1. Marcador de peso, 2. Basal, 3. LPS + IFN- γ , 4. IFN- γ , 5. LPS.

VI.3. Determinación de la presencia proteínica de la iNOS en macrófagos diferenciados de monocitos de sangre periférica de humano con GM-CSF

Además de la adherencia, se emplearon otros métodos para diferenciar macrófagos a partir de monocitos de sangre periférica humana. Uno de estos fue la diferenciación con el GM-CSF durante 7 días. Los macrófagos diferenciados con GM-CSF se estimularon con LPS + IFN- γ y se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas de LCL y LCD. Como se observa en la Figura 12, los macrófagos en condiciones basales presentaron a la iNOS, lo cual es indicativo de que se encontraban activados, ya que esta enzima se induce cuando las células están activadas. Una probable explicación sea que el estímulo con el GM-

CSF indujo la presencia de la iNOS. Al estimular los macrófagos con LPS + IFN- γ , se indujo la presencia proteínica de la iNOS en niveles similares a los obtenidos en condiciones basales. Interesantemente, la infección de los macrófagos con los amastigotes de *L. mexicana* de ambas cepas, con el estímulo de IFN- γ + LPS o sin él, disminuyeron ampliamente la presencia proteínica de la iNOS. En el caso de la infección con los amastigotes de la cepa LCD, aún con el estímulo del IFN- γ + LPS, la disminución de la iNOS fue total, ya que no se observa ninguna banda proteínica. En el caso de la infección de los macrófagos con los amastigotes de la cepa LCL, se observa una banda muy tenue tanto en la condición de infección como en la de infección más los estímulos, lo que indica que los amastigotes de la cepa Lac, disminuyeron la presencia proteínica de la iNOS, pero no la inhibieron por completo como en el caso de la cepa DIACT (fig. 13).



Figura 13. Western-blot de la presencia proteínica de la iNOS en macrófagos derivados de monocitos humanos y estimulados con LPS + IFN- γ e infectados con las cepas de LCD o LCL. Las bandas de la parte superior corresponden a la presencia proteínica de la iNOS en los distintos tratamientos: **1.** Basal, **2.** LPS + IFN- γ , **3.** Cepa LCD + LPS + IFN- γ , **4.** Cepa LCL + LPS + IFN- γ , **5.** Cepa LCD, **6.** Cepa LCL. El peso molecular de la iNOS es de 130 KDa. Las bandas de la parte inferior corresponden al control de carga actina con un peso de 43 KDa.

VI.4. Determinación de la presencia proteínica de la iNOS en macrófagos diferenciados de médula ósea de ratón

El hecho de que los amastigotes de *L. mexicana* de ambas cepas inhibieran la presencia proteínica de la iNOS y el efecto fuera mayor con la infección con la cepa de LCD resultó muy interesante. Sin embargo, el hecho de que los macrófagos estuvieran activados en la condición basal, probablemente debido a la incubación con el GM-CSF, hizo que se trabajara con el modelo de macrófagos murinos para analizar el efecto de los amastigotes de *L. mexicana* de ambas cepas en la presencia proteínica de la iNOS. Como se observa en la Fig. 14, los macrófagos en la condición basal no presentaron a la iNOS, lo cual indicó que no

se activaron como sucedió con los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana. El estímulo con LPS indujo la presencia proteínica de la enzima y con mayor intensidad lo hizo el estímulo con LPS + IFN- γ . Interesantemente, cuando los macrófagos fueron infectados con los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa Lac, éstos no indujeron a la enzima y cuando se estimularon con LPS o con LPS + IFN- γ y se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana*, hubo una disminución importante en la presencia de la enzima. En el caso de la infección de los macrófagos con los amastigotes de la cepa DIACT, éstos no indujeron a la iNOS. Sin embargo, cuando los macrófagos se estimularon con LPS y LPS + IFN- γ y se infectaron con los amastigotes de la cepa DIACT no hubo una disminución en la presencia proteínica de la iNOS como se observó con la infección con los amastigotes de la cepa Lac.

