



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

REGULACIÓN DIFERENCIAL DEL METABOLISMO DE LA L-ARGININA A
TRAVÉS DE LA ARGINASA 1 DURANTE LA INFECCIÓN CON AISLADOS DE
Leishmania mexicana OBTENIDOS DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS
CUTÁNEA LOCALIZADA Y LEISHMANIASIS CUTÁNEA DIFUSA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ARTURO ALFREDO WILKINS RODRÍGUEZ

DIRECTORA DE TESIS
DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR
DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, CDMX. OCTUBRE DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las facilidades otorgadas.

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la asesoría de la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental y en el Laboratorio de Inmunofisiología Celular de la Unidad de Investigación UNAM-INC, ambas unidades pertenecientes a la División de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este proyecto fue desarrollado con los recursos financieros de los proyectos IN225116 e IN218119 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA, UNAM, otorgados a la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh.

Durante la realización de mis estudios de doctorado recibí una beca, con número de registro 269394, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh por su asesoría y por su apoyo en la realización de este proyecto de investigación. Gracias por su confianza y por apoyar siempre mis propuestas y decisiones. Le agradezco también todos sus valiosos consejos y oportunidades, mismos y mismas que sin duda han enriquecido mi formación y desarrollo, tanto en el ámbito académico como a nivel personal.

A la Dra. Claudia González Espinosa y al Dr. Enrique Ortega Soto por conformar mi comité tutorial. Gracias por sus evaluaciones, consejos y propuestas para sustentar y enriquecer el presente trabajo.

A los integrantes del jurado de examen: Dra. Gladis del Carmen Fragosó González, Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, Dra. Marina Macías Silva, Dr. Abraham Landa Piedra y Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por sus valiosas sugerencias para enriquecerla.

Al Dr. Armando Pérez Torres por su valiosa asesoría, por sus enseñanzas, por estar siempre dispuesto a resolver mis dudas y por las interesantes discusiones sobre mis resultados. Gracias por sentarse conmigo al microscopio y entusiasmarse al observar una preparación.

A la Dra. Alma Reyna Escalona Montaña por compartir conmigo sus múltiples conocimientos, por su asesoría y por estar siempre dispuesta a incursionar en nuevas líneas de investigación. Muchas gracias por tu amistad a lo largo de todos estos años.

Al Dr. Paul A. Bates (Lancaster University, UK) por su asesoría y por la donación de las cepas de referencia de diferentes especies de *Leishmania*.

Al Dr. David M. Mosser (University of Maryland, USA) por su asesoría y por recibirme en su laboratorio para realizar una estancia muy enriquecedora para mi formación. Gracias también por la donación de la línea celular L-929.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental y a la Dra. Norma Galindo Sevilla del Instituto Nacional de Perinatología por la donación de biopsias de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y difusa.

Al Técnico en Patología Víctor Hugo Sánchez de la Unidad de Patología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" por realizar los cortes de los bloques de tejidos embebidos en parafina.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental.

DEDICATORIA

A mis padres y a mis hermanas por su amor y apoyo incondicional

GRACIAS

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LEISHMANIASIS	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Epidemiología y distribución geográfica a nivel mundial	1
1.1.3. Epidemiología y distribución geográfica en México	3
1.2. EL PARÁSITO <i>Leishmania</i> : AGENTE ETIOLÓGICO DE LAS LEISHMANIASIS	5
1.2.1. Diagnóstico y taxonomía	5
1.2.2. Morfología	8
1.2.3. Ciclo de vida	9
1.3. FORMAS CLÍNICAS DE LAS LEISHMANIASIS	12
1.3.1. Generalidades	12
1.3.2. La leishmaniasis cutánea	13
1.3.2.1. Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)	13
1.3.2.2. Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)	15
1.3.3. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)	16
1.3.4. Leishmaniasis visceral (LV)	17
1.4. LA L-ARGININA	19
1.5. LAS ARGINASAS Y LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS	21
1.6. PARTICIPACIÓN DEL METABOLISMO DE LA L-ARGININA EN LA RESPUESTA INMUNE	23
1.7. EL METABOLISMO DE LA L-ARGININA DURANTE LA INFECCIÓN POR EL PARÁSITO <i>Leishmania</i>	29
1.8. EL METABOLISMO DE LA L-ARGININA EN EL PARÁSITO <i>Leishmania</i>	33
II. JUSTIFICACIÓN	36

III. HIPÓTESIS	38
IV. OBJETIVOS	38
4.1. OBJETIVO GENERAL	38
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	38
V. MATERIAL Y MÉTODOS	40
5.1. Ratones	40
5.2. Parásitos	40
5.2.1. Obtención de aislados de <i>Leishmania mexicana</i> a partir de lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD)	40
5.2.2. Aislamiento y cultivo axénico de amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	41
5.2.3. Cepas de referencia de <i>Leishmania mexicana</i> y <i>Leishmania major</i>	43
5.3. Identificación molecular a nivel de especie de los aislados de <i>Leishmania</i> mediante la técnica de PCR-RFLP del ITS1	43
5.4. Evaluación del curso de la infección en los ratones	45
5.5. Determinación de la carga parasitaria en las lesiones de los cojinetes plantares y en los ganglios linfáticos popliteales de los ratones infectados	45
5.6. Western blot	46
5.7. Determinación de la actividad enzimática de arginasa	49
5.8. Cuantificación de citocinas por ELISA	51
5.9. Inmunohistoquímica	51
5.10. Obtención de células de médula ósea de ratón	53
5.11. Cultivo de macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMM Φ)	55
5.12. Activación clásica (CAM Φ) y alternativa (AAM Φ) de los BMM Φ e infección con amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	55
5.13. Caracterización por citometría de flujo de los BMM Φ , CAM Φ y AAM Φ	56
5.14. Cuantificación de nitritos utilizando el reactivo de Griess	57
5.15. Análisis estadístico	58
VI. RESULTADOS	59

6.1. Caracterización molecular y morfológica de los aislados de <i>Leishmania mexicana</i> obtenidos de pacientes con LCL y LCD	59
6.2. Los ratones susceptibles infectados con aislados de <i>Leishmania mexicana</i> obtenidos de pacientes con LCL y LCD exhiben lesiones con tamaño y carga parasitaria distinta, así como una migración diferencial de los parásitos a los ganglios linfáticos que las drenan	62
6.3. La presencia proteínica de la Arg-1 y de la NOS2 se encuentra regulada diferencialmente en las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de <i>Leishmania mexicana</i> obtenidos de pacientes con LCL y LCD	65
6.4. La actividad enzimática de la Arg-1 se encuentra regulada diferencialmente en las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de <i>Leishmania mexicana</i> obtenidos de pacientes con LCL y LCD	67
6.5. Las lesiones y los ganglios linfáticos de ratones susceptibles infectados con aislados de <i>Leishmania mexicana</i> obtenidos de pacientes con LCL y LCD presentan una producción similar de IL-4 e IL-10, pero una producción diferente de IFN- γ	69
6.6. Las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de <i>Leishmania mexicana</i> obtenidos de paciente con LCL y LCD contienen macrófagos con un fenotipo de activación alternativa	72
6.7. Las lesiones de pacientes mexicanos con LCL y LCD contienen macrófagos con diferente expresión de Arg-1 y NOS2, y con distinta carga parasitaria	75
6.8. Los amastigotes albergados en las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de <i>Leishmania mexicana</i> obtenidos de pacientes con LCL y LCD exhiben distinta presencia proteínica y actividad enzimática de una arginasa propia de <i>Leishmania</i>	77
6.9. Obtención y caracterización fenotípica de los BMM Φ , CAM Φ y AAM Φ	78
6.10. La presencia proteínica y la función de la NOS2 y de la Arg-1 se inducen diferencialmente en los CAM Φ y en los AAM Φ	81
6.11. Los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> de aislados de pacientes con LCL y LCD regulan diferencialmente la síntesis proteínica y la actividad de la Arg-1 en los AAM Φ , pero no de la NOS2 en los CAM Φ	84
VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	87
VIII. BIBLIOGRAFÍA	96

IX. ARTÍCULO DERIVADO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	113
X. OTRAS PUBLICACIONES	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Endemicidad de las leishmaniasis a nivel mundial	3
Fig. 2. Endemicidad de las leishmaniasis en México	4
Fig. 3. Morfología de los promastigotes y los amastigotes de <i>Leishmania</i>	9
Fig. 4. Ciclo de vida del parásito <i>Leishmania</i>	12
Fig. 5. Lesiones en la leishmaniasis cutánea localizada (LCL)	15
Fig. 6. Lesiones en la leishmaniasis cutánea difusa (LCD)	16
Fig. 7. Lesiones en la leishmaniasis mucocutánea (LMC)	17
Fig. 8. Daño en la leishmaniasis visceral (LV)	18
Fig. 9. Fuentes de obtención de la L-arginina y compuestos biológicos principales que resultan de su metabolismo directo o indirecto en los mamíferos	20
Fig. 10. Rutas del metabolismo de la L-arginina: enzimas involucradas	21
Fig. 11. Metabolismo de la L-arginina a través de las arginasas y de las óxido nítrico sintasas	23
Fig. 12. Metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 y de la NOS2 en los macrófagos activados de forma alternativa (AAM Φ) y de forma clásica (CAM Φ), respectivamente	26
Fig. 13. Metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 y de la NOS2 en los macrófagos activados de forma alternativa (AAM Φ) y de forma clásica (CAM Φ) durante la infección con el parásito <i>Leishmania</i> .	30
Fig. 14. Caracterización de los aislados de <i>Leishmania mexicana</i>	61
Fig. 15. Los ratones susceptibles infectados con aislados de <i>Leishmania mexicana</i> obtenidos de pacientes con LCL y LCD exhiben lesiones con tamaño y carga parasitaria distinta, así como una migración diferencial de los parásitos a los ganglios linfáticos que las drenan	63
Fig. 16. La presencia proteínica de la Arg-1 y de la NOS2 se encuentra regulada diferencialmente en las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de <i>Leishmania mexicana</i> obtenidos de pacientes con LCL y LCD	67

- Fig. 17. La actividad enzimática de la Arg-1 se encuentra regulada diferencialmente en las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD 69
- Fig. 18. Las lesiones y los ganglios linfáticos de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD presentan una producción similar de IL-4 e IL-10, pero una producción diferente de IFN- γ 71
- Fig. 19. Las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de paciente con LCL y LCD contienen macrófagos con un fenotipo de activación alternativa 74
- Fig. 20. Las lesiones de pacientes mexicanos con LCL y LCD contienen macrófagos con distinta expresión de la Arg-1 y de la NOS2, y con cargas parasitarias diferentes 76
- Fig. 21. Los amastigotes albergados en las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD exhiben distinta presencia proteínica y actividad enzimática de una arginasa propia de *Leishmania* 78
- Fig. 22. Caracterización fenotípica de los macrófagos derivados de médula ósea (BMM Φ): expresión de CD11b y F4/80 79
- Fig. 23. Caracterización fenotípica de los macrófagos activados de forma clásica (CAM Φ) y de forma alternativa (AAM Φ): expresión diferencial del receptor de manosa (CD206) 80
- Fig. 24. Caracterización funcional de los macrófagos activados de forma clásica (CAM Φ) y de forma alternativa (AAM Φ): inducción diferencial de la presencia proteínica y de la función de la NOS2 y de la Arg-1 83
- Fig. 25. Los amastigotes de *Leishmania mexicana* de aislados obtenidos de pacientes con LCL y LCD regulan diferencialmente la presencia proteínica de la Arg-1 en los macrófagos activados de forma alternativa (AAM Φ), pero no de la NOS2 en los macrófagos activados de forma clásica (CAM Φ) 85
- Fig. 26. Los amastigotes de *Leishmania mexicana* de aislados obtenidos de pacientes con LCL y LCD regulan diferencialmente la actividad de la Arg-1 en los macrófagos activados de forma alternativa (AAM Φ), pero no de la NOS2 en los macrófagos activados de forma clásica (CAM Φ) 86

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

CUADRO 1. Clasificación taxonómica del género *Leishmania* basada en características extrínsecas e intrínsecas del parásito 7

TABLA 1. Datos clínicos de los pacientes a partir de los cuales se obtuvieron los aislados de *Leishmania mexicana* 59

ABREVIATURAS

Arg-1	arginasa 1
AAM Φ	macrófagos activados de forma alternativa / activación alternativa de los macrófagos
Arg-2	arginasa 2
BMM Φ	macrófagos diferenciados a partir de células precursoras existentes en la médula ósea o coloquialmente denominados macrófagos derivados de médula ósea
BSA	albúmina sérica bovina
CAM Φ	macrófagos activados de forma clásica / activación clásica de los macrófagos
CAT	transportadores de aminoácidos catiónicos
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
FITC	isotiocianato de fluoresceína
h	horas
HRP	peroxidasa de rábano
IFN- γ	interferón gamma
IgG	inmunoglobulina G
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-10	interleucina 10
IL-13	interleucina 13
IL-4	interleucina 4
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
ITS	espaciador interno transcrito
LCD	leishmaniasis cutánea difusa

LCL	leishmaniasis cutánea localizada
LMC	leishmaniasis mucocutánea
LPS	lipopolisacárido
LV	leishmaniasis visceral
M-CSF	factor estimulador de colonias de macrófagos
min	minutos
mM	milimolar
mm	milímetro
nm	nanómetro
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal
NO	óxido nítrico
NOHA	N ^ω -OH (hidroxi)-L-arginina
NOS	óxido nítrico sintasa
PBS	amortiguador de fosfatos salino
PE	ficoeritrina
RFLP	polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribosomal
s	segundos
SDs	desviaciones estándares
SDS	dodecil sulfato de sodio
SMEs	errores estándares de las medias
TBST	amortiguador salino a base de tris, suplementado con detergente Tween
Th	linfocitos T cooperadores
TNF- α	factor de necrosis tumoral
U	unidades
v/v	relación peso por peso

w/v	relación peso por volumen
$\times g$	veces el valor de la fuerza de gravedad
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados o Celcius
μg	microgramo
μl	microlitro
μM	micromolar
μm	micrómetro
μmol	micromol

RESUMEN

El metabolismo de la L-arginina a través de la arginasa 1 (Arg-1) y de la óxido nítrico sintasa inducible (NOS2) constituye un eje fundamental para la resolución o la progresión de la leishmaniasis. La infección con el parásito *Leishmania mexicana* puede generar dos manifestaciones clínicas distintas: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (DCL). En este trabajo se analizó en un modelo murino *in vivo* la capacidad de un aislado de *L. mexicana* obtenido de un paciente con LCL y de otro obtenido de un paciente con LCD para regular el metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 y de la NOS-2. Para lo anterior, se infectaron ratones susceptibles BALB/c con los aislados de *L. mexicana* y se evaluó la evolución de la infección, así como los cambios en la presencia proteínica y la actividad de la Arg-1 y de la NOS2 en las lesiones desarrolladas. Se observó que las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD fueron de mayor tamaño, tuvieron mayor carga parasitaria y mostraron una mayor presencia proteínica y actividad enzimática de la Arg-1 que las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL. En contraste, la síntesis proteínica de la NOS2 no se indujo, o se indujo pobremente, en las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL o con el aislado obtenido del paciente con LCD. El análisis por inmunohistoquímica de las lesiones permitió la identificación de macrófagos parasitados positivos para la presencia de la Arg-1 y del marcador YM1, mientras que no se detectó tinción

alguna de la NOS2, sugiriendo estos hechos una activación alternativa de los macrófagos. Adicionalmente, en las lesiones de pacientes con LCD se observó la presencia de macrófagos con una mayor carga parasitaria y presencia de la Arg-1 que en aquellos presentes en las lesiones de pacientes con LCL. Por otra parte, en macrófagos murinos diferenciados y activados de forma alternativa *in vitro*, se observó que la infección de éstos con el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCD resultó en una mayor expresión y función de la Arg-1 que la infección con el aislado obtenido del paciente con LCL. En conjunto, los resultados presentados sugieren que los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y de pacientes con LCD exhiben un grado distinto de virulencia o patogenicidad y regulan diferencialmente el metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1.

ABSTRACT

L-Arginine metabolism through arginase 1 (Arg-1) and inducible nitric oxide synthase (NOS2) constitutes a fundamental axis for the resolution or progression of leishmaniasis. Infection with *Leishmania mexicana* can cause two distinct clinical manifestations: localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). In this work, we analyzed in an *in vivo* murine model the capacity of an *L. mexicana* isolate obtained from a patient with LCL and another obtained from a patient with DCL to regulate the metabolism of L-arginine through Arg-1 and NOS2. For this purpose, susceptible BALB/c mice were infected with the *L. mexicana* isolates and the evolution of the infection as well as changes in protein presence and activity of Arg-1 and NOS2 were evaluated in the developed lesions. It was observed that lesions of mice infected with the isolate obtained from the patient with DCL were bigger, had higher parasite loads, and showed greater protein presence and enzymatic activity of Arg-1 than the lesions of mice infected with the isolate obtained from the patient with LCL. In contrast, NOS2 protein synthesis was poorly or not induced in the lesions of mice infected with the isolate obtained from the patient with LCL or the isolate obtained from the patient with DCL. The immunocytochemistry analysis of the lesions allowed the identification of parasitized macrophages positive for Arg-1 and for the marker YM1, while no staining for NOS2 was found, suggesting these facts an alternative activation of macrophages. In addition, we observed in lesions of patients with DCL

macrophages with higher parasite loads and Arg-1 expression than those in lesions of patients with LCL. Otherwise, in murine *in vitro*-generated alternatively activated macrophages, it was also observed that infection with the isolate obtained from the patient with DCL resulted in greater Arg-1 expression and function than infection with the isolate obtained from the patient with LCL. Taken together, the results presented here suggest that *L. mexicana* isolates obtained from patients with LCL or DCL exhibit different virulence or pathogenicity degrees and differentially regulate L-arginine metabolism through Arg-1.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. LEISHMANIASIS

1.1.1. Generalidades

El término leishmaniasis hace referencia a un grupo de enfermedades parasitarias causadas por diferentes especies de un protozooario intracelular del género *Leishmania* y representan un problema de salud a nivel mundial. En el hombre, al menos 21 especies de *Leishmania* pueden ser agentes etiológicos de las leishmaniasis y provocar diferentes formas clínicas que comprenden desde lesiones cutáneas (leishmaniasis cutánea) y daños a las mucosas oral, nasal y faríngea (leishmaniasis mucocutánea) hasta infecciones sistémicas, potencialmente mortales, que afectan órganos internos, principalmente el hígado, el bazo y la médula ósea (leishmaniasis visceral) (1-3). Dichas formas clínicas resultan de interacciones complejas entre la respuesta inmune del hospedero y las especies de *Leishmania* infectantes (4, 5), siendo estas últimas transmitidas al hombre, y a otros mamíferos, a través de la picadura de moscas que pertenecen a los géneros *Phlebotomus* (en Europa, Asia y África) y *Lutzomyia* (en América) (1).

1.1.2. Epidemiología y distribución geográfica a nivel mundial

Las leishmaniasis son enfermedades endémicas de al menos 98 países distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales de América, Asia y África, así como en la cuenca del Mediterráneo (constituida por las regiones del sur de Europa, el Norte de África y la zona más occidental de Asia que desembocan al

Mar Mediterráneo), considerándose ausentes sólo en la Antártida y en Oceanía (6, 7) (Figura 1). Alrededor del 95% de los casos de leishmaniasis cutánea ocurren en el continente americano, la cuenca del Mediterráneo, el Medio Oriente y el centro de Asia. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2018, más del 85% de los nuevos casos de esta forma de leishmaniasis se presentaron en 10 países: Afganistán, Argelia, Bolivia, Brasil, Colombia, Irán, Iraq, Pakistán, Siria y Túnez. En cuanto a la leishmaniasis visceral, la mayoría de los casos ocurren en Brasil, el este de África y el subcontinente indio. En el año 2018, la OMS reportó que más del 95% de los nuevos casos de esta forma clínica de leishmaniasis se produjeron en 10 países: Brasil, China, Etiopía, India, Iraq, Kenia, Nepal, Somalia, Sudán y Sudán del Sur. Por otra parte, la leishmaniasis mucocutánea se distribuye predominantemente en el continente americano y más del 90% de los casos ocurren en Bolivia, Brasil y Perú (6, 8) (Figura 1).

A nivel mundial, la OMS clasifica a las leishmaniasis dentro de las enfermedades tropicales desatendidas u olvidadas (conjunto de enfermedades infecciosas que afectan primordialmente a las poblaciones más pobres y con un acceso limitado a los servicios de salud, muchas de ellas viviendo en áreas rurales remotas y en barrios marginados), con un estimado de 12 millones de personas infectadas y 350 millones en riesgo de contraer la enfermedad. La ocurrencia anual se calcula en un rango de 700,000 a 1,000,000 casos o más, de los cuales 50,000 a 90,000 corresponden a leishmaniasis visceral y 600,000 a 1,000,000 a leishmaniasis cutánea; mientras que se registran 20,000 a 30,000 defunciones al año (6, 9, 10).

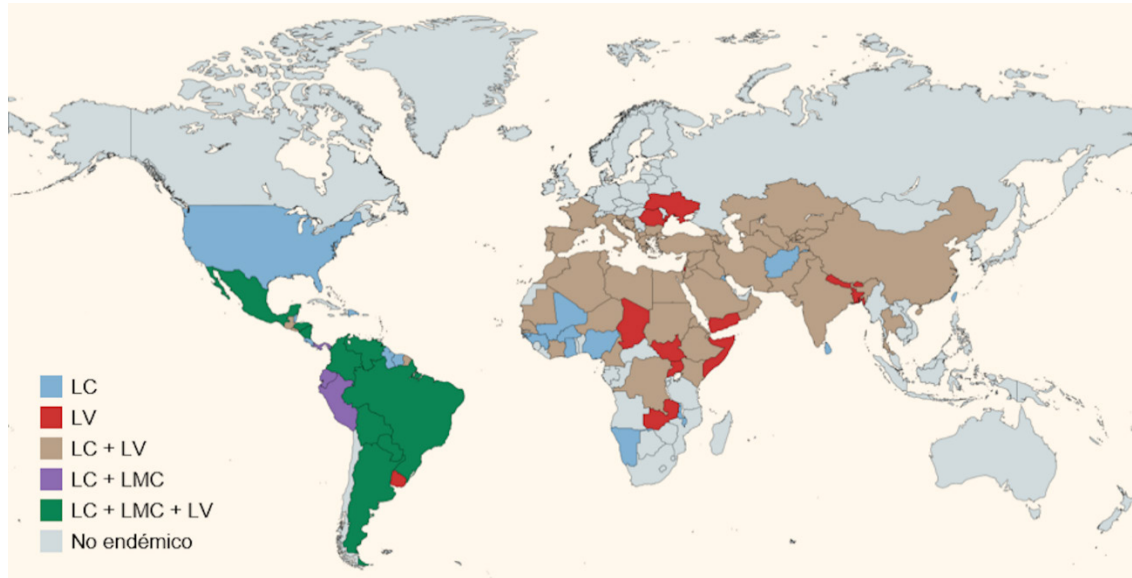


Fig. 1. Endemicidad de las leishmaniasis a nivel mundial. En el mapa se indican con un código de colores los países endémicos para la leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV). Muchos países son endémicos para más de una o hasta para las tres formas clínicas de las leishmaniasis. Mapa generado con los datos epidemiológicos reportados por la OMS para el año 2018 (8, 11).

1.1.3. Epidemiología y distribución geográfica en México

En México, las leishmaniasis se han identificado en al menos 17 estados de la República Mexicana (Figura 2), con una la población en riesgo de contraerlas estimada en 9 millones de habitantes y ocurren bajo cuatro formas clínicas principales: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), leishmaniasis cutánea difusa (LCD), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV) (12). A nivel nacional, la LCL es la forma más común de las leishmaniasis y se presenta principalmente en los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, en el sureste del país, y en los estados de Oaxaca y Chiapas, en el suroeste del país. Adicionalmente, se han reportado de forma esporádica casos de LCL en los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí y

Sinaloa, en el noreste y noroeste del país, y en los estados de Nayarit y Jalisco, en el occidente del país (Figura 2). En contraparte, la LCD, LMC y LV se presentan con mucho menor frecuencia que la LCL. La LCD se ha reportado en los estados de Veracruz, Tabasco, Coahuila, Tamaulipas y Michoacán; mientras que la LMC en los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas y Oaxaca (Figura 2). Con respecto a la LV, ésta se presenta en los estados de Guerrero, Morelos y Puebla, ubicados en la cuenca del río Balsas, así como en los estados de Oaxaca y Chiapas (12, 13) (Figura 2).

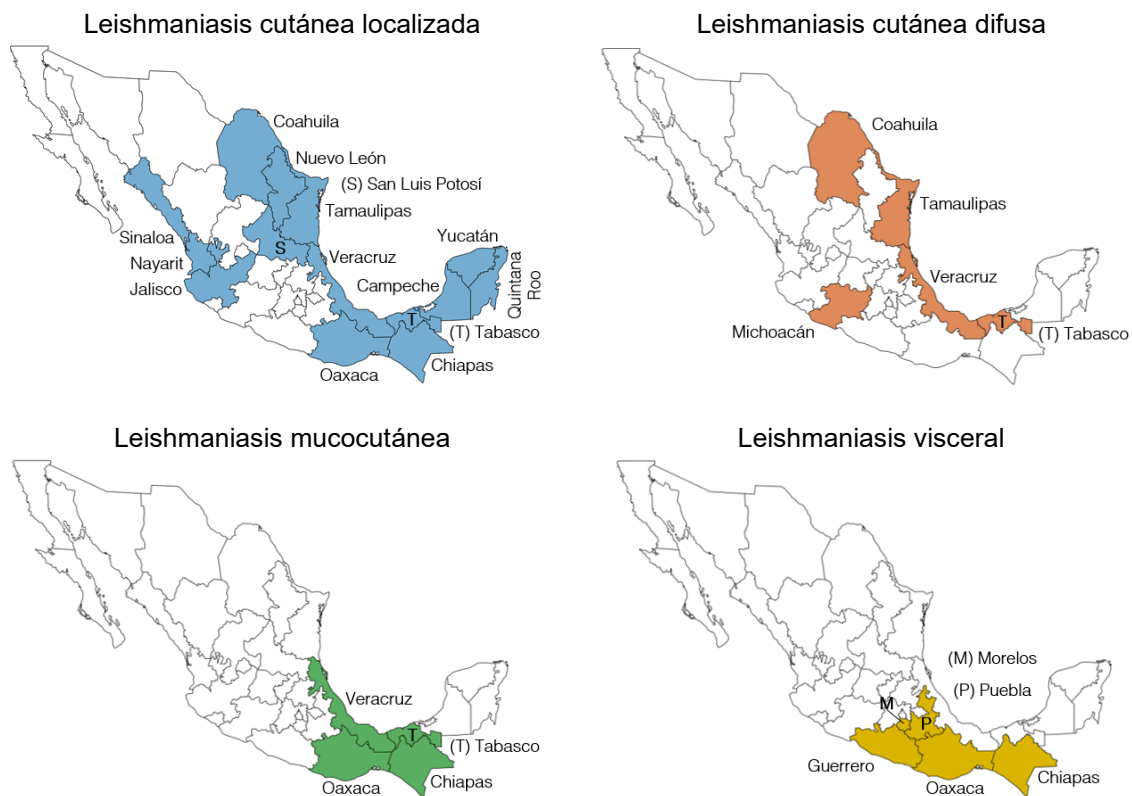


Fig. 2. Endemicidad de las leishmaniasis en México. En los mapas se muestran los estados de la República Mexicana que son endémicos para la leishmaniasis cutánea localizada, cutánea difusa, mucocutánea y visceral. Mapas generados con la información reportada por la Secretaría de Salud (12, 13).

De acuerdo con los datos epidemiológicos nacionales de un periodo comprendido entre el año 2007 al año 2018, la ocurrencia promedio de las leishmaniasis en México se calcula en aproximadamente 600 casos nuevos anuales, habiéndose reportado a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en el año 2018 una ocurrencia de 576 casos nuevos y una incidencia de 6.31 casos por cada 100,000 habitantes (9, 12).

1.2. EL PARÁSITO *Leishmania*: AGENTE ETIOLÓGICO DE LAS LEISHMANIASIS

1.2.1. Diagnóstico y taxonomía

El género *Leishmania* engloba a distintas especies de protozoarios parásitos pertenecientes al dominio Eukaryota, reino Protozoa, infrareino Excavata, phylum Euglenozoa, clase Kinetoplastea, subclase Metakinetoplastina, orden Trypanosomatida, familia Trypanosomatidae y subfamilia Leishmaniinae (1, 14) (Cuadro 1). Al formar parte de los cinetoplastidos, *Leishmania* se caracteriza por presentar un cinetoplasto, una estructura mitocondrial conformada por una red compleja de DNA no nuclear organizado en minicírculos y maxicírculos concatenados (3). Adicionalmente, dichos organismos poseen durante su estadio extracelular un solo flagelo exterior en posición anterior, el cual se reabsorbe y reduce a un axonema intracitoplásmico cuando el parásito se encuentra de forma intracelular.

Debido a que las diferentes especies de *Leishmania* no se pueden distinguir morfológicamente unas de otras, su clasificación taxonómica se ha construido a partir del estudio tanto de características extrínsecas del parásito (e.g. su

distribución geográfica, el tipo de cuadro clínico provocado en el hospedero, el patrón de su desarrollo en la mosca transmisora, etc.) como de características intrínsecas (e.g. marcadores inmunológicos, genéticos, bioquímicos y moleculares) (1). Se conoce la existencia de al menos 53 especies de *Leishmania*, de las cuales, 31 se han identificado como parásitos de mamíferos, mientras que 20 como patogénicas para el ser humano y por lo tanto de importancia médica. Taxonómicamente, las principales especies patogénicas para el hombre se encuentran agrupadas en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (Cuadro 1), inicialmente propuestos en función al desarrollo del parásito en el intestino de la mosca transmisora y que posteriormente fueron ratificados con base en estudios a nivel bioquímico y molecular (1, 15). En el subgénero *Leishmania* el desarrollo del parásito es de tipo suprapilórico, pues ocurre en la porción media del intestino de la mosca transmisora, mientras que en el subgénero *Viannia* el desarrollo del parásito es de tipo peripilórico, pues ocurre en la porción posterior y media (15). A su vez, las especies que conforman a ambos subgéneros se agrupan en complejos de especies con características intrínsecas y extrínsecas similares. De esta forma, las especies del subgénero *Leishmania* se agrupan en cuatro complejos: el complejo de *L. major*, el complejo de *L. tropica*, el complejo de *L. donovani* y el complejo de *L. mexicana*, que se distribuyen tanto en el continente americano como en Europa, Asia y África. Mientras que las especies del subgénero *Viannia* se agrupan en dos complejos: el complejo de *L. braziliensis* y el complejo de *L. guyanensis*, ambos presentes sólo en el continente americano (1, 3) (Cuadro 1).

CUADRO 1. Clasificación taxonómica del género *Leishmania* basada en características extrínsecas e intrínsecas del parásito.

Dominio	Eukaryota (Cavalier-Smith, 1998)						
Reino	Protozoa (Cavalier-Smith, 2002)						
Infareino	Excavata (Cavalier-Smith, 2003)						
Phylum	Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1993)						
Clase	Kinetoplastea (Cavalier-Smith, 1981)						
Subclase	Metakinetoplastina (Vickerman, 2004)						
Orden	Trypanosomatida (Kent, 1980)						
Familia	Trypanosomatidae (Doflein, 1901)						
Subfamilia	Leishmaniinae (Maslov y Lukês, 2012)						
Género	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903)						
Subgénero	<i>Leishmania</i> (Suprapilórico)				<i>Viannia</i> (Peripilórico)		
Desarrollo en el vector							
Complejo	<i>L.(L.) major</i>	<i>L.(L.) tropica</i>	<i>L.(L.) donovani</i>	<i>L.(L.) mexicana</i>	<i>L.(V.) braziliensis</i>	<i>L.(V.) guyanensis</i>	Sin asignar
Especies	<i>L. major</i> ¹ <i>L. gerbilli</i> <i>L. turanica</i> <i>L. arabica</i>	<i>L. tropica</i> ¹ (syn. <i>L. killicki</i>) <i>L. aethiopica</i> ²	<i>L. donovani</i> (syn. <i>L. archibaldi</i>) <i>L. infantum</i> (syn. <i>L. chagasi</i> *)	<i>L. mexicana</i> ² (syn. <i>L. pifanoi</i>) <i>L. amazonensis</i> ² (syn. <i>L. garnhami</i>) <i>L. venezuelensis</i> ¹ <i>L. waltoni</i> ³ <i>L. aristidesi</i> <i>L. forattinii</i>	<i>L. braziliensis</i> ⁴ <i>L. peruviana</i> ⁴	<i>L. guyanensis</i> ⁴ <i>L. panamensis</i> ⁴ <i>L. shawi</i> ¹	<i>L. lainsoni</i> ¹ <i>L. naiffi</i> ¹ <i>L. lindenbergi</i> ¹ <i>L. utigensis</i>
Hospedero	Hombre y otros mamíferos						
Forma clínica en el hombre	LCL ¹	LCL ¹ , LCL y LCD ²	LV y LCL	LCL ¹ , LCL y LCD ² , LCD ³	LMC y LCL ⁴ , LCL ¹		

En color rojo se muestran las especies que se distribuyen en **África**, **Asía** y **Europa**; mientras que, en color azul se muestran las especies que se distribuyen en **América**. LCL: leishmaniasis cutánea localizada, LCD: leishmaniasis cutánea difusa, LV: leishmaniasis visceral, LMC: leishmaniasis mucocutánea. Los recuadros con líneas punteadas muestran a las especies de *Leishmania* que no resultan patogénicas para el hombre. ¹, especies que producen sólo LCL; ², especies que producen tanto LCL como LCD; ³, especies que producen sólo LCD; ⁴, especies que producen tanto LMC como LCL. *, *L. chagasi* es el nombre con el que se le conoce a *L. infantum* en América.

En los últimos años se han propuesto nuevas clasificaciones taxonómicas para el género *Leishmania* basadas en datos provenientes de análisis moleculares combinados que han incorporado nuevos subgéneros y complejos, los cuales, al no ser patogénicos para el hombre, no se consideran de importancia en la investigación biomédica.

1.2.2. Morfología

Leishmania presenta dos estadios o formas durante su ciclo de vida: el promastigote y el amastigote (Figura 3). El promastigote es la forma flagelada, móvil y extracelular del parásito, la cual se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo de la mosca transmisora (16). En este estadio el parásito tiene una forma alargada, mide de 1.5 a 3.5 μm de diámetro por 5 a 15 μm de largo, presenta un núcleo ubicado en el centro del cuerpo, un cinetoplasto cercano a la parte anterior del núcleo y un flagelo de tipo anterior que nace de un cuerpo basal (situado delante del cinetoplasto) y que emerge de una invaginación de la membrana plasmática, denominada bolsa o *pocket* flagelar (16-18) (Figura 3A y B). Por su parte, el amastigote es la forma no móvil e intracelular del parásito y reside en la vacuola parasitófora de las células fagocíticas del hospedero mamífero, tales como los macrófagos y las células dendríticas (16, 19, 20). En este estadio el parásito exhibe una forma esférica u ovoidal, mide aproximadamente de 3 a 5 μm , posee un núcleo grande y excéntrico, además de un cinetoplasto en posición tangencial al núcleo (16-18). No presenta un flagelo apreciable al microscopio óptico; sin embargo, la microscopía electrónica revela la presencia de un flagelo rudimentario,

muy corto y no emergente, denominado rizoplasto, mismo que nace de un cuerpo basal y se encuentra contenido dentro de la bolsa flagelar (16-18) (Figura 3A y C).

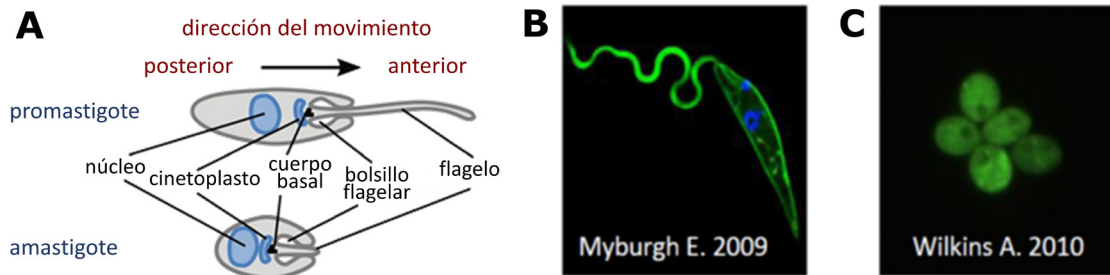


Fig. 3. Morfología de los promastigotes y los amastigotes de *Leishmania*. (A) Esquema de un promastigote y un amastigote; se señalan las estructuras celulares principales. Microscopías de fluorescencia de un promastigote (B) y de un grupo de amastigotes (C) teñidos con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

1.2.3. Ciclo de vida

El parásito *Leishmania* exhibe un ciclo de vida digenético durante el cual alterna entre un hospedero mamífero (pequeños roedores silvestres, perros, el ser humano, entre otros) y una mosca o vector que pertenece a los géneros *Phlebotomus* (en Europa, Asia y África) y *Lutzomyia* (en América) (16, 17).

Durante la etapa reproductiva, las hembras de los vectores de la leishmaniasis requieren de sangre para el desarrollo de los huevos, es decir, son hematófagas y pueden adquirir al parásito (en el estadio de amastigote) al alimentarse de un hospedero mamífero infectado (21) (Figura 4-1). Durante la hematofagia, la mosca introduce en la piel del hospedero las partes bucales con forma de sierra con las que cuenta en la probóscide y las agita, cortando y lacerando así la dermis superficial, incluidos los vasos capilares (22). Dicho proceso resulta en la formación de una herida de la que brota un pequeño charco de sangre que

proviene de los capilares lesionados y que es succionado por la mosca. Dado que la sangre que brota de la herida se mezcla con macrófagos infectados con amastigotes que se disgregan de la piel del hospedero al ser dañada durante la picadura, este es el proceso por el cual la mosca adquiere al parásito al alimentarse (15, 23) (Figura 4-1). En el intestino de la mosca, los amastigotes se liberan de los macrófagos infectados y se transforman en promastigotes procíclicos (forma flagelada, no infectiva del parásito), los cuales se dividen por fisión binaria (Figura 4-2) y se adhieren al epitelio intestinal a través de un glicolípido denominado lipofosfoglicano (LPG). Esta molécula se encuentra en la superficie del parásito e interactúa con una galectina que reviste el epitelio del tracto digestivo del vector (15, 16, 24). Posteriormente, los promastigotes, en un proceso denominado metacicloogénesis, se diferencian al estadio de promastigotes metacíclicos (Figura 4-3), en el cual ya son infectivos para el hospedero mamífero. Durante la metacicloogénesis, las moléculas de LPG sufren cambios de composición y estructura que le permiten a los promastigotes dejar de interactuar con la galectina que reviste el epitelio intestinal y desprenderse de éste, para migrar al tracto digestivo superior de la mosca y ser transmitidos al hospedero mamífero. Al alimentarse de un hospedero mamífero no infectado, el vector regurgita a los promastigotes metacíclicos y los inocula en la dermis del hospedero (Figura 4-4). Ya en la dermis, los promastigotes son fagocitados por los neutrófilos y subsecuentemente por los macrófagos, siendo estos últimos las células hospederas definitivas del parásito en el hospedero mamífero (25, 26) (Figura 4-5,

4-6). Los neutrófilos son las primeras células fagocíticas en infiltrar el sitio de la inoculación y por tanto los primeros en fagocitar a los promastigotes de *Leishmania*. Sin embargo, debido al corto tiempo de vida de los neutrófilos y a la capacidad del parásito para evadir sus mecanismos microbicidas, dichos fagocitos constituyen un refugio temporal para el parásito, donde se protege del ambiente extracelular hostil del hospedero mamífero hasta la llegada de los macrófagos (25) (Fig. 4-5). Una vez que los neutrófilos mueren por apoptosis, los promastigotes son liberados directamente o contenidos en cuerpos apoptóticos (25, 27, 28) (Fig. 4-5). Así, los neutrófilos funcionan como células hospederas intermedias que facilitan la infección de los macrófagos (fagocitos que llegan al sitio de inoculación un poco más tarde que los neutrófilos) a través de dos posibles vías: 1) la liberación (por el neutrófilo en apoptosis) de los promastigotes en la cercanía del macrófago, quien los fagocita subsecuentemente, y 2) a través de una invasión silenciosa en la que el macrófago fagocita a los promastigotes contenidos en cuerpos apoptóticos (funcionando estos últimos como un caballo de troya), sin inducir una respuesta efectora en esta célula hospederas (Fig. 4-6) (25). En los macrófagos, los promastigotes se diferencian en amastigotes dentro del fagolisosoma y se dividen intensamente por fisión binaria (Figura 4-7) hasta provocar la lisis de la célula (Figura 4-8). Una vez liberados, los amastigotes infectan a macrófagos vecinos (Figura 4-8, 4-7), en los que nuevamente se dividen intensamente hasta provocar la lisis de la célula y subsecuentemente infectan a

más macrófagos. Finalmente, el ciclo se completa cuando una mosca no infectada se alimenta de un hospedero mamífero infectado (Figura 4-1).