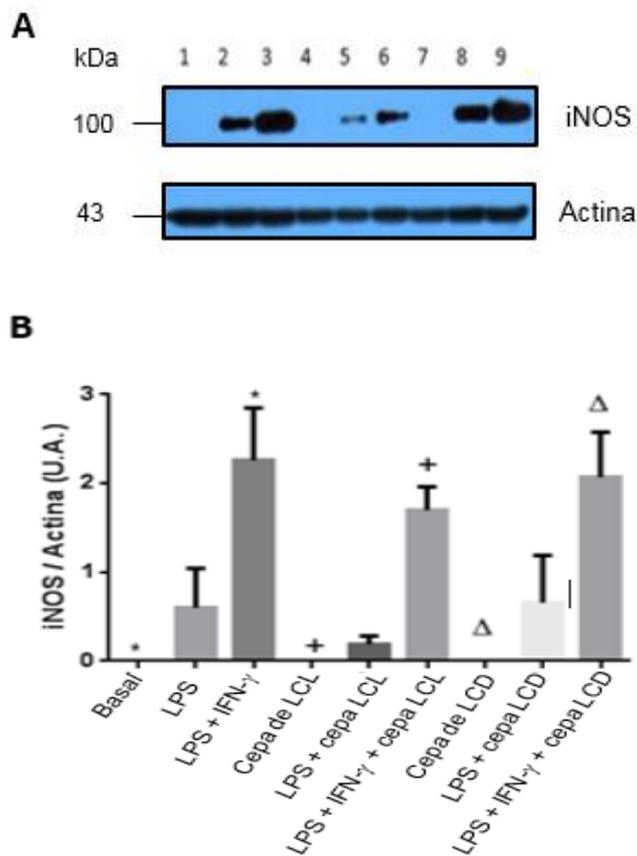


Figura 14. Expresión de la iNOS en macrófagos murinos activados de forma clásica e infectados con amastigotes de *L. mexicana* de las cepas de LCL y LCD. En A se muestra el inmunoblot de los macrófagos infectados con *L. mexicana* (cepa de LCL y LCD) en una relación 5:1 (parásitos:células) estimulados con LPS e IFN- γ durante 24 h. Como control se utilizaron macrófagos sin estimular. **1.** Basal, **2.** LPS, **3.** LPS + IFN- γ , **4.** Cepa de LCL, **5.** Cepa de LCL + LPS, **6.** Cepa de LCL + LPS + IFN- γ , **7.** Cepa de LCD, **8.** Cepa de LCD + LPS, **9.** Cepa de LCD + LPS + IFN- γ . En B se muestra la densitometría del inmunoblot. Los datos representan el promedio

más la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. Los símbolos representan las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones representadas por cada símbolo.

VI.5. Determinación de la función de la iNOS por la cuantificación de nitritos

Una vez que se encontró que los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa de LCL y LCD regularon diferencialmente la presencia proteínica de la iNOS, se analizó el efecto de las cepas sobre la función de la enzima. Se analizó la función de la iNOS mediante la producción de nitritos determinada por el método de Griess. Como se muestra en la Fig. 15, los macrófagos de médula ósea de ratón en condiciones basales casi no produjeron nitritos, la estimulación de éstos con LPS y con LPS + IFN- γ indujo la producción de nitritos, casi del doble con LPS + IFN- γ en comparación con LPS solo. La infección de los macrófagos con los amastigotes de *L. mexicana* de ambas cepas no estimuló la producción de nitritos. Sin embargo, cuando los macrófagos fueron estimulados con LPS o LPS + IFN- γ e infectados con los amastigotes de la cepa Lac o DIACT, no hubo una disminución en la producción de nitritos como se observó una disminución en la presencia proteínica de la enzima en el caso de la cepa Lac.

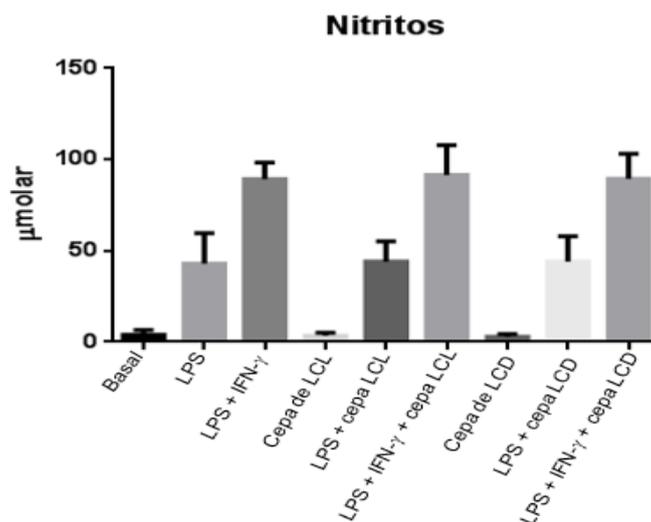
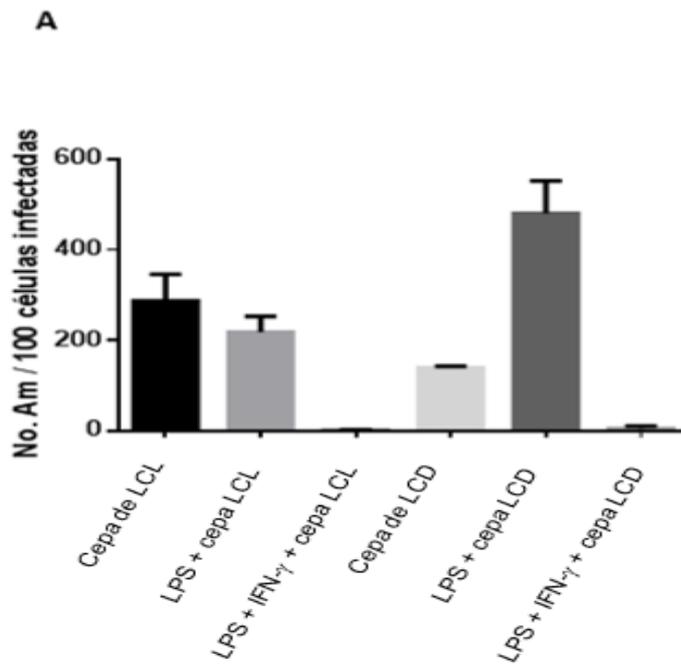