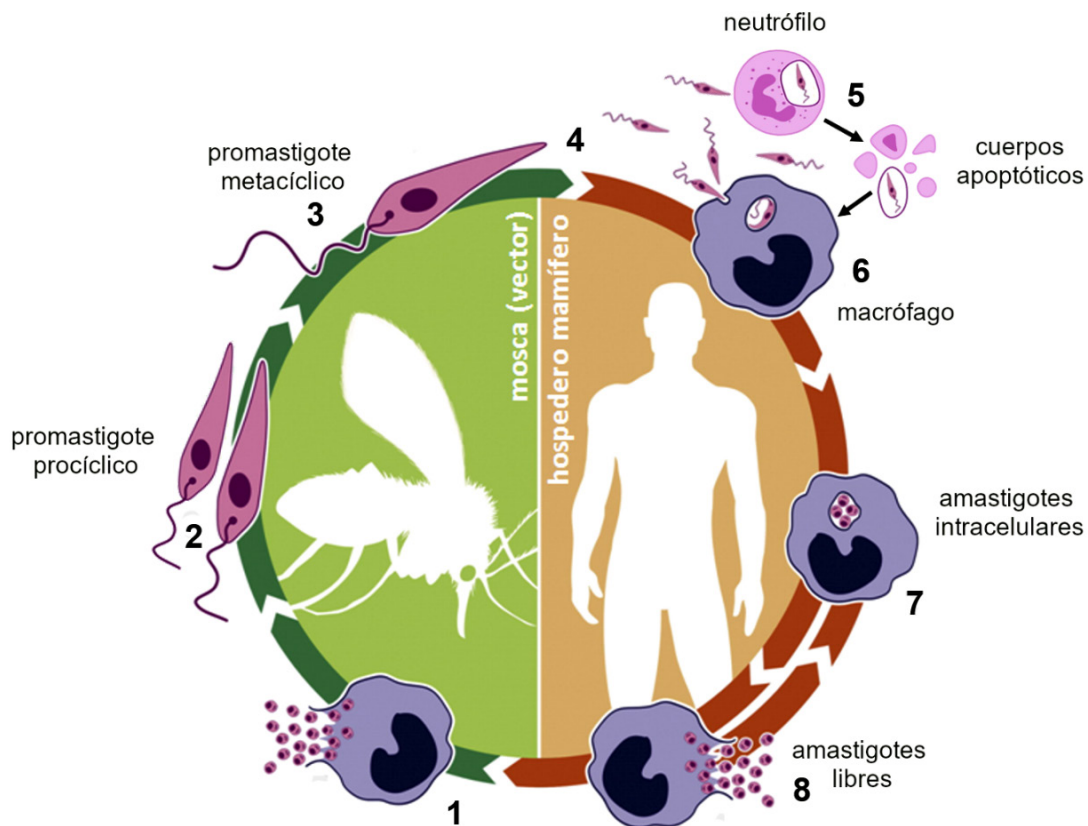


Fig. 4. Ciclo de vida del parásito *Leishmania*. Se ilustran los eventos que ocurren tanto en la mosca transmisora como en el hospedero mamífero. La secuencia numerada hace referencia a los eventos descritos en el texto. Imagen modificada a partir de Cuervo *et al.* (29).

1.3. FORMAS CLÍNICAS DE LAS LEISHMANIASIS

1.3.1. Generalidades

En el hombre, las leishmaniasis pueden presentarse en tres formas clínicas principales: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral. El establecimiento de dichas formas clínicas depende de interacciones complejas que involucran primordialmente a las características biológicas de la

especie de *Leishmania* infectante (incluso cepas o aislados pertenecientes a una misma especie) y de la mosca transmisora, así como a las características de la respuesta inmune del hospedero, la cual puede verse afectada por factores tanto genéticos como ambientales (4, 30).

1.3.2. La leishmaniasis cutánea

En esta forma clínica el parásito se multiplica en las células del sistema fagocítico mononuclear de la piel del hospedero, causando en ésta el desarrollo de lesiones que se manifiestan como úlceras y nódulos (31, 32). La leishmaniasis cutánea es la forma más común de las leishmaniasis y puede presentarse en dos variantes principales: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

1.3.2.1. Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

En los pacientes con LCL, los signos y síntomas comienzan transcurridas de 2 a 8 semanas (dependiendo de la especie de *Leishmania* infectante) a partir de que ocurre la picadura por el vector (30). El desarrollo de la lesión inicia con la formación de una pápula en el sitio de la picadura de la mosca. Conforme la lesión progresa, la pápula se transforma en un nódulo redondo e indoloro que aumenta progresivamente de tamaño y finalmente evoluciona a una úlcera de forma redondeada y crateriforme, con bordes elevados e indurados bien definidos, un fondo limpio y tejido granulomatoso en el centro (Figura 5A y B). Se pueden presentar una o varias úlceras dependiendo del número de veces que el individuo

fue picado y generalmente son indoloras, a menos de que se compliquen con infecciones bacterianas secundarias (9, 33, 34). Cuando la infección ocurre en la oreja (Figura 5C) se desarrolla una úlcera que tiende a volverse crónica, llegando a destruir el pabellón auricular y provocando mutilaciones en el mismo. Este tipo de lesión fue descrita inicialmente como la úlcera de los chicleros, debido a que la desarrollaban los recolectores de chicle a partir del árbol de chicozapote (*Manilkara zapota*), y es muy frecuente en la península de Yucatán (9, 33, 35). Las lesiones en la LCL pueden llegar a curar espontáneamente y sin necesidad de tratamiento; sin embargo, dicho proceso puede tomar varios meses e incluso años, dando como resultado la formación de cicatrices atróficas (deprimidas) e hipopigmentadas (30, 33).

La LCL es causada en Europa, Asia y África por las especies: *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y, ocasionalmente, por *L. donovani* y *L. infantum*, todas ellas pertenecientes al subgénero *Leishmania* (1, 4). En América, dicha forma clínica es causada por las especies: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* y, ocasionalmente, por *L. chagasi* (nombre con el que se le conoce a *L. infantum* en América), todas ellas pertenecientes al subgénero *Leishmania*, y por todas las especies patogénicas para el hombre que pertenecen al subgénero *Viannia* (1, 4). En México, la especie responsable de la LCL en la gran mayoría de los casos es *L. mexicana*; sin embargo, aunque con mucha menor frecuencia, se han reportado también casos de LCL en los que se ha identificado a *L. braziliensis* (especie del subgénero *Viannia*) como agente etiológico (12, 34-36).



Fig. 5. Lesiones en la leishmaniasis cutánea localizada (LCL). (A) vista frontal y (B) vista lateral de una úlcera clásica de LCL en el dorso de la mano de un paciente. La úlcera presenta una forma redondeada y crateriforme, con bordes elevados e indurados bien definidos, un fondo limpio y tejido granulomatoso en el centro. (C) Úlcera, con presencia de sangrado, en el pabellón auricular interno de la oreja derecha de un paciente con LCL. Es el tipo de lesión que se conoce coloquialmente como “úlcera del chiclero” en la Península de Yucatán. Fotos: OMS (37).

1.3.2.2. Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

La LCD es una forma grave y poco frecuente de la leishmaniasis cutánea, en la cual, a diferencia de la LCL, la infección no queda restringida en el sitio de la inoculación por el vector, sino que el parásito se disemina lentamente a lo largo de la piel a través del líquido tisular, la linfa o raramente por vía sanguínea (34, 35, 38). Se caracteriza clínicamente por la presencia de una primera lesión nodular, la cual se infiere que se desarrolla en el sitio de la picadura de la mosca, seguida por la aparición, de forma lenta e insidiosa, de múltiples nódulos (no ulcerativos y que contienen abundantes amastigotes) a lo largo de toda la piel, con excepción del cuero cabelludo (4, 30, 34, 35, 38) (Figura 6). El desarrollo de la LCD se ha asociado a una respuesta inmune celular anérgica del paciente a los antígenos del parásito; sin embargo, se ha propuesto también la participación de características o factores propios del parásito en el establecimiento de esta forma clínica. Por otra parte, la LCD es muy difícil de tratar; los pacientes no se curan de forma

espontánea, y aún con tratamiento presentan sólo respuestas favorables transitorias, con recaídas frecuentes y desarrollo de resistencia a los medicamentos (9, 30, 33).

La LCD es ocasionada en África (específicamente en Etiopía y Kenia) por *L. aethiopica* y en América por *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. waltoni* (1, 4). En México, la LCD tiene como agente etiológico a *L. mexicana* (34, 35, 39).



Fig. 6. Lesiones en la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Múltiples lesiones cutáneas nodulares distribuidas a lo largo de la espalda y brazos (A), antebrazo (B) y cara (C) de pacientes mexicanos con LCD a causa de la infección con *L. mexicana*. Fotos: Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM.

1.3.3. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

Esta forma clínica ocurre como una complicación de la LCL causada por la mayoría de las especies de *Leishmania* que pertenecen al subgénero *Viannia*, en la que a partir de una lesión cutánea localizada distante ocurre una metástasis del parásito, por vía hemática o linfática, a las mucosas oral, nasal y faríngea (9, 30). En casos raros, la LMC puede deberse a la extensión a las mucosas de una lesión cutánea localizada en la cara (9). Usualmente, una vez que la lesión cutánea distante se resuelve, la infección con el parásito permanece latente por un periodo que puede durar desde semanas hasta varios años. El daño en las mucosas

comienza frecuentemente con la afección de la mucosa del tabique o septum nasal, donde aparece un pequeño nódulo que rápidamente evoluciona a una úlcera que cursa con secreciones y sangrado. En los casos más severos, el daño puede culminar en la perforación y destrucción del tabique nasal e incluso puede extenderse hasta la laringe, faringe, tráquea y paladar blando, ocasionando disfonía, disfagia y obstrucción respiratoria (9, 30, 33, 34) (Figura 7).

La LMC es propia de América del Sur y América Central, siendo el agente causal las distintas especies del subgénero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* (30, 33). En cuanto a la presencia de esta forma de leishmaniasis en México, en los casos reportados se ha aislado e identificado a *L. braziliensis* como el agente causal (12).



Fig. 7. Lesiones en la leishmaniasis mucocutánea (LMC). (A) Daño en la mucosa orofaríngea de un paciente con LMC: lesión granulomatosa del paladar blando y pérdida de la úvula. (B) Placa eritematosa, edematosa y ulcerada, recubierta con costras serosas y hemáticas en el labio superior de un paciente con LMC. (C) Pérdida total del tabique nasal en un paciente con LMC. Fotos: OMS.

1.3.4. Leishmaniasis visceral (LV)

En esta forma clínica los amastigotes se multiplican en las células del sistema fagocítico mononuclear de los órganos internos y tejidos hematopoyéticos del hospedero, tales como el hígado, el bazo, el intestino y la médula ósea (9, 31). Una

vez que es inoculado por la mosca transmisora, el parásito se multiplica inicialmente en los macrófagos y células dendríticas de la dermis del hospedero, causando o no una lesión cutánea transitoria. Posteriormente, las células infectadas se diseminan por el torrente linfático y sanguíneo, infiltrándose eventualmente en el hígado, el bazo y la médula ósea. Subsecuentemente, los amastigotes infectan y se multiplican en los macrófagos locales de dichos órganos, alterando su funcionalidad y provocando una enfermedad sistémica (9, 40, 41). Los síntomas pueden aparecer de forma súbita o progresiva, e incluyen: inflamación del hígado y del bazo (hepatoesplenomegalia), fiebre intermitente, pérdida de peso, anemia, leucopenia, caquexia y, en etapas avanzadas, edema periférico y sangrado (8, 32, 34, 40) (Figura 8). La LV es la forma clínica de las leishmaniasis que más vidas cobra a nivel mundial, pues es mortal en el 95% de los casos si no se trata oportunamente. La población en riesgo en las zonas endémicas está constituida por niños menores de cinco años, además de individuos inmunosuprimidos y desnutridos (6, 8).

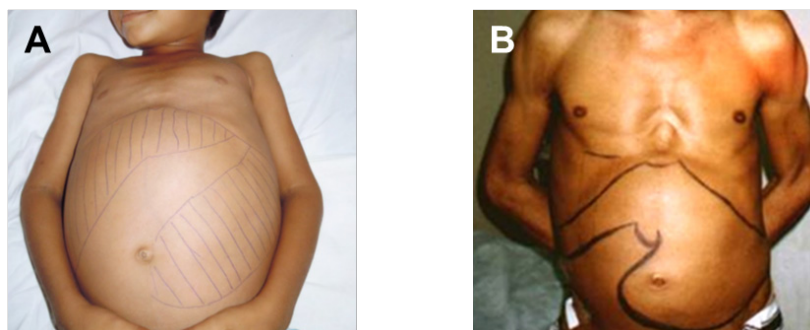


Fig. 8. Daño en la leishmaniasis visceral (LV). Pérdida de peso involuntaria, así como crecimiento del hígado y del bazo (hepatoesplenomegalia) en un infante (A) y en un adulto (B) con LV. Fotos: (A), OMS (37); (B), Costa, JML, CPq GM-Fiocruz, Brasil.

Los agentes etiológicos de la LV son: *L. donovani* en África y en Asia, y *L. infantum* en Europa, Asia y África (1, 32, 40). En América, incluyendo a México, el agente causal de la LV es *L. infantum*, especie que en dicho continente es conocida como *L. chagasi* (1, 12).

1.4. LA L-ARGININA

La L-arginina es uno de los aminoácidos más versátiles a nivel metabólico y fisiológico, pues además de ser componente de las proteínas, funciona como precursor, directo o indirecto, de al menos siete compuestos de gran importancia biológica: la urea, el óxido nítrico, las poliaminas, la L-prolina, el glutamato, la creatinina y la agmatina (Figura 9) (42, 43). En los mamíferos adultos, la L-arginina es un aminoácido no esencial (es decir, que es sintetizado por el propio organismo); sin embargo, durante la niñez y en ciertas situaciones fisiológicas o patológicas (e.g. embarazo, sepsis, trauma, estrés catabólico, daño intestinal y renal) se considera como un aminoácido semi-esencial o no esencial condicionado, ya que su consumo excede la capacidad de ser sintetizado por el organismo y debe ser suministrado de forma exógena (44-46). La disposición de la L-arginina en los mamíferos recae en obtenerla a partir de la dieta proteica, sintetizarla de forma endógena (síntesis *de novo*) y de la liberación de la misma durante el proceso de recambio proteico (Figura 9) (42). Aproximadamente el 40% de la L-arginina que se obtiene de la dieta proteica es catabolizada en el intestino antes de que entre a la circulación (47). En ausencia del aporte por la dieta

proteica, aproximadamente el 80% de la L-arginina que entra a la circulación se deriva del recambio proteico, mientras que el porcentaje restante proviene de la síntesis *de novo* de dicho aminoácido (47).

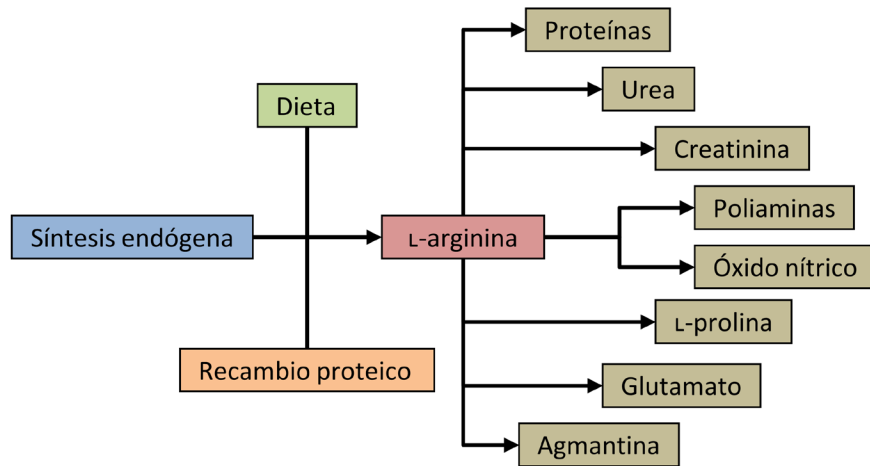


Fig. 9. Fuentes de obtención de la L-arginina y compuestos biológicos principales que resultan de su metabolismo directo o indirecto en los mamíferos.

El metabolismo de la L-arginina ocurre principalmente en el hígado y en el riñón; sin embargo, otros tejidos y células cuentan también con las enzimas necesarias para metabolizar dicho aminoácido, incluidas las células musculares lisas vasculares, las células beta pancreáticas, las neuronas, entre otras; además de algunas de las células de la respuesta inmune, tales como las células de la microglía, las células dendríticas y los macrófagos (48-50). Con respecto a las células de la respuesta inmune, resulta interesante el hecho de que se ha descrito un ciclo completo de la urea en los macrófagos (51). Mientras que sólo una enzima, la argininasuccinato liasa, cataliza la síntesis de la L-arginina, cuatro enzimas utilizan a este aminoácido como sustrato: la arginina descarboxilasa, la arginina:glicina aminotransferasa, las diferentes isoformas de la arginasa y las

diferentes isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS) (48) (Figura 10).

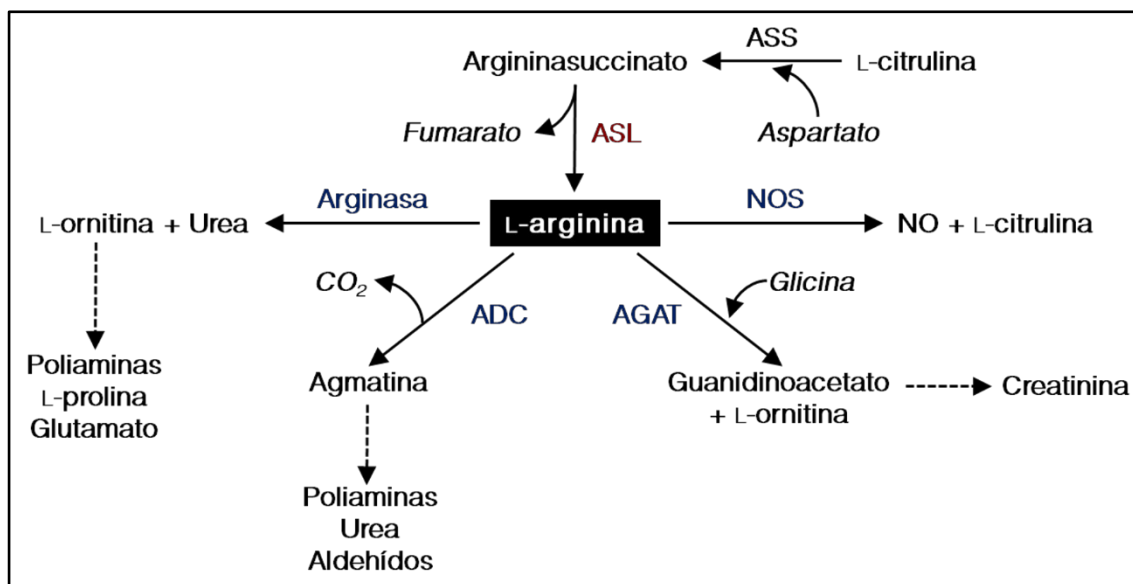


Fig. 10. Rutas del metabolismo de la L-arginina: enzimas involucradas. ASL: argininasuccinato liasa, ADC: arginina descarboxilasa, AGAT: arginina:glicina aminotransferasa. Las enzimas escritas en color azul utilizan a la L-arginina como sustrato. La enzima escrita en color rojo cataliza la síntesis de la L-arginina.

1.5. LAS ARGINASAS Y LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS

Las arginasas son metaloenzimas homotriméricas que poseen un centro binuclear de manganeso en el sitio activo de cada monómero e hidrolizan a la L-arginina dando lugar a la producción del aminoácido L-ornitina y de urea (52-54) (Figura 11).

En los mamíferos las arginasas existen en dos isoformas: la arginasa 1 (Arg-1) y la arginasa 2 (Arg-2); ambas catalizan la misma reacción bioquímica, pero difieren en cuanto a las células en las que se expresan y en su localización intracelular (53, 55). La Arg-1 es citosólica y se expresa preponderantemente en el hígado, donde cataliza el último paso del ciclo de la urea; sin embargo, la síntesis de dicha enzima

puede inducirse en algunas células de la respuesta inmune, tales como macrófagos, células dendríticas, células supresoras de origen mieloide, entre otras (53, 56). En contraparte, la Arg-2 es mitocondrial y se expresa en distintos tejidos periféricos, por ejemplo: el riñón, el cerebro, el intestino delgado, la próstata, las glándulas mamarias en lactancia, entre otros, así como en múltiples tipos celulares (53, 56).

Las óxido nítrico sintasas (NOS) son óxido-reductasas homodiméricas que catalizan, en presencia de NADPH y oxígeno, la conversión de la L-arginina en L-citrulina y la generación subsecuente de óxido nítrico (NO) a partir del átomo de nitrógeno terminal del grupo guanidino de la arginina, a través de dos reacciones sucesivas de monooxigenación (57, 58). En la primera, una molécula de L-arginina es oxidada en el último átomo de nitrógeno del grupo guanidino para producir N^ω-OH-L-arginina (NOHA), como un intermediario de la reacción. En la segunda, la NOHA es oxidada generando una molécula de NO y otra de L-citrulina (57, 58) (Figura 11).

En los mamíferos se han identificado tres isoformas de NOS: la NOS neuronal (nNOS o NOS1), la NOS inducible (iNOS o NOS2) y la NOS endotelial (eNOS o NOS3). Todas ellas son citosólicas y catalizan la misma reacción (59, 60). La NOS1 y la NOS3 se expresan de forma constitutiva y su nombre hace referencia al tipo celular en el cual fueron identificadas y caracterizadas: la NOS1 en las neuronas (nNOS), aunque también se expresa en el músculo esquelético y en el músculo cardiaco, y la NOS3 en las células endoteliales (eNOS) (60). La NOS2, a diferencia

de las otras dos isoformas, no se expresa de forma constitutiva en las células en reposo, ya que su expresión, como su nombre lo indica, se induce en varios tipos celulares (e.g. hepatocitos, células musculares lisas, condrocitos, células de la glía y microglía, linfocitos T, macrófagos y células dendríticas) en respuesta al estímulo generado por citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IFN- γ e IL-1 β , por ejemplo), por componentes microbianos (el LPS, por ejemplo) y por señales de estrés, entre otros (59-62).

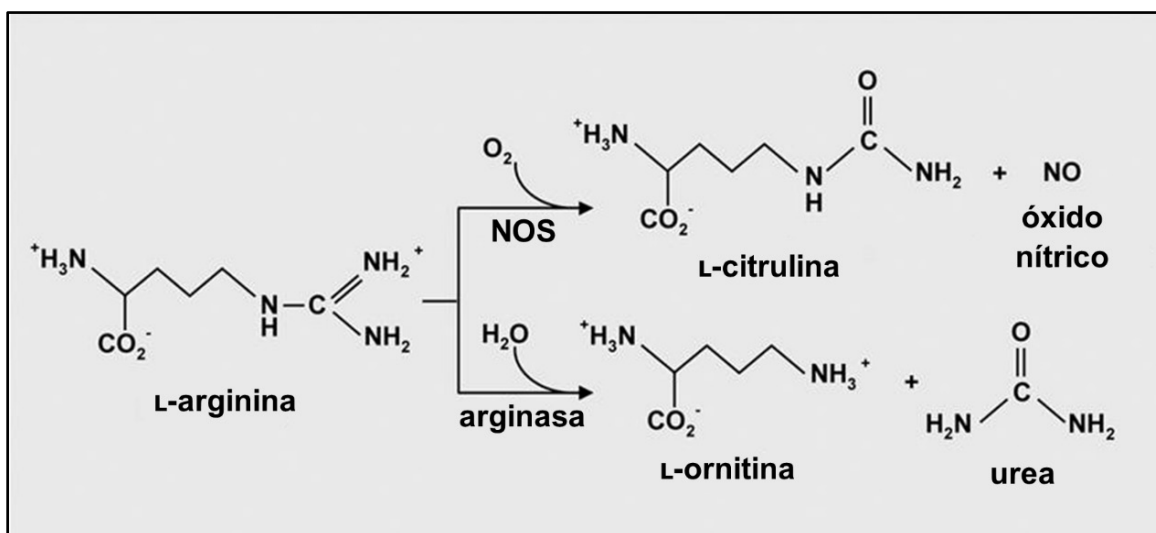


Fig. 11. Metabolismo de la L-arginina a través de las arginasas y de las óxido nítrico sintasas. Se muestra la hidrólisis de la L-arginina en L-ornitina y urea mediada por las arginasas. De igual forma, se muestra la segunda reacción de monooxigenación de la L-arginina para la generación de L-citrulina y óxido nítrico (NO) mediada por las óxido nítrico sintasas (NOS). Para fines ilustrativos más didácticos se omite la primera reacción de monooxigenación mediada por las NOS. Esquema modificado a partir de Durante *et al.* (63)

1.6. PARTICIPACIÓN DEL METABOLISMO DE LA L-ARGININA EN LA RESPUESTA INMUNE

En la respuesta inmune se ha comprobado que el metabolismo de la L-arginina a través de la NOS2 y de la Arg-1 regula de forma importante las capacidades

efectoras de los macrófagos, las células dendríticas y los neutrófilos durante los procesos infecciosos ocasionados por una gran variedad de microorganismos, tales como diferentes especies de *Mycobacterium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Schistosoma* y *Salmonella*, entre otros (50, 54, 64-67).

El metabolismo de la L-arginina adquirió gran relevancia en el contexto inmunológico con el descubrimiento de que los macrófagos murinos pueden expresar tanto a la NOS2 como a la Arg-1 y que tanto la expresión como la función de ambas enzimas son inducidas y reguladas por citocinas tipo Th1 y Th2 que estimulan al macrófago determinando su estado de activación (49, 50, 57, 68-70). En este contexto, citocinas Th1 como TNF- α e IFN- γ (producidas en un ambiente pro-inflamatorio), así como el reconocimiento del lipopolisacárido bacteriano (LPS), activan al macrófago de forma clásica (CAM Φ , por sus siglas en inglés; también denominados macrófagos M1 o inflamatorios) e inducen la expresión y función de la NOS2 (50, 58, 68, 69, 71). En contraparte, citocinas Th2 como IL-4, IL-10 e IL-13 (producidas en un ambiente anti-inflamatorio) activan al macrófago de forma alternativa (AAM Φ , por sus siglas en inglés; también denominados macrófagos M2) e inducen la expresión y función de la Arg-1 (50, 58, 68, 69).

El NO es un radical libre, por lo que posee una vida media muy corta y gran capacidad de reaccionar rápidamente con otros compuestos para lograr una configuración más estable. Tal es el caso de la reacción del NO con el anión superóxido (O_2^-), una especie reactiva del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), para formar el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) (72) (Figura 12). Este último compuesto

constituye una especie reactiva derivada tanto del nitrógeno como del oxígeno (RONS) que se ha identificado en los CAM Φ como un potente agente microbicida para combatir infecciones intracelulares generadas por virus, bacterias, hongos y protozoarios (54, 57, 61, 67, 69).

Por otra parte, además del papel que desempeña en el ciclo de la urea para la desintoxicación del amonio en los mamíferos, la Arg-1 está involucrada en otras funciones que dependen del metabolismo de la L-ornitina producida por dicha enzima. Conforme a lo anterior, en forma subsecuente a su generación, la L-ornitina es metabolizada a través de la acción de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) para la producción de poliaminas: putrescina, espermidina y espermina (53) (Figura 12). Las poliaminas son pequeñas moléculas catiónicas que participan en una gran variedad de funciones celulares (e.g. síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, proliferación, crecimiento y diferenciación celular, expresión de genes, transducción de señales, etc.) (58, 73-75). Varios estudios han demostrado que las poliaminas producidas por los AAM Φ pueden exacerbar las infecciones causadas por microorganismos intracelulares, ya que estos últimos pueden utilizar a dichas moléculas para proliferar en los macrófagos (54, 76). Adicionalmente, el metabolismo de la L-ornitina a través de la enzima ornitina aminotransferasa (OAT) conlleva a la síntesis de L-prolina (Figura 12). Dicho aminoácido es fundamental para la síntesis del colágeno, proteína que se involucra de forma preponderante en el remodelado tisular, siendo este último un proceso homeostático ligado

indudablemente a la respuesta inmune durante los procesos inflamatorios y de reparación de tejidos (58, 69).

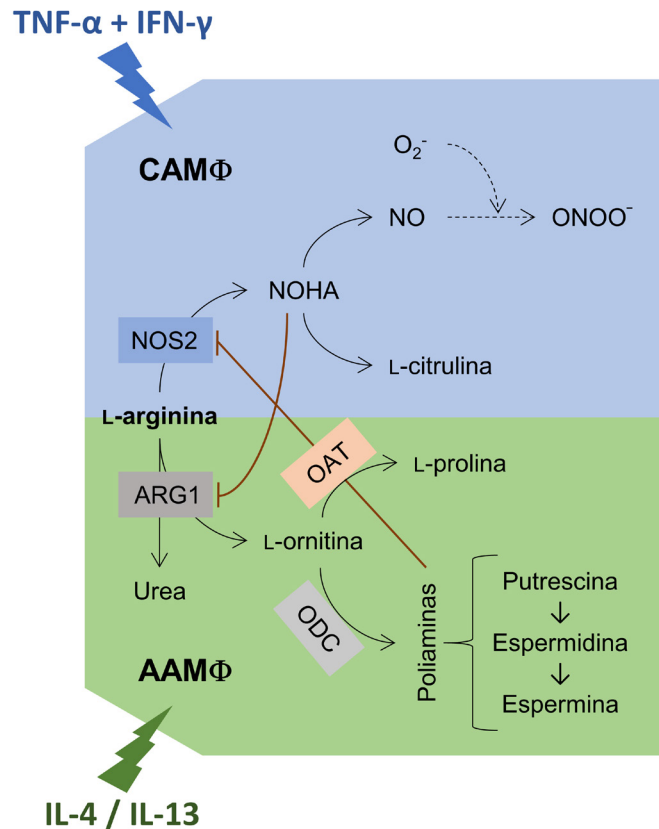


Fig. 12. Metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 y de la NOS2 en los macrófagos activados de forma alternativa (AAMΦ) y de forma clásica (CAMΦ), respectivamente. NOS2: óxido nítrico sintasa 2, NOHA: N^ω-OH-L-arginina, NO: óxido nítrico, O₂: oxígeno molecular, ONOO: anión peroxinitrito, ARG-1: arginasa 1, OAT: ornitina aminotransferasa, ODC: ornitina descarboxilasa.

La L-arginina es transportada de forma activa del ambiente extracelular al interior de las células a través de las proteínas transmembranales transportadoras del sistema denominado y⁺, mismo que incluye a la familia de proteínas transportadoras de aminoácidos catiónicos o CAT (por sus siglas en inglés) (77, 78). En los mamíferos se han identificado cuatro miembros de la familia CAT: CAT-1 – CAT-4, de los cuales, los tres primeros son transportadores de la L-arginina (78,

79). El transportador CAT-2 existe en dos isoformas: el CAT-2A y el CAT-2B. Mientras que el CAT-2A se expresa constitutivamente en el hígado y en las células musculares, el CAT-2B es el transportador de la familia CAT que se ha involucrado de manera más clara y directa en el transporte de la L-arginina en el sistema inmune, ya que se ha descrito la inducción de su expresión mediada por el estímulo con diferentes citocinas en macrófagos, linfocitos, células dendríticas, células de la microglía, entre otras (58, 66, 80-82). En los macrófagos, la expresión del CAT-2B es inducida durante el estímulo con citocinas Th1 y Th2, de tal forma que tanto los CAM Φ como los AAM Φ incorporan a la L-arginina y la metabolizan a través de la NOS2 y de la Arg-1, respectivamente (58, 66, 83).

Debido a que la NOS2 y la Arg-1 comparten como sustrato a la L-arginina, no resulta extraño que durante el metabolismo de este aminoácido ambas enzimas se regulen recíprocamente a distintos niveles, de tal forma que puedan disponer de dicho sustrato. Por ejemplo, el intermediario de reacción NOHA producido en la ruta del metabolismo de la L-arginina a través de la NOS2 es un potente inhibidor endógeno de la función de la Arg-1 en el macrófago (84, 85). Por otra parte, se ha demostrado que las poliaminas producidas de forma subsecuente al metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 pueden inhibir de diferentes formas la actividad de la NOS2 en el macrófago (Figura 12). Al respecto, se ha documentado que las poliaminas, específicamente la espermina y la espermidina, inhiben la producción de NO bloqueando la expresión génica y traducción proteica de la NOS2. Por otra parte, la espermina puede interferir con el transporte de la L-arginina al interior del

macrófago, inhibiendo en éste la expresión del transportador CAT-2B (86-88). Adicionalmente, la funcionalidad de la NOS2 y de la Arg-1 está regulada por un fenómeno de competencia por el sustrato. En este sentido, se ha demostrado que la expresión de la NOS2 está regulada a nivel traduccional en función de la disponibilidad intracelular de la L-arginina, de tal forma que el catabolismo de este aminoácido a través de la Arg-1 en los en los AAMΦ restringe la síntesis proteínica de la NOS2 y la producción de NO en los mismos (58).

La L-arginina no solo cumple la función de ser un aminoácido crucial para la activación del macrófago, sino que también puede regular la función de otras células de la respuesta inmune, tal es el caso de los linfocitos T, los cuales requieren de este aminoácido para proliferar y activarse de forma eficiente (89, 90). En este contexto, se ha demostrado que tanto los AAMΦ como células mieloides tumorales con una elevada expresión de la Arg-1 pueden inhibir la capacidad de respuesta de los linfocitos T al reducir la disponibilidad de la L-arginina en el ambiente extracelular (91, 92). Específicamente, se ha identificado que la disminución de la disponibilidad de la L-arginina disminuye la expresión y función de las cadenas zeta del complejo TCR:CD3 (CD3ζ), el principal complejo señalizador del receptor de los linfocitos T (TCR), interfiriendo con la activación de estas células (91, 92). Por otra parte, se ha comprobado que una falta de disponibilidad de la L-arginina resulta en el arresto en la fase G0-G1 del ciclo celular de los linfocitos T activados, impidiendo que éstos proliferen (93). En conjunto, estas evidencias sugieren que la co-localización de los linfocitos T con

otras células de la respuesta inmune que exhiben una elevada actividad de la Arg-1 puede generar un fenómeno hiporresponsivo en los linfocitos T (66).

1.7. EL METABOLISMO DE LA L-ARGININA DURANTE LA INFECCIÓN POR EL PARÁSITO *Leishmania*

El parásito *Leishmania* ha desarrollado múltiples estrategias para evadir o beneficiarse de la respuesta inmune del hospedero y asegurar la supervivencia en éste. Entre dichas estrategias, la capacidad del parásito para modular la regulación del catabolismo del aminoácido L-arginina a través de la NOS2 y de la Arg-1 en el hospedero se ha planteado como una vía crítica para el establecimiento y la progresión de la leishmaniasis.

Como ya se ha mencionado, en el hospedero mamífero, *Leishmania* es un parásito intracelular obligado que logra invadir a diferentes tipos celulares del sistema inmune. Se ha demostrado que las células dendríticas, los fibroblastos y los neutrófilos pueden albergar al parásito *Leishmania*; sin embargo, los macrófagos son las principales células hospederas de este parásito, ya que es en éstos donde puede completar su ciclo de vida (la transformación del estadio de promastigote al estadio de amastigote) y multiplicarse exitosamente (2, 25, 26, 94-96). Durante la infección con *Leishmania*, los macrófagos pueden tanto eliminar como albergar a dicho parásito dependiendo de su capacidad para metabolizar a la L-arginina a través de la NOS2 o de la Arg-1, enzimas cuya expresión es inducida diferencialmente y regulada en dichos fagocitos de acuerdo con su estado de activación (66, 85, 97, 98). En este contexto, diferentes estudios realizados *in vitro*

han demostrado que los macrófagos murinos activados de forma clásica (CAM Φ) mediante el estímulo con LPS + IFN- γ y TNF- α + IFN- γ son capaces de eliminar a los amastigotes de diferentes especies de *Leishmania* (e.g. *L. major*, *L. amazonensis*, *L. infantum* y *L. mexicana*) gracias a la gran capacidad leishmanicida del NO producido a partir del metabolismo de la L-arginina a través de la NOS2 (66, 81, 85, 99-102) (Figura 13). En contraparte, se ha observado que los macrófagos murinos activados de forma alternativa (AAM Φ), mediante el estímulo con IL-4, IL-10 e IL-13, albergan a los amastigotes de las diferentes especies de *Leishmania* gracias a la síntesis de poliaminas a partir de la L-ornitina generada del metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1, las cuales son aprovechadas por el parásito para proliferar dentro de la célula (66, 81, 85, 97-99) (Figura 13).

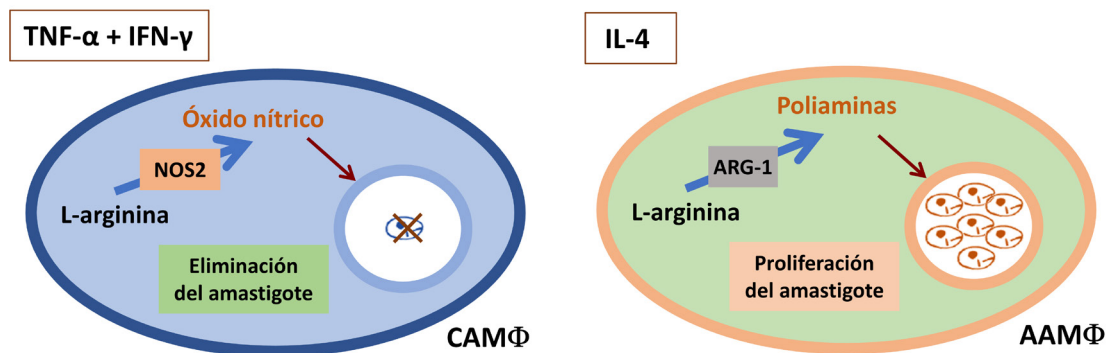


Fig. 13. Metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 y de la NOS2 en los macrófagos activados de forma alternativa (AAM Φ) y de forma clásica (CAM Φ) durante la infección con el parásito *Leishmania*.

Complementando los hallazgos obtenidos a partir de los estudios realizados *in vitro*, diferentes modelos experimentales conducidos *in vivo* han confirmado un papel crítico del metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 en la patogénesis

de la leishmaniasis cutánea murina. Por ejemplo, en las lesiones cutáneas de ratones susceptibles (BALB/c) infectados con *L. major* se ha demostrado la presencia y actividad de la Arg-1, mismas que aumentan conforme la infección progresa y se correlacionan con una replicación descontrolada del parásito, asociada esta última a un incremento en la producción de poliaminas en los macrófagos infectados (54, 98, 103). De hecho, se ha propuesto que en las lesiones cutáneas no resolutivas de ratones susceptibles infectados con *Leishmania* existe una acumulación de grandes cantidades de AAMΦ que favorecen la proliferación y persistencia del parásito en las mismas (98, 104). En contraparte, en dichos modelos experimentales de susceptibilidad a la leishmaniasis cutánea murina se ha observado una presencia limitada o la ausencia de la NOS2 en el sitio de la infección; mientras que en los modelos experimentales de resistencia para dicho padecimiento se ha demostrado una elevada expresión y actividad de la NOS2, correlacionándose ambas con la ausencia o la presencia de pocos parásitos en las lesiones de los ratones (98, 103, 105-107). En forma similar a los hallazgos demostrados en la leishmaniasis cutánea murina experimental, en la leishmaniasis visceral experimental se ha documentado que la replicación descontrolada del parásito en el bazo de hámsteres infectados con *L. donovani* se correlaciona también con una actividad elevada de la Arg-1 y una actividad disminuida de la NOS2 (54, 108-110).

En cuanto a la leishmaniasis humana, tanto la presencia proteínica como la actividad de la Arg-1 han sido detectadas en las lesiones de pacientes con

leishmaniasis cutánea a causa de la infección con diferentes especies de *Leishmania*, tales como *L. aethiopica*, *L. major*, *L. tropica* y *L. amazonensis* (111-113). Interesantemente, en el caso de la infección con *L. amazonensis*, especie que puede generar tanto leishmaniasis cutánea localizada (LCL) como leishmaniasis cutánea difusa (LCD), se ha observado una mayor presencia de la Arg-1 en las lesiones de los pacientes con LCD (una forma progresiva y no resolutive de la leishmaniasis cutánea) que en las lesiones de los pacientes con LCL (una forma menos severa y generalmente resolutive de la leishmaniasis cutánea) (112). Por otra parte, la presencia de la NOS2 ha sido detectada en las lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea a causa de la infección con *L. mexicana* y *L. braziliensis*, observándose una presencia más prominente de la enzima en las lesiones con una menor cantidad de parásitos que en aquellas con cargas parasitarias mayores (114, 115).

Además del papel directo que el metabolismo de la L-arginina puede jugar en el control de la multiplicación del parásito en el macrófago, se ha comprobado también que el metabolismo de este aminoácido puede regular la capacidad de respuesta de los linfocitos T en la leishmaniasis. Con relación a este fenómeno, se ha observado que una elevada actividad de la Arg-1 en las lesiones de ratones susceptibles infectados con *Leishmania major* disminuye la disponibilidad local de la L-arginina, generando una supresión de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T en el sitio de la infección (90, 98). Esta supresión se caracteriza por una disminución en la capacidad de proliferación de los linfocitos T CD4 y CD8, así

como en la capacidad de éstos para producir IFN- γ , sugiriéndose como causas probables de dichos fenómenos: un arresto en la fase G0-G1 del ciclo celular y una disminución en la expresión y función de las cadenas zeta del complejo TCR:CD3 (CD3 ζ), dada la falta de disponibilidad de L-arginina (90, 98). Interesantemente, en las lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea se ha detectado también una elevada presencia y actividad de la Arg-1, que coinciden con una disminución en la expresión de las cadenas zeta del complejo TCR:CD3 y de las moléculas CD4 y CD8 en los linfocitos T (111).

1.8. EL METABOLISMO DE LA L-ARGININA EN EL PARÁSITO *Leishmania*

La L-arginina se ha identificado como un aminoácido esencial para la multiplicación y el desarrollo del parásito *Leishmania* (80, 116). Las primeras aproximaciones a la existencia de una ruta metabólica de la L-arginina en *Leishmania* surgieron cuando se descubrió que este parásito no puede crecer en cultivos *in vitro* en medios libres de L-arginina, sugiriendo este hecho que dicho protozoo posee mecanismos tanto para la incorporación como para el metabolismo de dicho aminoácido (117, 118). Diferentes estudios a nivel molecular y funcional han demostrado la participación de distintas permeasas de aminoácidos ácidos (AAP) en diferentes especies de *Leishmania* como las moléculas responsables del transporte de la L-arginina en dicho parásito (119). Tal es el ejemplo de la permeasa LdAAP3, identificada en *L. donovani* como la responsable de transportar a la L-arginina del medio externo al interior del parásito (120). Adicionalmente, es bien conocido que *Leishmania* posee enzimas

involucradas en la ruta del metabolismo de la L-arginina, entre ellas: una arginasa, una óxido nítrico sintasa (NOS) y una ornitina descarboxilasa (ODC) (66, 116, 119).