Figura 15. Determinación de la producción de nitritos en macrófagos derivados de médula ósea de ratón y estimulados con LPS y LPS + IFN- γ e infectados con las cepas DIACT (LCD) o Lac (LCL). Las células se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana* (relación 5:1, parásitos:células) durante 4 h y se estimularon con LPS o LPS + IFN- γ durante 24 h. La producción del óxido nítrico se estimó cuantificando la concentración de los nitritos presentes en los

sobrenadantes de cultivo de las células utilizando el reactivo de Griess. Los resultados presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos.

Una vez que se determinó el efecto de los amastigotes de *L. mexicana* de una cepa aislada de un paciente con LCL y otra de un paciente con LCD en la presencia proteínica y función de la iNOS en macrófagos murinos, se analizó si había diferencias en los índices de infección de las células con ambas cepas. Se infectaron macrófagos derivados de médula ósea de ratón con amastigotes de ambas cepas en una relación de 5:1 (parásitos:célula) durante 24 h, se tiñeron con Giemsa y se realizó un conteo de los parásitos dentro de las células. En la Fig. 16 se muestran las micrografías de microscopía óptica de las células infectadas bajo las diferentes condiciones.



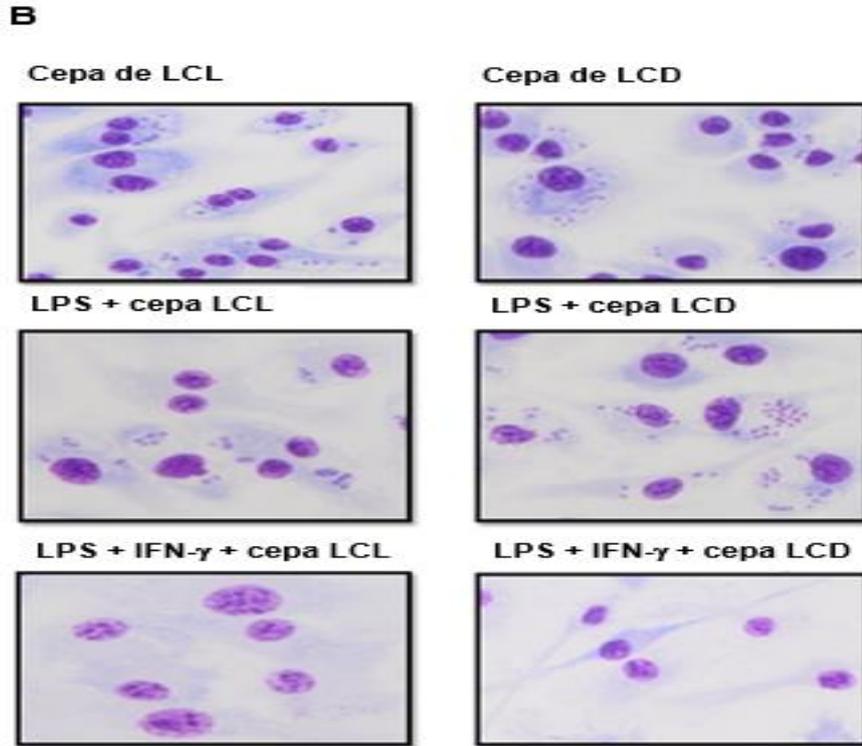


Figura 16. Índice de infección de los macrófagos derivados de médula ósea de ratón infectados con amastigotes de *L. mexicana* (cepas de LCD y LCL) activados por la vía clásica. En A se muestra el número de parásitos por 100 células infectadas en una relación 5:1 estimuladas con LPS e IFN- γ por 24 h. Como control se utilizaron macrófagos sin infectar. En B se muestran fotos representativas de macrófagos infectados por las diferentes cepas con los diferentes estímulos teñidos por Giemsa. Los datos representan el promedio más la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes.

VII. Discusión

Las especies de *Leishmania* son parásitos intracelulares obligados que infectan diferentes células tales como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y fibroblastos, pero sin duda las células en las que este parásito logra persistir y reproducirse para perpetuar la enfermedad son los macrófagos. Para lograr persistir en estas células, *Leishmania sp.* debe contrarrestar los mecanismos microbicidas que presentan los macrófagos. Uno de los mecanismos microbicidas más efectivos para la eliminación de *Leishmania sp.* es la inducción de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) con la subsecuente producción del óxido nítrico como ha sido demostrado en un modelo experimental de leishmaniasis cutánea (Blos *et al*, 2003). En las lesiones cutáneas de ratones resistentes a la infección por *Leishmania* se ha demostrado una marcada expresión y actividad de la iNOS que se correlaciona con la presencia de muy pocos parásitos o incluso ausencia (Cangussu *et al*, 2009). Adicionalmente se ha observado que los macrófagos

presentes en las lesiones de los ratones resistentes expresan a la iNOS (Stenger *et al*, 1994). La capacidad de *Leishmania sp.* de regular la inducción de la iNOS tiene una gran repercusión sobre el desarrollo o control de la enfermedad.