La expresión de una arginasa en *Leishmania* se sugirió inicialmente a partir de la detección de la actividad de esta enzima en lisados del parásito (121). Como respuesta a este fenómeno, se han identificado y caracterizado las secuencias génicas que codifican para una arginasa en diferentes especies de *Leishmania*, tales como *L. major*, *L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. tropica* y *L. mexicana*, y en el caso de la primera y la última de las especies mencionadas, se ha logrado también la clonación de dicha enzima (99, 116, 122-129). La caracterización bioquímica y funcional de la arginasa de *L. mexicana* y *L. major* ha permitido demostrar que esta enzima es esencial para la supervivencia del parásito, ya que los promastigotes de ambas especies en los que se ha eliminado el gen que codifica para ésta no pueden mantenerse en cultivo *in vitro* sin la adición exógena de L-ornitina o de poliaminas (129, 130). Interesantemente, se ha observado que cepas de *L. major* y *L. mexicana* deficientes en el gen que codifica para la arginasa se ven limitadas en su capacidad infectiva, pues logran establecer la infección en ratones susceptibles, pero de forma más tardía y menos severa que los parásitos normales, disponiendo sólo de las poliaminas sintetizadas por el hospedero (99, 130).

Por otra parte, se ha documentado que *Leishmania* expresa también una ODC, la cual metaboliza a la L-ornitina (obtenida a partir de la hidrólisis de la L-arginina mediada por la arginasa) en poliaminas y resulta vital para la supervivencia y

crecimiento del parásito. Este hecho se refleja mediante la demostración de que la delección del gen que codifica para dicha enzima en el parásito es letal, impidiendo su crecimiento *in vitro* sin la suplementación con poliaminas (131).

Como ya se ha mencionado, la NOS2 y la producción de NO a través de dicha enzima son fundamentales para la eliminación de *Leishmania*. Sin embargo, resulta sorprendente el hecho de que *Leishmania* tiene también la capacidad de producir NO. Por ejemplo, se han detectado concentraciones considerables de NO en el sobrenadante del cultivo *in vitro* de diferentes especies de *Leishmania*, tales como *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. chagasi* (132). Mas aún, se ha logrado aislar y caracterizar una óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de promastigotes de *L. donovani*, de promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis*, presentando dicha enzima grandes similitudes con las NOS constitutivas de los mamíferos (eNOS y nNOS) (133-135). Sin embargo, la función y relevancia biológica de la presencia de una NOS y la producción de NO en *Leishmania* no son del todo claras. En cuanto a este último aspecto, se han detectado mayores niveles de NO en los sobrenadantes de cultivo de *Leishmania* durante el desarrollo de los estadios infectivos (amastigotes o promastigotes metacíclicos) que en los estadios no infectivos, sugiriéndose una estrecha relación entre la NOS del parásito y su capacidad infectiva (134, 135). Por otra parte, se ha reportado también que el NO producido por la NOS de *Leishmania* actúa como un inhibidor de la apoptosis y como un factor de supervivencia para el parásito (61).

II. JUSTIFICACIÓN

Debido a la homogeneidad del fondo genético y de la respuesta inmune que presentan las cepas endogámicas de ratón, los modelos murinos de la leishmaniasis han sido de gran ayuda para demostrar la existencia de factores patogénicos o de virulencia intrínsecos a los distintos de aislados de una misma especie del parásito que influyen en la determinación del curso de la infección. Por ejemplo, se ha observado que diferentes aislados de *L. major* obtenidos de pacientes de distintas regiones geográficas, así como diferentes aislados de *L. amazonensis* obtenidos de pacientes con distintas formas clínicas de leishmaniasis (LCL, LCD, LMC, LV), difieren en su capacidad patogénica o virulencia al ser utilizados para infectar ratones experimentalmente, generando cursos disímiles en la evolución de la infección y en la respuesta inmune inducida en dichos hospederos (136-138).

En México, *Leishmania mexicana* es el principal agente etiológico de la leishmaniasis cutánea en México y puede dar origen a dos formas clínicas completamente opuestas: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

Los factores que determinan la evolución de la infección por *L. mexicana* hacia un cuadro clínico de LCL o LCD aún no se han dilucidado por completo. Se ha propuesto que entre estos factores tanto las características inmunológicas y genéticas del individuo para resolver la infección como la existencia de diferentes

factores intrínsecos o asociados al parásito juegan un papel preponderante en el desarrollo de la LCL y la LCD.

Dado lo anterior y tomando en cuenta el hecho de que el metabolismo del aminoácido L-arginina a través de la Arg-1 y de la NOS2 ha emergido como un mecanismo crucial para la progresión o resolución de la leishmaniasis, en el presente estudio se analizó la capacidad de un aislado de *L. mexicana* obtenido de un paciente con LCL y de otro obtenido de un paciente con LCD para regular diferencialmente esta vía metabólica, impactando el curso y la severidad de la infección en el hospedero.

III. HIPÓTESIS

Los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD regulan diferencialmente el metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 y de la NOS-2 en la leishmaniasis cutánea.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la infección con aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes humanos con LCL y LCD en la regulación del metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 y de la NOS-2 en un modelo experimental murino de leishmaniasis cutánea.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener aislados de *L. mexicana* a partir de las lesiones de pacientes con LCL y LCD, caracterizarlos a nivel de identidad de especie y mantenerlos *in vitro*, en sistemas de cultivo axénico, e *in vivo*, mediante la infección de ratones BALB/c (cepa de ratón susceptible a la infección por *L. mexicana*).
2. Evaluar la capacidad patogénica de los aislados de *L. mexicana* en un modelo *in vivo* de leishmaniasis cutánea experimental desarrollado en ratones BALB/c.

3. Analizar en las lesiones de los ratones el efecto de la infección con los aislados de *L. mexicana* en la regulación de la síntesis proteica y actividad de la Arg-1 y de la NOS2.
4. Analizar en las lesiones de los ratones el efecto de la infección con los aislados de *L. mexicana* en la producción de citocinas Th1 y Th2 y su correlación con la regulación de la expresión y función de la Arg-1 y de la NOS-2.
5. Identificar la presencia de la Arg-1 y de la NOS-2 en los macrófagos presentes en las lesiones de los ratones infectados con los aislados de *L. mexicana* y su probable correlación con el estado de activación de dichas células.
6. Identificar la presencia de la Arg-1 y de la NOS-2 en los macrófagos presentes en las lesiones de pacientes con LCL y LCD, y su probable correlación con el estado de activación de dichas células.
7. Evaluar la presencia y actividad de una arginasa y de una óxido nítrico sintasa propias de *Leishmania* en los parásitos presentes en las lesiones de ratones infectados con los aislados de *L. mexicana*.
8. Determinar en ensayos *in vitro* el efecto de la infección con los aislados de *L. mexicana* sobre la expresión y función de la Arg-1 y de la NOS-2 en macrófagos murinos activados de forma clásica y de forma alternativa.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Ratones

En el presente estudio se utilizaron ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 (hembras, de 8 a 10 semanas de edad). Los ratones se criaron en el Bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, a partir de pies de cría adquiridos de los Laboratorios Charles Rivers (Wilmington, MA, USA) y siguiendo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Todos los procedimientos realizados a los ratones durante la fase de experimentación fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, UNAM (No. de aprobación 00/2014).

5.2. Parásitos

5.2.1. Obtención de aislados de *Leishmania mexicana* a partir de lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

Se utilizaron dos aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos a partir de las lesiones de un paciente con LCL (aislado MHOM/MX/2012/CGR) y de un paciente con LCD (aislado MHOM/MX/2012/MRB). El paciente con LCL era residente del estado de Campeche y el paciente con LCD del estado de Tabasco, dos estados de la República Mexicana con regiones altamente endémicas de leishmaniasis cutánea a causa de la infección con *L. mexicana*. Después de haber obtenido el

consentimiento informado por escrito de ambos pacientes, de haber realizado asepsia de las lesiones y aplicado anestesia local, se tomó una biopsia de 3 mm de diámetro del borde activo de la úlcera del paciente con LCL empleando un punch o sacabocados desechable y se realizaron aspirados de las lesiones nodulares del paciente con LCD utilizando una jeringa de tuberculina. La biopsia obtenida del paciente con LCL se homogenizó en PBS, presionando el tejido con un pistilo, para lograr la liberación de los amastigotes de *Leishmania* contenidos en las células infectadas. Posteriormente, tanto el homogenado de la biopsia como los aspirados de los nódulos se inocularon en medio de cultivo semisólido Sloppy de Evans (139) y se mantuvieron en incubación a 26°C, siendo revisados cada 48 h, hasta detectar la diferenciación de los amastigotes en promastigotes. Una vez diferenciados, los promastigotes se cultivaron en medio 199 (pH 7.2) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (a 56 °C, durante 30 min), 25 mM de HEPES, 1% de vitaminas (basal medium Eagle [BME] vitamins), 100 U/ml de penicilina G, 100 µg de estreptomina y 2 mM de L-glutamina (todos adquiridos de Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (4-5 días). Finalmente, los promastigotes en fase estacionaria de crecimiento se inocularon en ratones susceptibles BALB/c para mantener la virulencia de los aislados obtenidos y se criopreservaron en nitrógeno líquido para su resguardo.

5.2.2. Aislamiento y cultivo axénico de amastigotes de *Leishmania mexicana*

Los amastigotes se aislaron a partir de las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares de ratones BALB/c infectados durante 8 semanas con los aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de los pacientes y se cultivaron de forma axénica, siguiendo metodologías reportadas con anterioridad (67, 140), con ligeras modificaciones. Para dicha tarea, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y en condiciones asépticas se extirpó la pata infectada. Ésta se maceró presionándola con el émbolo de una jeringa de 10 ml sobre una malla de nylon con un poro de 100 μM (Falcon; Corning, Corning, NY, USA) acoplada a un tubo cónico de 50 ml, mientras se adicionaban 10 ml de medio de cultivo para amastigotes (Grace's Insect Medium [pH 5.4], suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina G y 100 μg de estreptomicina) (todos adquiridos de Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). La suspensión obtenida del macerado se centrifugó a $100 \times g$ durante 5 min a temperatura ambiente para eliminar los restos celulares. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó a $2000 \times g$ durante 10 min a temperatura ambiente para concentrar a los amastigotes en el pellet. Después de ser lavados tres veces con 10 ml de medio, los amastigotes se contaron utilizando una cámara de Neubauer, se sembraron en botellas de cultivo de 25 cm^2 a una densidad de 5×10^5 amastigotes/ml en un volumen final de 10 ml de medio y se cultivaron axénicamente a 33°C. Los parásitos se subcultivaron cada 7 días y en los experimentos sólo se utilizaron cultivos que no excedieran un máximo de 5 pases por aislado. Para preservar la virulencia de los aislados, los amastigotes cultivados de forma axénica

se inocularon periódicamente en el cojinete plantar de ratones BALB/c (hembras de 8-10 semanas de edad).

5.2.3. Cepas de referencia de *Leishmania mexicana* y *Leishmania major*

Las cepas de referencia MNYC/BZ/62/M379 y MHOM/IL/80/Friedlin de *L. mexicana* y *L. major*, respectivamente, se emplearon como controles en algunos de los experimentos. Ambas fueron donadas por el Profesor Paul A. Bates de la Universidad de Lancaster, Reino Unido. La cepa MHOM/IL/80/Friedlin fue cultivada en el estadio de promastigote, mientras que la cepa MNYC/BZ/62/M379 fue cultivada en el estadio de amastigote.

5.3. Identificación molecular a nivel de especie de los aislados de *Leishmania* mediante la técnica de PCR-RFLP del ITS1

Los aislados de *Leishmania* obtenidos de pacientes con LCL y LCD fueron identificados a nivel de especie como *Leishmania mexicana* mediante el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) en la secuencia génica del espaciador interno transcrito 1 (ITS1; la secuencia de DNA que separa los genes que codifican para el rRNA [RNA ribosomal] que conforma la subunidad menor [SSU] de los ribosomas y para el rRNA 5.8S que conforma la subunidad mayor [LSU] de los ribosomas) de *Leishmania*, amplificada a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente digerida con una enzima de restricción. Dicho procedimiento se realizó siguiendo la metodología reportada por Schonian y cols. (141), con algunas modificaciones menores. Un

total de 1×10^8 de amastigotes axénicos de *L. mexicana* o promastigotes de *L. major* se lavaron tres veces con PBS, se resuspendieron en amortiguador de lisis (50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1% SDS, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 µg/ml de proteinasa K) y se incubaron a 60°C durante 12 h. Finalizado el tiempo de incubación, el DNA se aisló de los lisados mediante extracciones con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, siguiendo protocolos estándares. Una vez aislado, el DNA se empleó como templado para la amplificación del ITS1 de *Leishmania* por PCR, empleando los primers LITSR (5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3') y L5.8S (5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3'). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 50 µl constituido por amortiguador *Phusion HF* 1×, 0.5 µM de cada primer (LITSR y L5.8S), 200 µM de una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's), 1 U de DNA polimerasa *Phusion HF* (todos adquiridos de New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) y 1 µg de DNA de *Leishmania*. Las condiciones de termociclado empleadas consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificación: 94°C durante 40 s (desnaturalización), 53°C durante 30 s (anillamiento) y 72°C durante 60 s (extensión), y un paso final de extensión a 72°C durante 7 min. Los productos de PCR obtenidos de la amplificación del ITS de *Leishmania* se corrieron y se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Para llevar a cabo el análisis por RFLP, 10 µl de los productos de PCR se digirieron con la enzima BsuRI ([HaeIII], Thermo Fisher Scientific),

siguiendo las instrucciones del fabricante, y los fragmentos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio.

5.4. Evaluación del curso de la infección en los ratones

Se inocularon ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 (en el cojinete plantar derecho trasero, por vía subcutánea) con 5×10^6 amastigotes de *L. mexicana* o 5×10^6 promastigotes de *L. major*, respectivamente. Para realizar la inoculación, ambos estadios de *Leishmania* se cosecharon en la fase estacionaria de cultivo, se lavaron tres veces con PBS y se contabilizaron empleando una cámara de Neubauer. La evaluación del curso de la infección en los ratones se monitoreó cada semana midiendo el incremento en el grosor del cojinete plantar de la pata infectada, utilizando un vernier digital (modelo DTG-001; iGaging, San Clemente, CA, USA). Dicho incremento se calculó restándole el valor de grosor del cojinete de la pata colateral no inoculada al valor del grosor del cojinete de la pata infectada.

5.5. Determinación de la carga parasitaria en las lesiones de los cojinetes plantares y en los ganglios linfáticos popliteales de los ratones infectados

La carga parasitaria se determinó mediante el conteo directo de los amastigotes presentes en homogenados preparados a partir de las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares y en los ganglios linfáticos popliteales de los ratones infectados (140, 142). Para lo anterior, una vez que se sacrificó a los ratones, se extirparon las patas infectadas y los ganglios popliteales, y se maceraron en PBS

presionándolos con el émbolo de una jeringa de 10 ml sobre una malla de nylon con un poro de 100 μm (Falcon, Corning) acoplada a un tubo cónico de 50 ml, lográndose así la disgregación del tejido y la lisis mecánica de las células infectadas. El homogenado resultante del proceso anterior se pasó cinco veces a través de una aguja de 25 G acoplada a una jeringa de 10 ml para asegurar la liberación de los amastigotes de las células infectadas que no se lisaron en el procedimiento anterior y para disgregar los cúmulos que tiende a formar este estadio del parásito. Finalmente, los amastigotes presentes en los homogenados se contabilizaron empleando una cámara de Neubauer.

5.6. Western blot

Los cojinetes plantares de los ratones infectados fueron removidos y homogenizados en una solución amortiguadora compuesta por 0.1% de Tritón X-100 en Tris-HCl 25 mM (pH 7.4), suplementada con un coctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Los homogenados obtenidos se clarificaron centrifugándolos a $12,000 \times g$ durante 15 min a 4°C y la cantidad de proteína presente en los mismos se cuantificó mediante el método del ácido biciconínico (BCA), utilizando un kit comercial (Novagen-Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Se mezclaron 20 μg de proteína de los homogenados con amortiguador de carga Laemmli, se hirvieron durante 5 min y se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS). Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron (100 V durante 60 min) a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF)

(Immobilon-P; Millipore-Merck KGaA) utilizando una cámara de transferencia en húmedo (Mini Trans-Blot Cell apparatus; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Una vez concluida la transferencia, las membranas se bloquearon durante 30 min a temperatura ambiente con una solución al 10% (w/v) de leche descremada (Bio-Rad Laboratories) en TBST (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20). A continuación, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios (diluidos en solución al 10% de leche descremada en TBST): anti-arginasa-1, monoclonal producido en ratón (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA [dilución 1:50,000]); anti-NOS2, policlonal producido en conejo (GeneTex, Inc., Irvine, CA, USA [dilución 1:10,000]) y anti-YM1, policlonal producido en conejo (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada [dilución 1:10,000]). Al día siguiente, las membranas se lavaron con TBST (3 veces durante 5 min) y después se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (diluidos en solución al 10% de leche descremada en TBST): anti-IgG de ratón, producido en caballo y anti-IgG de conejo, producido en cabra (ambos adquiridos de Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA [anti-IgG de ratón, dilución 1:50,000; y anti-IgG de conejo, dilución 1:10,000]). Finalizada la incubación con los anticuerpos secundarios, las membranas se lavaron con TBST (3 veces durante 10 min), se revelaron con un sustrato quimiolumincente para HRP (Millipore-Merck KGaA) y se expusieron a películas de rayos X (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Como control de carga, se utilizó una tinción de las

membranas con azul de Coomassie para comparar los niveles de expresión de las proteínas. Los análisis densitométricos de las bandas obtenidas para las proteínas se realizaron utilizando el *software ImageJ (Image Analysis Processing in Java rings; NIH, Bethesda, MD, USA)*.

La presencia proteínica de una arginasa y de una óxido nítrico sintasa propias de *L. mexicana* fue evaluada también en los amastigotes presentes en las lesiones de los ratones infectados. Para este propósito, los amastigotes (libres de restos celulares) se aislaron de las lesiones siguiendo el protocolo descrito por Hart y cols (143) y se lisaron en la misma solución amortiguadora empleada para obtener los homogenados de las lesiones de los ratones. A partir de los lisados obtenidos, 20 µg de proteína se analizaron por ensayos de Western blot, siguiendo los procedimientos descritos en el párrafo anterior. Para detectar la presencia de la arginasa en los lisados de los amastigotes, se utilizó un anticuerpo primario policlonal anti-arginasa-1 producido en conejo (GeneTex Inc. [dilución 1:5,000]), mientras que para detectar la presencia de la óxido nítrico sintasa, se utilizó un anticuerpo primario monoclonal anti-NOS2 y un anticuerpo primario monoclonal anti-NOS1, ambos producidos en ratón (Santa Cruz Biotechnology, Inc. [dilución 1:100]), y un anticuerpo policlonal anti-NOS2 producido en conejo (GeneTex Inc. [dilución 1:100]). En este caso, como control de carga, se utilizó una tinción de las membranas con tinta india.

Adicionalmente, en ensayos realizados *in vitro*, la presencia proteínica de la Arg-1 y de la NOS2 se analizó en macrófagos diferenciados a partir de células

precursoras existentes en la médula ósea de ratón (BMM Φ , por sus siglas en inglés) tratados bajo diferentes condiciones que se mencionan más adelante. Para este fin, los macrófagos se lisaron en amortiguador RIPA (25 mM Tris-HCl [pH 7.6], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS) para obtener extractos totales de las células, de los cuales 20 μ g de proteína se analizaron por ensayos de Western blot, siguiendo la metodología ya descrita. Para detectar la presencia de la Arg-1 y de la NOS2 en los lisados de los macrófagos se utilizó el anticuerpo primario monoclonal anti-arginasa-1 producido en ratón (dilución 1:10,000) y el anticuerpo primario policlonal anti-NOS2 producido en conejo (dilución 1:1,000), respectivamente. Como control de carga, se detectó la presencia de la actina o de la β -tubulina, utilizando un anticuerpo primario policlonal anti-actina producido en conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc. [dilución 1:10,000]) y un anticuerpo primario monoclonal anti- β -tubulina producido en ratón (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., [dilución 1:5,000]), respectivamente.

5.7. Determinación de la actividad enzimática de arginasa

La actividad enzimática de arginasa se determinó en las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares de los ratones infectados, cuantificando la cantidad de urea generada a partir de la hidrólisis de la L-arginina, de acuerdo con metodologías reportadas previamente (98, 144), con algunas modificaciones. Para dicho fin, los cojinetes plantares fueron removidos y homogenizados en una solución amortiguadora compuesta por 0.1% de Tritón X-100 en Tris-HCl 25 mM (pH 7.4), suplementada con un coctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA.