Leishmania mexicana es la principal especie causante de la leishmaniasis cutánea en México. La leishmaniasis cutánea puede presentar dos formas clínicas diametralmente opuestas, la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) en la que la respuesta inmune del hospedero es eficiente en el control del parásito y la leishmaniasis cutánea difusa en la que la respuesta inmune es ineficiente y el parásito logra diseminarse a todo el tegumento. Además de la leishmaniasis cutánea existen otras formas clínicas de la leishmaniasis y se ha determinado que la presencia de éstas se debe principalmente al binomio especie infectante-respuesta inmune del hospedero. Dado que una especie, como es el caso de *L. mexicana*, puede causar dos formas clínicas diferentes. Un factor que ha empezado a ser analizado en años recientes es la presencia de diferencias entre cepas o aislados de una especie. Análisis realizados con especies tales como *L. braziliensis*, *L. infantum* y *L. major* han revelado diferencias entre cepas o aislados relacionados con diferentes aspectos de la infección con el parásito (Alimohammadian *et al*, 2010; Baptista-Fernandes *et al* 2007; Markikou-Ouni *et al*, 2012; Pereira *et al*, 2009; Ritter *et al*, 2004). Sin embargo, *L. mexicana* es una especie sobre la que no se ha analizado si existen diferencias entre cepas o aislados obtenidos de pacientes con las dos formas clínicas de la leishmaniasis cutánea. Recientemente, se demostró que dos aislados de *L. mexicana*, uno obtenido de un paciente con LCL y otro obtenido de un paciente con LCD, presentaron diferencias en la fagocitosis y producción de citocinas en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (Rivera-Fernández *et al*, 2018).

Debido a la importancia de los macrófagos y su capacidad microbicida en el desarrollo de la leishmaniasis, se analizó el efecto de dos diferentes cepas de *L. mexicana*, una aislada de un paciente con LCL y otra aislada de un paciente con LCD en la presencia proteínica de la iNOS en macrófagos. Se inició el estudio utilizando la línea celular de monocitos THP-1 que se diferenció a macrófagos mediante el estímulo con PMA. La inducción de la iNOS se llevó a cabo con LPS que es un glicolípido abundante en la membrana externa de bacterias Gram-

negativas, capaz de provocar una respuesta pro-inflamatoria generalizada en el hospedero infectado. El LPS tiene un amplio espectro de efectos sobre la función de los macrófagos. La transcripción del factor NF- κ B interviene en la liberación mediada por LPS de un gran número de mediadores entre los que se encuentran la iNOS (Bosshart y Heinzelmann, 2007; Moncada, 1999). El IFN- γ es también un inductor de la iNOS debido a que además de la región de unión a NF- κ B, la región promotora de la iNOS contiene sitios de unión a factores de transcripción relacionados con el IFN- γ (Lowenstein *et al* 1993). El tratamiento de los macrófagos THP-1 con LPS y LPS + IFN- γ durante 24 y 48 h indujo la presencia proteínica de la iNOS, la cual fue revelada mediante la técnica de Western blot. La presencia proteínica de la iNOS se indujo en mayor proporción a las 24 h de incubación en comparación con las 48 h. La banda obtenida tuvo un peso de 80 kDa y el peso esperado de la iNOS es de 130 kDa. Es probable que el menor peso molecular de la banda observada se deba a que ésta se degradó, aunque en el gel se observa una única banda, aunque de poca intensidad lo que habla de una baja expresión de la proteína en estas células. Los macrófagos de la línea celular THP-1 solamente estimulados o infectados con amastigotes de *L. mexicana* obtenidos de los aislados de la cepa de LCL y la cepa LCD con estímulos de LPS e IFN- γ , no indujeron la presencia proteínica de la iNOS. Aunque la generación del NO mediado por la iNOS en macrófagos es una respuesta protectora reconocida, la contribución del óxido nítrico liberado por macrófagos humanos a la actividad microbicida ha sido el centro de mucha controversia (Weinberg, 1998). Existen reportes que indican que los macrófagos humanos son incapaces de sintetizar NO cuando se utilizan inductores de la iNOS que fácilmente la inducen en macrófagos murinos (Murray y Teitelbaum, 1992; Schneemann *et al*, 1993; Weinberg *et al*, 1995). Contrario a esto, otros reportes mencionan la producción de NO y expresión de iNOS *in vivo* durante infecciones (Weinberg 1998), e incluso se ha indicado el papel microbicida del NO durante la infección de macrófagos humanos por *Leishmania* (Mossalayi *et al*, 1999). Los mecanismos y las condiciones que favorecen la síntesis y acciones de la iNOS en los macrófagos humanos no han sido comprendidos del todo. Por ejemplo, una situación que no ha sido resuelta es si la expresión de la iNOS en macrófagos humanos depende de la fuente de los macrófagos o de la naturaleza del inductor