Los homogenados obtenidos se clarificaron por centrifugación a $12,000 \times g$ durante 15 min a 4°C y la cantidad de proteína presente en los mismos se cuantificó mediante el método del ácido biciconínico (BCA). Un volumen de 1-5 μl de los homogenados se diluyó a un volumen final de 50 μl con una solución amortiguadora de reacción para actividad de arginasa (25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 0.1% Tritón X-100, 10 mM MnCl_2) y se incubó a 56°C durante 10 min para lograr la activación de la enzima. A continuación, a cada muestra se le agregó un volumen 50 μl de L-arginina (0.5 M, pH 9.7) y se permitió la hidrólisis de este sustrato durante 15 min a 37°C . Concluido este tiempo, la reacción se detuvo adicionando 400 μl de una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ (1:3:7 [v/v]). La urea producida a partir de la hidrólisis de la L-arginina se detectó según el método colorimétrico de Archibald, para el cual se adicionaron a las muestras 20 μl de una solución al 9% de α -isonitrosopropiofenona (diluida en etanol absoluto) y se incubaron a 100°C durante 30 min. La absorbancia de las muestras se cuantificó a 550 nm y la concentración de urea producida se determinó empleando una curva estándar preparada con cantidades conocidas de urea. La actividad de arginasa se reportó como unidades por mg de tejido o unidades por mg de proteína, definiéndose una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 μmol de urea por minuto.

La actividad enzimática de arginasa se determinó también en los lisados de amastigotes purificados de lesiones de ratones infectados con *L. mexicana* y en los lisados de macrófagos diferenciados a partir de células precursoras existentes

en la médula ósea de ratón (BMMΦ) tratados bajo diferentes condiciones que se mencionan más adelante. Para lo anterior, los amastigotes y los macrófagos se lisaron en la misma solución amortiguadora empleada para obtener los homogenados de las lesiones y la determinación de la actividad se llevó a cabo empleando el mismo método descrito en el párrafo anterior, con la excepción de que el tiempo de hidrólisis de la L-arginina se incrementó a 120 min para los lisados de los amastigotes y a 30 min para los lisados de los macrófagos.

5.8. Cuantificación de citocinas por ELISA

Los niveles de citocinas presentes en los ganglios linfáticos popliteales y en las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares de los ratones infectados con los diferentes aislados de *L. mexicana* se cuantificaron empleando la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) tipo sándwich. Para lo anterior, se prepararon homogenados de ambos tejidos, tal y como se describió en secciones anteriores, y los niveles de IL-4, IL-10 e IFN- γ presentes en estos se cuantificaron utilizando kits específicos para la detección de cada citocina: IL-4 e IL-10 (BioLegend, San Diego, CA, USA) e IFN- γ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

5.9. Inmunohistoquímica

Los cojinetes plantares de los ratones infectados y las biopsias (de 4-6 mm de diámetro) obtenidas de pacientes con LCL y LCD se fijaron durante 24 h en una

solución de formalina al 10% en solución amortiguadora neutra de fosfatos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Concluido el tiempo de fijación, los tejidos se procesaron empleando protocolos estándares para ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 3 μm de espesor de cada tejido, se montaron en portaobjetos cargados positivamente (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente se desparafinaron y rehidrataron, según metodologías histológicas de rutina. Para recuperar la pérdida de antigenicidad en los tejidos, se llevó a cabo el proceso de reactivación antigénica mediante la incubación de los cortes histológicos con una solución amortiguadora de citrato de sodio (10 mM, pH 6) durante 20 min a 95°C o mediante la incubación con proteinasa K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en solución amortiguadora compuesta por Tris-EDTA [TE], pH8) durante 10 min a temperatura ambiente. Una vez lavados con agua corriente (3 veces durante 3 min), los cortes se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en TBS (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl) para inhibir la actividad de las peroxidasas endógenas. Posteriormente, los cortes se lavaron con TBS (3 veces durante 3 min) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con una solución compuesta por 10% de suero normal del animal en el cual se produjo el anticuerpo secundario y 1% de albúmina sérica bovina (BSA), ambos diluidos en TBST (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20), para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos al tejido. A continuación, se eliminó la solución de bloqueo y los cortes se incubaron a 4°C durante toda la noche con los siguientes anticuerpos primarios (diluidos en una solución de BSA al 1% en TBST):

anti-arginasa-1, policlonal producido en conejo, dilución 1:500; anti-NOS2, policlonal producido en conejo, dilución 1:100; anti-F4/80, policlonal producido en rata, dilución 1:50 (los tres adquiridos de GeneTex, Inc.); anti-YM1, policlonal producido en conejo, dilución 1:200 (STEMCELL Technologies) y anti-CD68, monoclonal producido en ratón (Abcam, Cambridge, UK [prediluido]). Al día siguiente, los cortes se lavaron con TBST (3 veces durante 5 min) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP y producidos en cabra (diluidos en una solución de BSA al 1% en TBST): anti-IgG de conejo, dilución 1:500 (Sigma-Aldrich); anti-IgG de rata, dilución 1:100 y anti-IgG de ratón, dilución 1:500 (ambos adquiridos de Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA). Concluido el tiempo de incubación, los cortes se lavaron con TBST (3 veces durante 5 min) y se incubaron con 3,3' diaminobencidina (DAB) (Sigma-Aldrich) como sustrato para la HRP y visualizar así la inmunodetección. Finalmente, los cortes se contratiñeron con hematoxilina de Gill, se deshidrataron, se aclararon y se montaron en resina sintética. Las preparaciones se observaron con un microscopio de campo claro (*Microphot-FXA microscope*; Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) y se adquirieron imágenes de éstas utilizando una cámara digital Nikon DXM1200F y el *software ACT-1* (Nikon Instruments Inc.).

5.10. Obtención de células de médula ósea de ratón

Se sacrificaron ratones BALB/c (hembras de 8-10 semanas de edad) por dislocación cervical y se bañaron con etanol al 70% para desinfectar la piel.

Utilizando pinzas y tijeras de disección, se retiró la piel que recubre las extremidades posteriores (fémures y tibias), las cuales fueron extirpadas y colocadas en una caja de Petri bacteriológica de 60 mm conteniendo una solución desinfectante compuesta por PBS suplementado con 200 U/ml de penicilina G y 200 μ g de estreptomicina (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). A continuación, la mayor parte de músculo que recubre los fémures y la tibias se retiró utilizando unas tijeras y una navaja de bisturí, mientras que el tejido restante adherido a los huesos se removió con una gasa estéril. Una vez libres de tejido, los huesos se sumergieron en etanol al 75% durante 3 min para desinfectarlos y, transcurrido este tiempo, se transfirieron a una caja de Petri nueva, donde se lavaron 3 veces con PBS. Posteriormente, en una campana de flujo laminar para cultivo celular, las epífisis de cada hueso se cortaron con una navaja de bisturí y la médula ósea de cada fémur y tibia se expulsó al interior de un tubo cónico de 50 ml mediante irrigaciones con PBS dispensado con una jeringa de 10 ml acoplada a una aguja de 25G. La médula extraída se centrifugó a 300 \times g durante 10 min a temperatura ambiente y el pellet resultante se resuspendió en PBS hasta lograr una suspensión homogénea de células. Después de realizar un lavado con PBS, las células presentes en la médula ósea (entre las que se encuentran diferentes células progenitoras hematopoyéticas) se contaron en una cámara de Neubauer, excluyendo a los eritrocitos (por forma y tamaño) y a las células muertas (utilizando azul tripán). Mediante este procedimiento se obtuvieron regularmente 40-60 \times 10⁶

células a partir de la médula ósea extraída de las dos tibias y los dos fémures de cada ratón.

5.11. Cultivo de macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMM Φ)

Los macrófagos se diferenciaron a partir de células progenitoras existentes en la médula ósea (BMM Φ) de ratón que fueron cultivadas en presencia del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), según metodologías reportadas previamente (145, 146), con algunas modificaciones. Para este procedimiento, 5×10^5 células totales de médula ósea/ml se sembraron en cajas de Petri bacteriológicas en un volumen final de 10 ml de medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) y 20% del sobrenadante de cultivo de la línea celular de fibroblastos murinos L-929 (LCCM) (ATCC, Manassas, VA, USA), como fuente de M-CSF murino. Los cultivos se alimentaron en el día 4 adicionando 10 ml de medio suplementado. Finalmente, en el día 7 de cultivo, los BMM Φ se despegaron de las cajas Petri mediante la incubación de las células con una solución de EDTA 5mM (en PBS) durante 10 min a 37°C.

5.12. Activación clásica (CAM Φ) y alternativa (AAM Φ) de los BMM Φ e infección con amastigotes de *Leishmania mexicana*

Los BMM Φ se sembraron en medio DMEM/F12 suplementado como se indica en el apartado anterior, pero sin la adición de M-CSF, y se dejaron reposar toda la

noche. Bajo estas condiciones, los macrófagos dejan de proliferar y quedan arrestados en la fase G₀ del ciclo celular. Al día siguiente, después de realizar un cambio de medio, los BMMΦ se estimularon con 500 U/ml de TNF-α + 100 U/ml de IFN-γ (PeproTech, Rock Hill, NJ, USA) para inducir la activación clásica (CAMΦ) o con 20 U/ml de IL-4 (PeproTech) para inducir la activación alternativa (AAMΦ) de los mismos. Para evaluar el efecto de *Leishmania mexicana* en el metabolismo de la L-arginina a través de la NOS2 y de la Arg-1 en los CAMΦ y en los AAMΦ, el estímulo de los BMMΦ con TNF-α + IFN-γ o con IL-4 se inició 4 h antes de ser infectados con los amastigotes de *Leishmania mexicana* (en una relación 5:1 parásitos/célula). Una vez que los parásitos se adicionaron a los macrófagos, estos últimos se incubaron a 33°C, temperatura consistente con la detectada en las lesiones cutáneas generadas a causa de la infección por *Leishmania* (147), durante 48-72 h, dependiendo de cada experimento.

5.13. Caracterización por citometría de flujo de los BMMΦ, CAMΦ y AAMΦ

Los macrófagos diferenciados a partir de células progenitoras existentes en la médula ósea de ratón (BMMΦ) se caracterizaron fenotípicamente analizando por citometría de flujo la expresión de los marcadores F4/80 y CD11b. En cuanto a los macrófagos activados de forma clásica (CAMΦ) y activados de forma alternativa (AAMΦ), estos se caracterizaron evaluando los cambios en la expresión del receptor de manosa (CD206). Para lo anterior, 5 x 10⁵ BMMΦ se mantuvieron sin estimular, o se estimularon durante 48 h con TNF-α + IFN-γ o IL-4 para inducir en estos una activación clásica o alternativa, respectivamente. Concluido el tiempo de

estímulo, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron en 500 µl de solución bloqueadora (PBS suplementado con 2% de suero de caballo y 5 mM de EDTA) durante 15 min a 4°C. Después de realizarles un lavado con la misma solución, las células se tiñeron durante 30 min a 4°C con los anticuerpos de interés diluidos 1:200 en solución bloqueadora. Para dichas tinciones, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-F4/80 conjugado con PE, anti-CD11b conjugado con FITC y anti-CD206 conjugado con FITC (todos adquiridos de BioLegend, San Diego, CA, USA). Finalizado el tiempo de incubación con el anticuerpo, las células se lavaron 3 veces con PBS, se resuspendieron en 500 µl de PBS y se analizaron en un citómetro *FACSCalibur* (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), utilizando el *software CellQuest* (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

5.14. Cuantificación de nitritos utilizando el reactivo de Griess

La actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (NOS2) se evaluó cuantificando la concentración de nitritos (metabolitos estables del óxido nítrico) presentes en los sobrenadantes de cultivo de los macrófagos, utilizando la reacción de Griess (148, 149). Para lo anterior, se mezclaron volúmenes iguales de los sobrenadantes de cultivo de las células y del reactivo de Griess (constituido por una mezcla en proporciones iguales [vol/vol] de naftil-etilendiamina dihidroclorada al 0.1% [diluida en agua] y sulfanilamida al 1.0% [diluida en H₃PO₄ al 5%]) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se cuantificó a 540 nm en un espectrofotómetro y la concentración de nitritos se determinó empleando una curva estándar preparada con nitrito de sodio (NaNO₂).

5.15. Análisis estadístico

Los datos se reportaron como las medias \pm los errores estándares de las medias (SMEs) o las desviaciones estándares (SDs) de los valores obtenidos, y se analizaron empleando el *software GraphPad Prism 6.0* (*GraphPad software, Inc.*, La Jolla CA, USA). Las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales se evaluaron mediante pruebas de *t* de Student, cuando se compararon dos grupos, y mediante análisis de varianza (ANOVAs) de una vía, seguidos de pruebas *post-hoc* de Bonferroni, cuando se compararon múltiples grupos. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas con un valor de $P \leq 0.05$.

VI. RESULTADOS

6.1. Caracterización molecular y morfológica de los aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD

En el presente estudio se utilizaron dos aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes mexicanos con leishmaniasis cutánea: uno de ellos proveniente de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y el otro proveniente de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa (LCD) (Tabla 1).

TABLA 1. Datos clínicos de los pacientes a partir de los cuales se obtuvieron los aislados de *Leishmania mexicana*

Patología	Sexo	Edad al inicio de la enfermedad (años)	Duración de la enfermedad (meses)	No. de nódulos	No. de úlceras	Tratamiento
LCL	H	28	1	0	1	Ninguno
LCD	M	6	360	> 300	0	Intermitente ^a

^aEl paciente había recibido intermitentemente antimoniato de meglumina (vía intramuscular, a una dosis diaria de 20 mg/kg de peso) como tratamiento durante diferentes periodos a lo largo del curso de la enfermedad. Cuando el aislado se obtuvo, el paciente se encontraba en una recaída de la enfermedad y no estaba recibiendo tratamiento.

Ambos aislados se identificaron molecularmente a nivel de especie como *L. mexicana* mediante el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) generados a partir de la digestión enzimática de la secuencia génica, amplificada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), del espaciador interno transcrito 1 (ITS1) de *Leishmania* (Fig. 14A y B). Se ha demostrado que la región del ITS1 (secuencia de DNA que separa los genes que codifican para el RNA ribosomal [rRNA] de la subunidad menor y para el rRNA 5.8S de la subunidad mayor de los ribosomas) es altamente variable, en el número y la

secuencia de nucleótidos, entre diferentes especies de *Leishmania* y el análisis por PCR-RFLP de esta región permite la identificación de la mayoría de las especies de *Leishmania* de importancia médica (141). La amplificación mediante la PCR del ITS1 de los dos aislados de *L. mexicana* obtenidos de los pacientes, así como de una cepa de referencia de *L. mexicana* (control positivo) y de una cepa de *Leishmania major* (control de especie no relacionada) resultó en productos de 300-350 pares de bases (Fig. 14A), tamaño reportado para el ITS1 del género *Leishmania* (141). Posteriormente, la digestión de dichos amplicones del ITS1 con la enzima de restricción HAEIII dio como resultado patrones diferentes de RFLP para las especies *L. mexicana* y *L. major* (Fig. 14B). Para los dos aislados de *L. mexicana* obtenidos de los pacientes, así como para la cepa de referencia de esta especie, el patrón de RFLP obtenido mostró tres fragmentos de 188, 88 y 60 pares de bases cada uno, el cual se ha reportado como característico para identificar a la especie *L. mexicana* (141). En contraste, para la cepa de *L. major* se obtuvo un patrón de RFLP con dos fragmentos de 220 y 130 pares de bases cada uno, el cual se ha reportado como característico para identificar a la especie de *L. major* (150) (Fig. 14B).

Para ser utilizados en los diferentes experimentos, los aislados de *L. mexicana* se cultivaron axénicamente y se utilizaron como amastigotes, ya que cuando el parásito *Leishmania* se mantiene en cultivo, este estadio resulta más infectivo al inocular experimentalmente a ratones que el estadio de promastigote en la fase estacionaria de cultivo (140). Interesantemente, durante el cultivo *in vitro* de ambos

aislados notamos que estos presentaban diferentes patrones de crecimiento. Entre estos, la diferencia más notable se apreció en el contacto que mantenían los amastigotes (célula a célula) durante su crecimiento (Fig. 14C y D). Los amastigotes del aislado obtenido del paciente con LCL crecieron principalmente

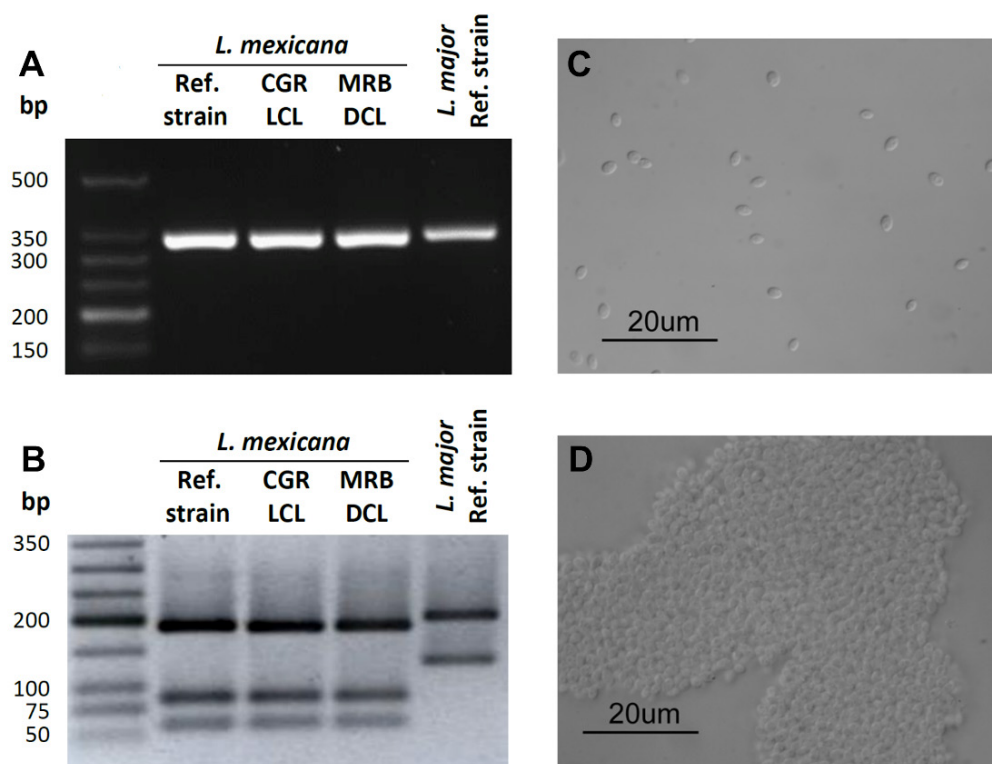


Fig. 14. Caracterización de los aislados de *Leishmania mexicana*. Dos aislados de *L. mexicana* se obtuvieron de pacientes mexicanos: uno a partir de un paciente con LCL y el otro a partir de un paciente con LCD. Los aislados se adaptaron al cultivo *in vitro* y se mantuvieron como amastigotes axénicos. El DNA de los parásitos se extrajo empleando fenol:cloroformo y se utilizó para la identificación de los aislados a nivel de especie como *L. mexicana* mediante el análisis por PCR-RFLP del ITS1 de *Leishmania*. Como controles, se utilizaron amastigotes de *L. mexicana* y promastigotes de *L. major* de cepas de referencia. (A) El ITS1 de *Leishmania* se amplificó por PCR y los amplicones obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. (B) Los amplicones obtenidos por PCR del ITS1 se digirieron con la enzima de restricción HaeIII y los fragmentos resultantes en patrones de RFLP se visualizaron en geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio. Micrografías que muestran los patrones de crecimiento de los amastigotes cultivados de forma axénica de los aislados de *L. mexicana* obtenidos de un paciente con LCL (C) y de un paciente con LCD (D). Barras, 20 μ m.

como células individuales (Fig. 14C), mientras que los amastigotes del aislado obtenido del paciente con LCD crecieron principalmente formando agregados grandes y compactos (Fig. 14D). Importantemente, estas diferencias se mantuvieron aun cuando los aislados se inocularon periódicamente en ratones para preservar su virulencia.

6.2. Los ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD exhiben lesiones con tamaño y carga parasitaria distinta, así como una migración diferencial de los parásitos a los ganglios linfáticos que las drenan

Una vez que los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD se caracterizaron a nivel molecular y morfológico, analizamos si estos generaban infecciones con diferentes características en un modelo de leishmaniasis cutánea murina. Como una primera aproximación para dicho análisis, se inocularon ratones BALB/c —cepa murina que ha mostrado ser altamente susceptible a la infección con *L. mexicana* (151-153)— en el cojinete plantar con ambos aislados y las lesiones desarrolladas se midieron cada 7 días durante un periodo de 4 semanas, seguido por una medición final realizada a las 8 semanas postinfección (Fig. 15A). Encontramos que las lesiones en los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD se hicieron evidentes durante la primera semana de infección, mientras que las lesiones en los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL aparecieron durante la segunda semana de infección (Fig. 15A).