utilizado (Azenabor *et al*, 2009). Aunque no hubo expresión de la iNOS en los macrófagos de la línea celular THP-1, se determinó la actividad de la enzima mediante la cuantificación de nitritos por el método de Griess. En correlación con lo observado con la presencia proteínica, los diferentes tratamientos e infección con los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas de LCL o LCD no estimularon la producción de NO. Los valores fueron muy similares al basal y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Se analizó el efecto de las dos cepas de *L. mexicana* en la presencia proteínica de la iNOS en macrófagos humanos. Los macrófagos fueron estimulados igual que con la línea celular THP-1 el anticuerpo anti-iNOS reconoció una banda de 80 kDa, pero en este caso, también hubo reconocimiento de una banda con el peso esperado de la iNOS que es de 130 kDa. La banda de 80 kDa mostró una mayor intensidad que la banda de 130 kDa, probablemente es un producto de degradación de la proteína debido a que el reconocimiento con el anticuerpo es muy alto y el comportamiento con los diferentes estímulos fue muy similar entre las dos bandas, dando la mayor expresión en el caso de la estimulación con IFN- γ +LPS. Probablemente la degradación de la proteína se debió a la manipulación de las células durante el desprendimiento de las cajas de plástico por lo que no se procedió a la infección de estos macrófagos sino que se intentó madurarlos con GM-CSF. Se obtuvieron monocitos de sangre periférica humana y se estimularon con GM-CSF. Los macrófagos obtenidos se estimularon y se infectaron, como se mencionó previamente. La maduración con el GM-CSF no resultó efectiva debido a que las células se activaron y la presencia de la iNOS se observó en la condición basal con la misma intensidad que en el tratamiento con LPS+IFN- γ y la infección con las cepas de LCL y LCD o los estímulos por separado disminuyeron ampliamente la expresión de la enzima. Con estos resultados y con los antecedentes mencionados sobre los resultados contrastantes que existen en cuanto a la presencia proteínica y actividad de la iNOS en macrófagos humanos, se decidió analizar el efecto de las dos cepas de *Leishmania* en macrófagos murinos, ya que está ampliamente reportada la inducción de la iNOS en estos macrófagos con diferentes estímulos (Barrera *et al*, 1994; Chesrown *et al*, 1994; Jun *et al*, 1994; Paul *et al*, 1995). Se obtuvieron macrófagos derivados de médula ósea de ratón, se estimularon con LPS e IFN- γ y se infectaron con amastigotes

de *L. mexicana* de las cepas de LCL y LCD. Los macrófagos murinos expresaron ampliamente la iNOS cuando fueron estimulados con LPS y aún más con LPS+IFN- γ . Como ya se mencionó, la región promotora del gen de la iNOS tiene dos regiones que le confieren capacidad inductora con LPS e IFN- γ (Xie y Nathan, 1993). Por esta razón, la utilización de los estímulos en combinación produjo la mayor presencia proteínica de la iNOS en los macrófagos derivados de médula ósea de ratón. La infección de los macrófagos murinos con los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas de LCL y LCD no indujo la presencia proteínica de la iNOS. Cuando las células fueron tratadas con LPS o con LPS+IFN- γ e infectadas, la infección disminuyó la expresión de la enzima en comparación con la expresión obtenida con los estímulos sin la infección. Estos resultados coinciden con otros autores que han demostrado la inhibición de la expresión de la iNOS por la infección con *Leishmania* en macrófagos (Proudfoot *et al*, 1996; Calegari-Silva *et al*, 2015) y en células dendríticas (Wilkins-Rodríguez *et al*, 2010). Lo que se demostró y resultó muy interesante es que los amastigotes de *L. mexicana* procedentes de diferentes cuadros clínicos regularon de manera diferencial la iNOS en macrófagos murinos estimulados con LPS e IFN- γ . La cepa de LCL mostró una mayor capacidad de disminuir la presencia proteínica de la iNOS en los macrófagos estimulados con LPS e IFN- γ en comparación con la cepa de LCD. Dado que la cepa de LCD es una cepa más virulenta, dado el cuadro clínico que provoca, se esperaba que esta cepa tuviera una mayor capacidad de inhibir a la iNOS inducida por el LPS e IFN- γ . Contrario a esto, fue la cepa obtenida de un paciente con LCL, la que tuvo la mayor capacidad de disminuir a la iNOS. Lo que se observó, fue que la infección con las cepas provocó la disminución de la presencia proteínica de la iNOS inducida por el LPS e IFN- γ , pero cuando se determinó la actividad de la enzima, medida por la capacidad de producir NO, se observó que la infección no disminuyó la producción de nitritos. Los valores obtenidos al infectar los macrófagos con las cepas de LCL o LCD posteriormente a la inducción con LPS e IFN- γ fueron muy similares a los obtenidos con los macrófagos estimulados, pero sin infectar. En la regulación de la iNOS están involucrados muchos factores entre los que se encuentran algunas citosinas como IL-4, IL-10 y TGF- β (Bogdan *et al*, 1994; Jorens *et al*, 1995; Vodovotz *et al*, 1993), disponibilidad de L-arginina (Mori 2007), presencia de poliaminas (Mossner *et al*,

2001), entre otros. Probablemente, además del efecto que una cepa u otra pueda ejercer sobre la regulación de la iNOS, la presencia de los diferentes factores antes mencionados afectará la presencia proteínica y actividad de la iNOS. Aunque se demostró que las cepas aisladas de los dos diferentes cuadros clínicos de la leishmaniasis cutánea (LCL y LCD) tuvieron un efecto en la presencia proteínica de la iNOS, pero no en la actividad, se determinó la sobrevivencia de los amastigotes de las dos diferentes cepas en macrófagos murinos estimulados con LPS e IFN- γ . Se estimularon macrófagos derivados de médula ósea de ratón con LPS y LPS + IFN- γ y se infectaron con amastigotes de *L. mexicana* de las cepas de LCL y LCD. En los macrófagos no estimulados, hubo un mayor número de amastigotes de la cepa de LCL (casi el doble) en comparación con el número de amastigotes presentes en los macrófagos infectados con la cepa de LCD. Sin embargo, cuando se estimularon los macrófagos con LPS o con LPS + IFN- γ , estos estímulos provocaron la activación clásica de los macrófagos, inducción de la iNOS y producción de NO. Lo que se observó, fue que el estímulo con LPS, tal como fue demostrado en los ensayos de presencia proteínica y actividad de la iNOS, tuvo un menor efecto en la inducción de la enzima en comparación con el efecto obtenido con el estímulo con LPS + IFN- γ . El estímulo con LPS no logró eliminar a todos los amastigotes de *L. mexicana*, de hecho, con la cepa de LCD, hubo un mayor número de amastigotes presentes incluso mayor que en los macrófagos no estimulados. En cambio, el estímulo con LPS + IFN- γ logró eliminar a los amastigotes de *L. mexicana* de ambas cepas.

Con base a los resultados obtenidos se concluye que los resultados coinciden con lo reportado previamente sobre la baja capacidad o incapacidad de los macrófagos humanos de sintetizar NO (Murray y Teitelbaum 1992; Schneemann *et al*, 1993; Weinberg *et al*, 1995) debido a que únicamente se observó la presencia proteínica de una banda de 80 kDa, menor a la banda esperada de 130 kDa y hubo actividad ya que no se lograron cuantificar nitritos. Por el contrario, en los macrófagos murinos, se obtuvo la presencia proteínica y actividad de la iNOS en los macrófagos estimulados con LPS e IFN- γ . La infección de los macrófagos estimulados con los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LCL (Lac) y LCD (DIAC) disminuyó la expresión de la iNOS, lo cual coincide con resultados

previos sobre la inhibición de la expresión de la iNOS (Proudfoot *et al*, 1996; Calegari-Silva *et al*, 2015; Wilkins-Rodríguez *et al*, 2010). Por lo tanto, en este trabajo se demostró que existen diferencias entre las dos cepas en cuanto a la regulación de la presencia proteínica y actividad de la iNOS. Esto habla de diferencias entre cepas de *Leishmania* de una especie que seguramente están incidiendo sobre el desarrollo de un cuadro clínico u otro.

VIII. Bibliografía

- Adl, SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Frederico S, James TY, Karpov S, Krugens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MFJR. 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 399-451. Doi:10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.
- Adl, SM, Simpson AGB, Lukes J, Bass D, Brown M, Burki F, Dunthorn M, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Bowser SS, Lane CE, Lynn DH, 2012. The Revised Classification of Eukaryotes *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 399-451. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x.
- Adler S. 1947. The behaviour of a Sudan strain of *Leishmania donovani* in *Phlebotomus papatasi*; a comparison of strains of *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 40(5): 701-12.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno, D. 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 10(3), e0004349. doi:10.1371/journal.pntd.0004349.
- 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. *Infect Genet Evol.* 10(7): 969–975. doi: 10.1016/j.meegid.2010.06.006.
- Azenabor AA, Kennedy P, York J. 2009. Free intracellular Ca²⁺ regulates bacterial lipopolysaccharide induction of iNOS in human macrophages. *Immunobiology* 214: 143-152. doi:10.1016/j.imbio.2008.06.001.
- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 64: 1-109. doi:10.1016/S0065-308X(06)64001-3.
- Baptista-Fernandes T, Marques C, Roos Rodrigues O, Santos-Gomes GM. 2007. Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 30(1): 41–53.
- Barrera LF, Kramnik I, Skamene E, Radzioch D. 1994. Nitrite production by macrophages derived from BCG-resistant and -susceptible congenic mouse strains in response to IFN-gamma and infection with BCG. *Immunology.* 82(3): 457-464.
- Bates PA. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 37(10): 1097-1106.
- Berens RL, Deutsch-King LC, Marr JJ. 1980. *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*: hexokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, and pentose phosphate shunt activity. *Exp Parasitol.* 49 (1): 1-8.
- Besteiro S, Williams RAM, Coombs GH, Mottram JC, 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int. Parasitol.* doi:10.1016/j.ijpara.2007.03.008.
- 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(11): 5098-5108. doi: 10.4049/jimmunol.1303073.
- Blos M, Schleicher U, Soares-Rocha FJ, Meissner U, Rollinghoff M, Bogdan C. 2003. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Immunol* 33:1224-1234.
- Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie QW, Nathan C. 1994. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol.* 55: 227-233.
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-916.
- Bosshart H, Heinzelmann M. 2007. Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. *Ann N Y Acad Sci.* 1096: 1–17.
- Calegari-Silva TC, Vivarini AC, Miqueline M, Dos Santos GR, Teixeira KL, Saliba AM, Nunes de Carvalho S, de Carvalho L, Lopes UG. 2015. The human