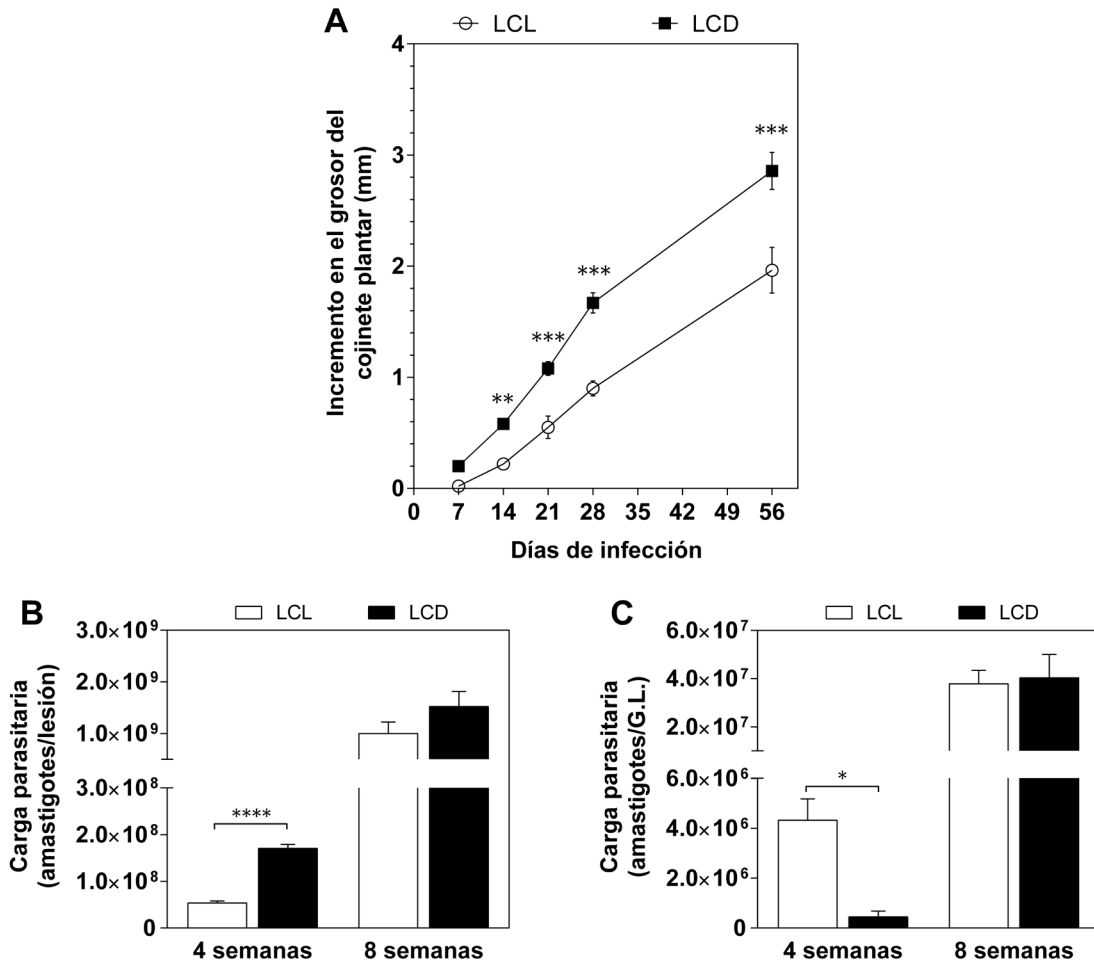


Fig. 15. Los ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD exhiben lesiones con tamaño y carga parasitaria distinta, así como una migración diferencial de los parásitos a los ganglios linfáticos que las drenan. Se infectaron subcutáneamente ratones BALB/c en los cojinetes plantares traseros derechos con 5×10^6 amastigotes axénicos de los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD. (A) El curso del desarrollo de las lesiones (diez ratones por grupo) se monitoreó cada 7 días durante un periodo de 4 semanas, seguido por una evaluación final realizada a las 8 semanas postinfección, midiendo el incremento en el tamaño de los cojinetes plantares. Trascorridas 4 y 8 semanas de infección, las cargas parasitarias se determinaron en los homogenados de las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares (B) y de los ganglios linfáticos popliteales (C) de los ratones (cuatro ratones por grupo). Los datos se expresan como las medias \pm los errores estándares de las medias (SMEs) de los valores obtenidos y son representativos de al menos dos experimentos independientes. G.L., ganglio linfático; *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$.

A partir de la segunda y hasta la octava semana de infección, los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD desarrollaron lesiones de

mayor tamaño que las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL (Fig. 15A). Adicionalmente, el número de parásitos presentes en las lesiones de los ratones se cuantificó después de 4 y de 8 semanas de infección con ambos aislados de *L. mexicana*. Transcurridas 4 semanas de infección, se observó una mayor carga parasitaria (por lo menos tres veces más) en las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD que en las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL (Fig. 15B). Por otra parte, transcurridas 8 semanas de infección, las lesiones de ambos grupos de ratones presentaron cargas parasitarias mayores que las observadas a las 4 semanas de infección; sin embargo, el número de parásitos presentes en las lesiones de los dos grupos fue similar (Fig. 15B).

En los modelos murinos experimentales, la infección cutánea de ratones BALB/c con *L. mexicana* resulta en el desarrollo de lesiones progresivas que no curan y que se vuelven crónicas (151). Más aún, en formas progresivas de la leishmaniasis cutánea murina, la presencia del parásito se ha demostrado tanto en las lesiones de los ratones como en los ganglios linfáticos más cercanos que drenan a éstas (154). Dado lo anterior, evaluamos también la presencia y la abundancia de parásitos en los ganglios linfáticos popliteales de los ratones infectados durante 4 y 8 semanas con los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD (Fig. 15C). Transcurridas 4 semanas de infección, fue posible detectar la presencia de parásitos en los ganglios linfáticos popliteales de los ratones inoculados con cualquiera de los dos aislados y, sorprendentemente, los ganglios

de los ratones inoculados con el aislado obtenido del paciente con LCL presentaron una mayor carga parasitaria (casi 10 veces más) que los ganglios de los ratones inoculados con el aislado obtenido del paciente con LCD (Fig. 15C). En cambio, transcurridas 8 semanas de infección, los ganglios de ambos grupos de ratones presentaron cargas parasitarias mayores que las observadas a las 4 semanas de infección; no obstante, el número de parásitos entre los dos grupos fue similar (Fig. 15B).

Es importante destacar que las diferencias observadas claramente entre las cargas parasitarias de las lesiones y los ganglios linfáticos popliteales de los ratones infectados durante 4 semanas con uno u otro de los aislados de *L. mexicana* fueron probablemente enmascaradas a las 8 semanas de infección debido a la tendencia que tienen los ratones BALB/c a desarrollar lesiones crónicas ante la infección con *L. mexicana*.

6.3. La presencia proteínica de la Arg-1 y de la NOS2 se encuentra regulada diferencialmente en las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD

En modelos murinos *in vivo* de leishmaniasis se ha demostrado que la Arg-1 es inducida durante la infección con diferentes especies de *Leishmania* (54, 103, 108); más aún, la presencia de esta enzima en el sitio de infección se ha correlacionado con la proliferación del parásito y la progresión de la enfermedad (98, 99, 127). En contraparte, en el modelo murino de leishmaniasis a causa de la infección con *L. major*, la presencia de la NOS2 en el sitio de infección se ha

correlacionado con la eliminación del parásito y la resolución de la enfermedad (103, 106, 107). Dado lo anterior, analizamos en las lesiones de ratones BALB/c si la infección con el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCL y la infección con el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCD conllevaban a una síntesis proteínica diferencial de la Arg-1 y NOS2. Para dicho propósito, las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares de los ratones se disecaron y se homogenizaron transcurridas 4 y 8 semanas de infección y la presencia proteínica de la Arg-1 y de la NOS2 se analizó en los homogenados empleando la técnica de Western blot (Fig. 16A). Los ensayos demostraron que la infección con ambos aislados de *L. mexicana* indujo la síntesis proteínica de la Arg-1, detectándose mayores niveles de expresión de ésta (aproximadamente dos veces más) en las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD que en las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL (Fig. 16A y B). La presencia proteínica de la Arg-1 se visualizó en los ensayos de Western blot como dos bandas con pesos moleculares de 35 y 38 kilodaltones que corresponden a las dos subunidades que constituyen a los homotrímeros de la Arg-1 murina (155) (Fig. 16A). Con respecto al análisis de la presencia de la NOS2, interesantemente, esta proteína sólo se expresó, y en muy bajos niveles, en las lesiones de los ratones infectados por 4 semanas con el aislado obtenido del paciente con LCD (Fig. 16A). Como control positivo para el análisis por Western blot de la presencia de la NOS2 se utilizaron lesiones de ratones C57BL/6 infectados por 4 semanas con *L. major*, detectándose

en éstas una banda intensa, con un peso molecular de 130 kDa, correspondiente a una elevada expresión de dicha enzima (Fig. 16A).

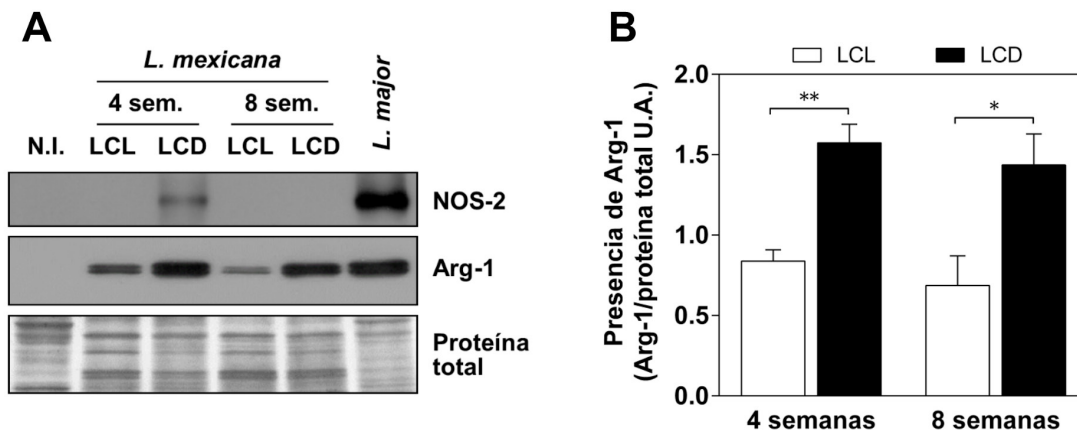


Fig. 16. La presencia proteínica de la Arg-1 y de la NOS2 se encuentra regulada diferencialmente en las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD. Se infectaron subcutáneamente ratones BALB/c (cuatro ratones por grupo) en los cojinetes plantares traseros derechos con 5×10^6 amastigotes axénicos de los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD. (A) Los niveles proteínicos de la Arg-1 y NOS2 se evaluaron por Western blot en los homogenados de las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares transcurridas 4 y 8 semanas de infección. Como control para la detección de la presencia proteínica de la NOS2, se utilizaron homogenados de lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares de ratones C57BL/6 infectados con *L. major*. Una tinción con azul de Coomassie de las proteínas totales presentes en la membrana se utilizó como control de carga. La imagen de Western blot que se presenta corresponde a la detección de la presencia proteínica de la Arg-1 y NOS-2 en un pool de los homogenados de las lesiones de los ratones pertenecientes a cada grupo. (B) Los valores densitométricos (expresados como unidades arbitrarias [U.A.]) de la presencia proteínica de la Arg-1 se calcularon como el cociente entre las intensidades de las bandas detectadas para la Arg-1 y las proteínas totales en los homogenados de las lesiones de todos los ratones de cada grupo. Los datos se expresan como las medias \pm los errores estándares de las medias (SMEs) de los valores obtenidos y son representativos de al menos dos experimentos independientes. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$.

6.4. La actividad enzimática de la Arg-1 se encuentra regulada diferencialmente en las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD

Una vez que observamos que los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD indujeron de forma diferencial la síntesis proteínica de la

Arg-1 en el sitio de infección, evaluamos si dicha regulación a nivel de la síntesis proteínica se veía reflejada en la actividad de dicha enzima. Para cumplir este objetivo, se determinó la actividad de arginasa en los homogenados de las lesiones de los ratones infectados durante 4 y 8 semanas con los aislados obtenidos de los pacientes (Fig. 17). Para ambos tiempos de infección, los datos obtenidos revelaron mayores valores de actividad de arginasa —expresada ésta como unidades por miligramo de proteína (Fig. 17A) o como unidades por miligramo de tejido (Fig. 17B)— en las lesiones de los ratones infectados con el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCD que en las lesiones de los ratones infectados con el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCL. Interesantemente, aunque la actividad de arginasa en las lesiones de los ratones infectados con cada uno de los aislados disminuyó ligeramente a las 8 semanas de infección con respecto a los valores observados a las 4 semanas de infección, la actividad registrada en las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD fue siempre mayor que aquella registrada en las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL (Fig. 17). En lo que respecta a la actividad de la NOS2, aunque se logró detectar una mínima presencia de esta enzima en las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD, tratamos de determinar su actividad cuantificando los nitritos presentes en el tejido a través de la reacción de Griess; sin embargo, no nos fue posible detectar presencia alguna de éstos (datos no mostrados).

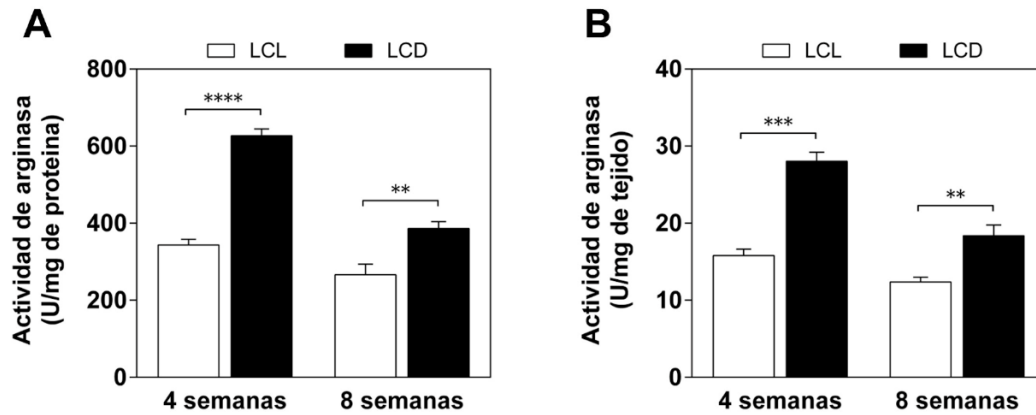


Fig. 17. La actividad enzimática de la Arg-1 se encuentra regulada diferencialmente en las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD. Se infectaron subcutáneamente ratones BALB/c (cuatro ratones por grupo) en los cojinetes plantares traseros derechos con 5×10^6 amastigotes axénicos de los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD. La actividad de la Arg-1, expresada como unidades por miligramo de proteína (A) o unidades por miligramo de tejido (B), se determinó por ensayos colorimétricos de actividad enzimática de arginasa realizados en los homogenados de las lesiones desarrolladas en los ratones infectados durante 4 y 8 semanas. Los datos se expresan como las medias \pm los errores estándares de las medias (SMEs) de los valores obtenidos y son representativos de al menos dos experimentos independientes. **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$.

6.5. Las lesiones y los ganglios linfáticos de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD presentan una producción similar de IL-4 e IL-10, pero una producción diferente de IFN- γ

En el modelo murino de infección con *L. major* se ha demostrado una resistencia o susceptibilidad a la enfermedad por parte del hospedero, dependiendo del desarrollo de una respuesta inmune polarizada hacia un tipo Th1 o Th2, respectivamente (156). En este contexto, la habilidad del hospedero para controlar la infección se ha asociado a la expansión de linfocitos T CD4⁺ Th1, los cuales producen IFN- γ . En contraste, la incapacidad del hospedero para controlar la

infección se ha asociado a la expansión de linfocitos T CD4⁺ Th2, los cuales producen IL-4, IL-10 e IL-13 (98, 156-158). Adicionalmente, se ha demostrado que la inducción de la Arg-1 en el hospedero mediada por la IL-4 y la IL-10 está claramente asociada con la susceptibilidad a la infección, ya que la presencia y actividad de esta enzima aumentan de forma paralela al desarrollo de la lesión y al incremento en la carga parasitaria (98, 103). En consecuencia, analizamos si los cambios que observamos en la inducción de la presencia proteínica de la Arg-1 y de su actividad en las lesiones y en los ganglios linfáticos de los ratones susceptibles BALB/c infectados los aislados de *L. mexicana* estaban relacionados con cambios en la producción de citocinas tipo Th1 y Th2 durante el curso de la infección. Para esta tarea, evaluamos por la técnica de ELISA la producción de IL-4, IL-10 e IFN- γ en los homogenados de las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares y de los ganglios linfáticos popliteales de los ratones infectados. No se observaron diferencias significativas en la producción de IL-4 e IL-10 entre las lesiones de los ratones infectados con cada uno de los aislados de *L. mexicana*, ya sea a las 4 u 8 semanas postinfección; sin embargo, los niveles de ambas citocinas aumentaron conforme la infección progresó (Fig. 18A y B). Cabe señalar que, al comparar las cantidades producidas de ambas citocinas, resultó evidente que los niveles de IL-10 fueron alrededor de 10 veces mayores que aquellos observados para la IL-4 (Fig. 18A y B). Con respecto a la producción de IL-4 e IL10 en los ganglios linfáticos popliteales, tampoco se observaron diferencias entre los ratones infectados durante 8 semanas con uno u otro de los dos aislados de *L.*

mexicana (Fig. 18A y B). En cuanto a la producción de IFN- γ , interesantemente, la infección durante 8 semanas con el aislado obtenido del paciente con LCD indujo una mayor producción de esta citocina en las lesiones y en los ganglios linfáticos popliteales de los ratones que la infección con el aislado obtenido del paciente con LCL (Fig. 18C). En contraparte, no se observaron diferencias en la producción de IFN- γ en las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares de los ratones infectados durante 4 semanas con cualquiera de los dos aislados (Fig. 18C).

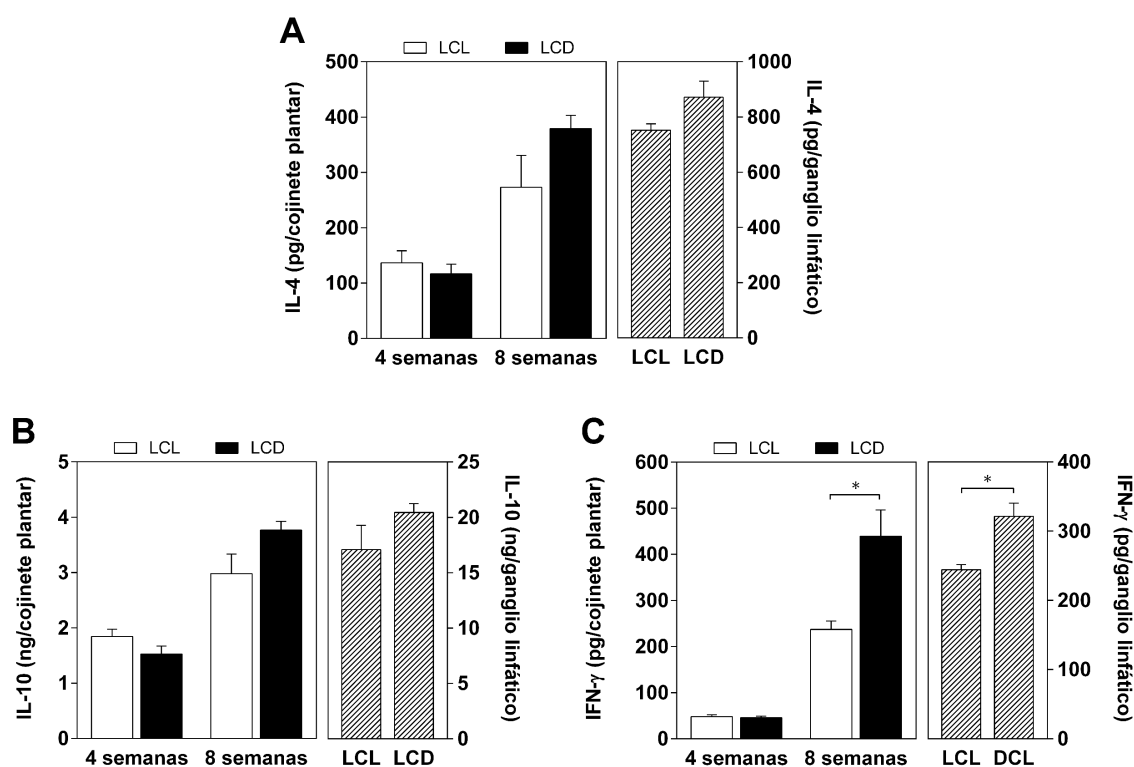


Fig. 18. Las lesiones y los ganglios linfáticos de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD presentan una producción similar de IL-4 e IL-10, pero una producción diferente de IFN- γ . Las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares de los ratones BALB/c infectados (cuatro ratones por grupo) con los aislados obtenidos de pacientes con LCL y LCD se removieron a las 4 y 8 semanas de infección, mientras que los ganglios linfáticos popliteales se removieron a las 8 semanas de infección. Se prepararon homogenados de los tejidos extirpados y los niveles presentes de IL-4 (A), IL-10 (B) e IFN- γ (C) se cuantificaron en estos empleando la técnica de ELISA. Los datos se expresan como las medias \pm los errores estándares de las medias (SMEs) de los valores obtenidos de tres experimentos independientes. *, $P \leq 0.05$.