- parasite *Leishmania amazonensis* downregulates iNOS expression via NF- κ B p50/p50 homodimer: role of the PI3K/Akt pathway. *Open Biol.* 5(9):150118. doi: 10.1098/rsob.150118.
- Cangussu SD, Souza CC, Campos CF, Vieira LQ, Afonso LC, Arantes RM. 2009. Histopathology of *Leishmania major* infection: revisiting *L. major* histopathology in the ear dermis infection model. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 918-922.
- Chesrown SE, Monnier J, Visner G, Nick HS. 1994. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, INF-gamma, TGF-beta, and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Res Commun.* 200 (1): 126-134.
- Choi CM, Lerner EA. 2001. Leishmaniasis as an Emerging Infection. The Society for Investigative Dermatology, Inc. 1087-0024/01.
- Deschamps P, Lara E, Marande W, López-García P, Ekelund F, Moreira D. 2011. Phylogenomic analysis of kinetoplastids supports that trypanosomatids arose from within bodonids. *Mol Biol Evol* 28(1): 53-58. doi: 10.1093/molbev/msq289.
- Dijkshoorn L, Ursing BM, Ursing JB. 2000. Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *J Med Microbiol.* 49(5): 397-401.
- Giavedoni P, Mascaro JM, Alsina-Gibert M, Garcia A, Estrach T. 2014. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a patient with Sézary syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71 (5), pp. e213-e214.
- Gordon S, Martinez FO. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 32(5): 593-604. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.
- Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Corraliza I. 2001. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* 193(6): 777-784.
- Iyamu EW, Perdew H, Woods GM. 2008. Cysteine-iron promotes arginase activity by driving the Fenton reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 376(1): 116-120 doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.102.
- Jorens PG, Matthys KE, Bult H. 1995. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Mediators Inflamm.* 4(2): 75–89. DOI:10.1155/S0962935195000135.
- Juliet PA, Hayashi T, Iguchi A, Ignarro LJ. 2003. Concomitant production of nitric oxide and superoxide in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 310(2): 367-370.
- Jun CD, Choi BM, Hoon-Ryu, Um JY, Kwak HJ, Lee BS, Paik SG, Kim HM, Chung HT. 1994. Synergistic cooperation between phorbol ester and IFN-gamma for induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol.* 153(8): 3684-3690.
- Kaye P, Scott P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 9(8): 604-615. doi: 10.1038/nrmicro2608.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Ashford RW. 1974. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc London B Biol Sci.* 187(1089): 409–419.
- Killick-Kendrick R. 1979. En: *Biology of the Kinetoplastida*, Vol 2. Lumsden WHR Evans DA (eds). Academic Press, London–New York. 395–460 pp.
- Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. 1977. *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 199(1135): 309-320.
- Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russel SW, Murphy M. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(20): 9730-9734.
- Lupi O, Bartlett B, Haugen R, Dy L, Sethi A, Klaus S, Machado P, Bravo F. y Tyring S. 2009. Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. *American Academy of Dermatology*.6: 897-925.
- Machado P y Azulay R. 2006. Leishmaniasis. En: Tyring S., Lupi O., Hengge U., editors. *Tropical dermatology*. New York: Elsevier Inc. pp. 41-8.

- Markikou-Ouni W, Ben Achour-Chenik Y, Meddeb-Garnaoui A. 2012. Effects of *Leishmania major* clones showing different levels of virulence on infectivity, differentiation and maturation of human dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. 169(3): 273–280.
- Marr JJ, Berens RL, Nelson DJ. 1978. Purine metabolism in *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*. *Biochim Biophys Acta*. 544(2):360-71.
- Mc Mahon-Pratt D, Alexander J. 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol Rev*. 201: 206-224.
- Modolell M, Choi BS, Ryan RO, Hancock M, Titus RG, Abebe T, Hailu A, Müller I, Rogers ME, Bangham CR, Munder M, Kropf P. 2009. Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniases. *PLoS Negl Trop Dis*. 3(7): e480.
- Moll H, Scharner A, Kämpgen E. 2002. Increased interleukin 4 (IL-4) receptor expression and IL-4-induced decrease in IL-12 production by Langerhans cells infected with *Leishmania major*. *Infect Immun*. 70(3): 1627-30.
- Moncada S. 1999. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med*. 92: 164–169.
- Mori M. 2007. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr*. 137:1616S-1620S.
- Mossalayi MD, Arock M, Mazier D, Vincendeau P, Vouldoukis I. 1999. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitol Today*. 15: 342-345.
- Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12): 958-969.
- Mossner J, Hammermann R, Racke K. 2001. Concomitant down-regulation of L-arginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine. *Pulm Pharmacol Ther*. 14: 297-305.
- Munder M, Choi BS, Rogers M, Kropf P. 2009. L-arginine deprivation impairs *Leishmania major*-specific T-cell responses. *Eur J Immunol*. 39(8): 2161-2172.
- Murray HW, Teitelbaum RF. 1992. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis*. 165(3): 513-517.
- Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Trotta T, Satalino R, Saccia M, Mitolo V, Brandonisio O. 1999. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide. *Int J Clin Lab Res*. 29: 122-127.
- Paul A, Pendreigh RH, Plevin R. 1995. Protein kinase C and tyrosine kinase pathways regulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 murine macrophages. *Br J Pharmacol*. 114(2): 482-488.
- Pereira C G, Silva A L N, de Castilhos P, Mastrantonio E C, Souza R A, Romão R P, Souza M. A. 2009. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Vet Parasitol*. 165(3-4): 231–240.
- Pimenta PF, Turco SJ, Mc Conville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, DL Sacks DL. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*. 256 (5065): 1812–1825. doi: 10.1126/science.1615326.
- Pratlong F, Dereue J, Ravel C, Lami P, Balard Y, Serres G, Lanotte G, Rioux JA, Dedet JP. 2009. Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Trop. Med. Int. Heal*. 14. 1071-1085. Doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02326.x.
- Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei WQ, Ferguson MA, Brimacombe JS, Liew FY. 1996. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(20): 10984-10989.

- Pulvertaft RJ, Hoyle GF. 1960. Stages in the life-cycle of *Leishmania donovani*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 54: 191-196.
- Ríos JM, Sousa O. 2010. Inmunología en la infección por Leishmania: conceptos actuales. *Rev méd cient.* 23(1): 19-31.
- Ritter U, Mattner J, Rocha JS, Bogdan C, Körner H. 2004. The control of *Leishmania (Leishmania) major* by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. *Microbes Infect.* 6(6): 559-565.
- Rivera-Fernández I, Argueta-Donohué J, Wilkins-Rodríguez A, Gutiérrez-Kobeh L. 2018. Differential phagocytosis and cytokine production of dendritic cells infected with two isolates of *Leishmania mexicana*. Aceptado para publicación en *J. Parasitol.*
- Rogers M, Kropf P, Choi BS, Dillon R, Podinovskaia M, Bates P, Müller I. 2009. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog.* 5(8): e1000555.
- Sacks DL, Perkins PV. 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science.* 223 (4643): 1417-1419.
- Sanyal T, Gangopadhyay P, Ghosh D K, Sarkar, D. 1994. Expression of antigens in virulent and avirulent Indian strains of *Leishmania donovani* 19(3): 291-299.
- Schneemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L, Schaffner AJ. 1993. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis.* 167(6): 1358-1363.
- Simpson L. 1973. Structure and function of kinetoplast DNA. *J Protozool.* 20(1): 2-8.
- Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C. 1994. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med.* 180:783-93.
- 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): 117-23.
- Tait A. 1983. Sexual processes in the Kinetoplastida. *Parasitology.* 86 (Pt 4): 29-57.
- Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C. 1993. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J. Exp Med.* 178: 605-613.
- Wanasen N, MacLeod CL, Ellies LG, Soong L. 2007. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *Infect Immun.* 75(6): 2802-2810.
- Wanasen N. y Soong L. 2008. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res.* 41(1): 15-25.
- Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, Wood ER, Smith GK, McDonald B, Bachus KE. 1995. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood.* 86(3): 1184-1195.
- Weinberg JB. 1998. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. *Mol Med.* 14: 557-591
- Wilkins-Rodríguez A, Escalona-Montañón A, Aguirre-García M, Becker I, Gutiérrez-Kobeh L. 2010. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Exp Parasitol.* 126: 426-434.
- Xie QW, Nathan C. 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Trans Assoc Am Physicians.* 106: 1-12.
- Yuzuru E, Tomoko T, Takezawa M, Takano S, Yokogawa Y, Shibai H. 1987. Purification and characterization of erythroid differentiation factor (EDF) isolated from human leukemia cell line THP-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 142 (3): 1095-1103.

- Zaki H, Okamoto T, Sawa T, Fujii S, Akaike T. 2007. Nitrate stress in respiratory inflammation caused by influenza virus infection. *Clin Exp Allergy Rev.* 7: 19-26. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.00120.x.
- Zilberstein D, Dwyer DM, Matthaei S, Horuk R. 1986. Identification and biochemical characterization of the plasma membrane glucose transporter of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 261(32): 15053-15057.