6.6. Las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de paciente con LCL y LCD contienen macrófagos con un fenotipo de activación alternativa

La presencia de la Arg-1 se ha comprobado en diferentes tipos celulares tales como macrófagos, células dendríticas, células supresoras de origen mieloide y granulocitos, entre otros, y también se ha reportado que el estímulo con IL-4, IL-13 e IL-10 induce la expresión de esta enzima en dichas células mieloides (49, 50, 56). Entre éstas, los macrófagos son las principales células hospederas del parásito *Leishmania* y pueden albergar o eliminar a este parásito dependiendo de su estado de activación, el cual influencia el metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 y de la NOS2 (97, 98). Los macrófagos activados de forma clásica sobreexpresan a la NOS2, enzima que metaboliza a la L-arginina en óxido nítrico, un poderoso agente leishmanicida que media la eliminación de este parásito. En forma contraria, los macrófagos activados de forma alternativa sobreexpresan a la Arg-1, enzima que metaboliza a la L-arginina en poliaminas, moléculas policatiónicas que favorecen la persistencia y proliferación de *Leishmania* (97, 98). En consecuencia, una vez que evaluamos la presencia y la actividad de la Arg-1 y de la NOS2 en los homogenados de las lesiones de los ratones BALB/c infectados con los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD, decidimos identificar por inmunohistoquímica la presencia de ambas enzimas en las lesiones y si los macrófagos las expresaban. En las lesiones de los ratones infectados con cualquiera de los aislados de *L. mexicana* se detectó la presencia de abundantes

células expresando a la Arg-1 y albergando amastigotes de *Leishmania*, además de presentar una morfología característica de macrófagos (Fig. 19A). Adicionalmente, se demostró que estas células expresaban el marcador característico de macrófagos murinos F4/80 (Fig. 19B, se muestra una tinción representativa para F4/80 en un corte histológico de una lesión de un ratón infectado con el aislado obtenido del paciente con LCD). Interesantemente, en las lesiones de los ratones infectados con el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCD, los macrófagos mostraron una tinción para la Arg-1 más intensa y con mayor extensión en la célula, además de parecer mucho más parasitados, que los macrófagos presentes en las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL (Fig. 19A). El metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 y de la NOS2 constituye uno de los criterios más utilizados para identificar a los macrófagos murinos activados de forma alternativa y a los macrófagos activados de forma clásica, respectivamente (49, 58). Por lo tanto, la presencia de la Arg-1 en los macrófagos observados en las lesiones nos permitió sugerir un estado de activación alternativa en estos. Para corroborar esta idea, también evaluamos en las lesiones de los ratones infectados la presencia de otro marcador característico de los macrófagos activados de forma alternativa: la proteína tipo quitinasa y de secreción YM1 (159). En este contexto, primero detectamos por ensayos de Western blot la presencia de YM1 en los homogenados de las lesiones de los ratones infectados con uno u otro de los aislados de *L. mexicana* (Fig. 19D), y posteriormente, mediante ensayos de inmunohistoquímica,

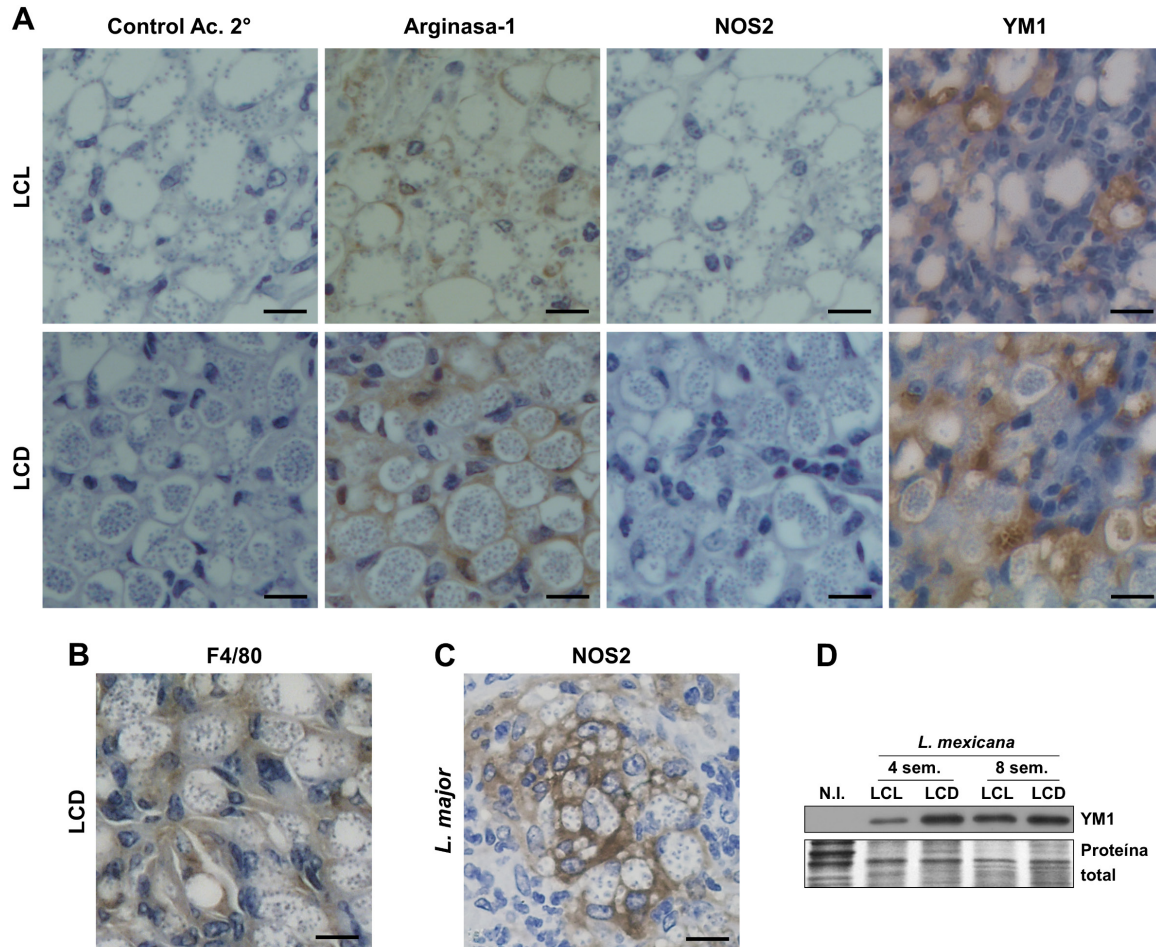


Fig. 19. Las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de paciente con LCL y LCD contienen macrófagos con un fenotipo de activación alternativa. Se infectaron subcutáneamente ratones BALB/c (tres ratones por grupo) en los cojinetes plantares derechos traseros con 5×10^6 amastigotes axénicos de los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD. Transcurridas 8 semanas de infección, las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares se disecaron y se procesaron para ensayos de inmunohistoquímica, tal y como se describió en la sección de material y métodos. (A) Los cortes histológicos de las lesiones se incubaron con anticuerpos primarios específicos para la detección de la arginasa-1, la NOS2 y YM1, para posteriormente ser incubados con un anticuerpo secundario conjugado a HRP (peroxidasa de rábano). El inmunomarcaje en el tejido se reveló con DAB (diaminobencidina) y a continuación los cortes se contratiñeron con hematoxilina de Gill. La incubación de los cortes sólo con el anticuerpo secundario se utilizó como control para la detección de tinción inespecífica. (B) La tinción de F4/80 en un corte de una lesión de un ratón infectado con el aislado de *L. mexicana* obtenido un paciente con LCD se muestra como representativa de las tinciones realizadas para la identificación de los macrófagos. (C) La tinción de la NOS2 en cortes de lesiones de ratones C57BL/6 infectados con 5×10^6 promastigotes de *L. major* se utilizó como control positivo para la detección de dicha enzima. (D) A las 4 y 8 semanas de infección, la presencia proteínica de YM1 se evaluó también por la técnica de Western blot en los homogenados de las lesiones de los ratones infectados con los aislados de *L. mexicana*. Una tinción con azul de Coomassie de las proteínas totales presentes en la membrana se utilizó como control de carga. Barras, 10 μ m. Las micrografías son representativas de los cortes histológicos de dos experimentos independientes.

podimos detectar directamente la presencia de esta proteína en los macrófagos intralesionales infectados y que además expresaban a la Arg-1 (Fig. 19A). Por otra parte, las inmunohistoquímicas realizadas para la detección de la NOS2 revelaron la ausencia de esta enzima en las lesiones de los ratones infectados con cualquiera de los dos aislados de *L. mexicana* (Fig. 19A). La detección por inmunohistoquímica de la NOS2 en las lesiones de ratones C57BL/6 infectados con *L. major* se empleó como control positivo en los experimentos (Fig. 19C).

6.7. Las lesiones de pacientes mexicanos con LCL y LCD contienen macrófagos con diferente expresión de Arg-1 y NOS2, y con distinta carga parasitaria

Una vez que se evaluó por inmunohistoquímica la presencia de la Arg-1 y de la NOS2 en los macrófagos presentes en las lesiones de los ratones infectados con los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD, decidimos realizar el mismo análisis en las lesiones de pacientes mexicanos con ambas formas clínicas a causa de la infección con *L. mexicana*. En las lesiones de los pacientes con ambas formas clínicas se pudo apreciar la presencia de células Arg-1 positivas, albergando amastigotes de *Leishmania* y con morfología característica de macrófagos (Fig. 20A). Adicionalmente, se demostró que estas células expresaban el marcador característico de macrófagos CD68 (Fig. 20B, se muestra una tinción representativa para CD68 en un corte histológico de una lesión de un paciente con LCD). Es de llamar la atención que en las lesiones de los pacientes con LCD encontramos macrófagos con una mayor expresión de la Arg-1 y más parasitados que los macrófagos presentes en las lesiones de los pacientes con

LCL (Fig. 20A). Con respecto a la detección de la NOS2, los ensayos de inmunohistoquímica revelaron la presencia discreta de esta enzima sólo en los macrófagos de las lesiones de los pacientes con LCL (Fig. 20A).

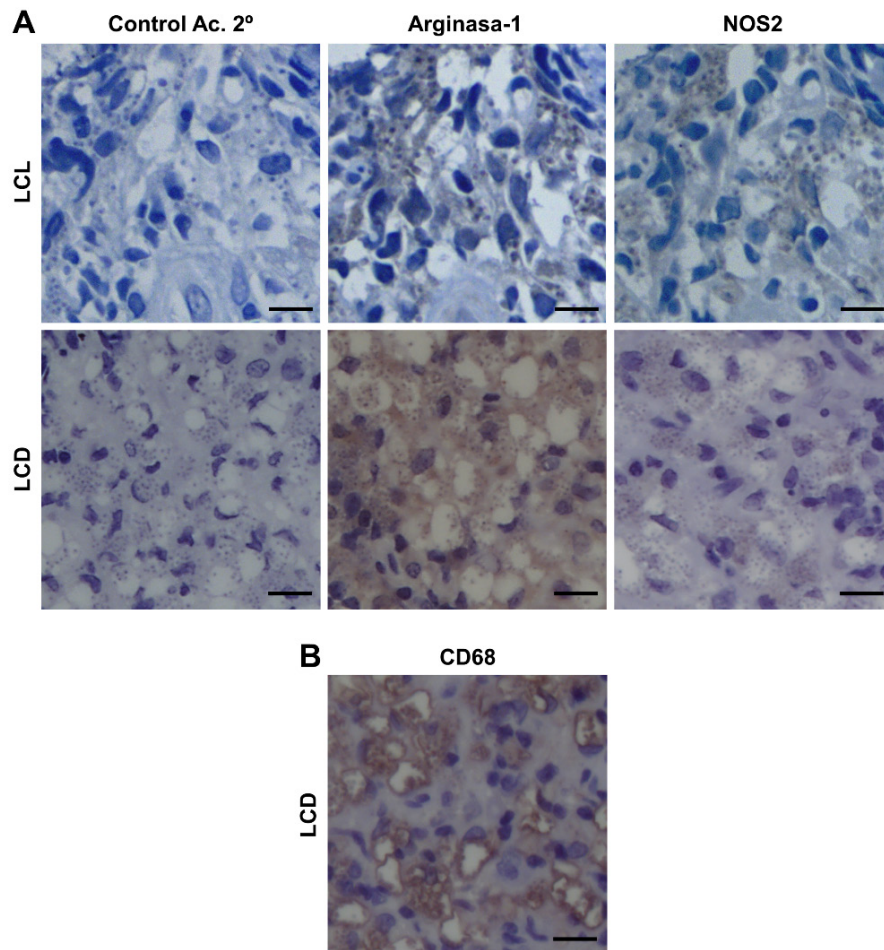


Fig. 20. Las lesiones de pacientes mexicanos con LCL y LCD contienen macrófagos con distinta expresión de la Arg-1 y de la NOS2, y con cargas parasitarias diferentes. Se tomaron biopsias de las lesiones de pacientes mexicanos con LCL y LCD, y se procesaron para ensayos de inmunohistoquímica, tal y como se describió en la sección de material y métodos. (A) Los cortes histológicos de las biopsias se incubaron con anticuerpos primarios específicos para la detección de la arginasa-1 y de la NOS2, para posteriormente ser incubados con un anticuerpo secundario conjugado a HRP (peroxidasa de rábano). El inmunomarcaje en el tejido se reveló con DAB (diaminobencidina) y a continuación los cortes se contratiñeron con hematoxilina de Gill. La incubación de los cortes sólo con el anticuerpo secundario se utilizó como control para la detección de tinción inespecífica. (B) La tinción de CD68 en un corte de una biopsia de un paciente con LCD se muestra como representativa de las tinciones realizadas para la identificación de los macrófagos. Barras, 10 μ m. Las micrografías son representativas de los cortes histológicos de las biopsias de dos pacientes con LCL y de tres pacientes con LCD.

6.8. Los amastigotes albergados en las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD exhiben distinta presencia proteínica y actividad enzimática de una arginasa propia de *Leishmania*

Dado el hecho de que los parásitos del género *Leishmania* expresan una arginasa y una óxido nítrico sintasa propias, mismas que han sido propuestas como factores de virulencia (80, 99, 116, 122, 124, 125, 127-129, 134, 135), decidimos analizar la presencia y funcionalidad de dichas enzimas en los amastigotes purificados directamente de las lesiones de ratones infectados con los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD. Mediante experimentos de Western blot, sólo nos fue posible detectar la presencia de una arginasa propia del parásito en los extractos de los amastigotes purificados de las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD (Fig. 21A). Los ensayos de actividad enzimática demostraron una mucho mayor actividad de arginasa (casi 20 veces más) en los extractos de los amastigotes purificados de las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD que en los extractos de los amastigotes purificados de las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL (Fig. 21B), aunque en estos últimos no se detectó la presencia proteínica de una arginasa propia de *Leishmania* en los ensayos de Western blot (Fig. 21A). Con respecto a una óxido nítrico sintasa propia de *Leishmania*, no se detectó ni la presencia proteínica (Fig. 21A) ni la actividad

(dato no mostrado) de esta enzima en los amastigotes purificados de las lesiones de los ratones infectados con cualquiera de los dos aislados de *L. mexicana*.

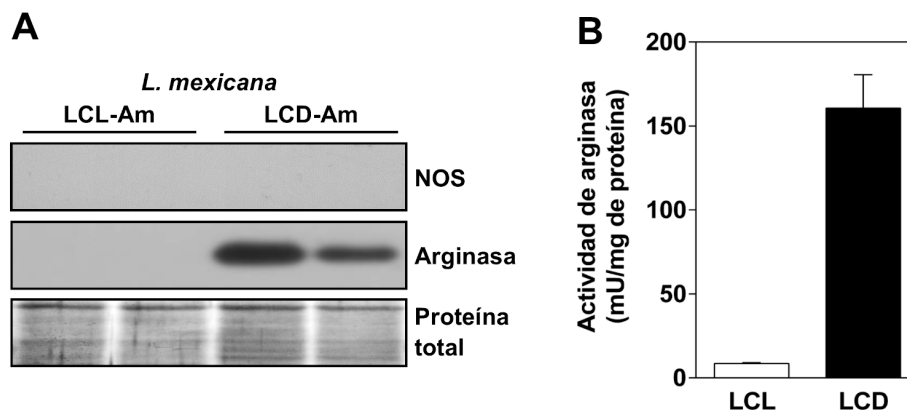


Fig. 21. Los amastigotes albergados en las lesiones de ratones susceptibles infectados con aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD exhiben distinta presencia proteínica y actividad enzimática de una arginasa propia de *Leishmania*. Se infectaron ratones BALB/c (tres ratones por grupo) subcutáneamente en los cojinetes plantares derechos traseros con 5×10^6 amastigotes axénicos de los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD. Transcurridas 8 semanas de infección, los amastigotes se aislaron de las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares de los ratones y se lisaron. (A) La presencia de una arginasa y de una NOS propias de *Leishmania* se analizó en los lisados de los amastigotes mediante la técnica de Western blot. Una tinción con tinta india de las proteínas totales presentes en la membrana se utilizó como control de carga. (B) La actividad de arginasa se analizó en los lisados de los amastigotes mediante ensayos enzimáticos y ésta se reportó como miliunidades (mU) por miligramo de proteína. Para la imagen de Western blot, se muestra el análisis de la presencia de la arginasa y de la NOS en los lisados de amastigotes obtenidos de dos ratones de cada grupo. Los datos se expresan como las medias \pm los errores estándares de las medias (SMEs) de los valores obtenidos y son representativos de al menos dos experimentos independientes.

6.9. Obtención y caracterización fenotípica de los BMM Φ , CAM Φ y AAM Φ

Se diferenciaron macrófagos a partir de células progenitoras existentes en la médula ósea (BMM Φ) de ratones BALB/c, las cuales se cultivaron en presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Transcurridos 7 días de cultivo, la expresión de los marcadores CD11b y F4/80 se analizó por citometría de

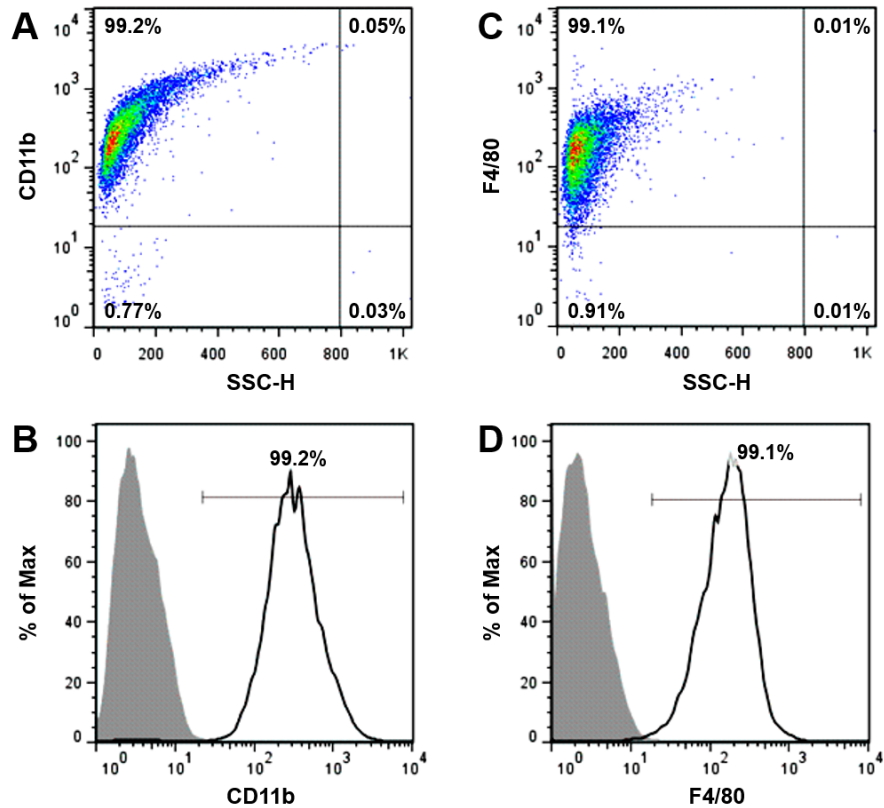


Fig. 22. Caracterización fenotípica de los macrófagos derivados de médula ósea (BMM Φ): expresión de CD11b y F4/80. Se diferenciaron macrófagos a partir de células precursoras existentes en la médula ósea (BMM Φ) de ratones BALB/c cultivadas en presencia de M-CSF. Transcurridos 7 días de cultivo, la expresión de los marcadores CD11b (A y B) y F4/80 (C y D) en los BMM Φ diferenciados se analizó por citometría de flujo. Los histogramas sombreados representan a las células sin teñir y los no sombreados a las células teñidas con los anticuerpos que reconocen a las moléculas de interés.

flujo en las células diferenciadas para evaluar si éstas se habían diferenciado en BMM Φ . La caracterización por citometría de flujo demostró que las células diferenciadas constituyeron una población homogénea de macrófagos que, casi en su totalidad, expresaron los marcadores CD11b (cadena α del receptor tipo 3 para complemento [MAC-1]) (Fig. 22A y B) y F4/80 (glicoproteína transmembranal de 125 kDa) (Fig. 22C y D), ambos considerados como característicos de esta estirpe celular en el modelo murino (146).

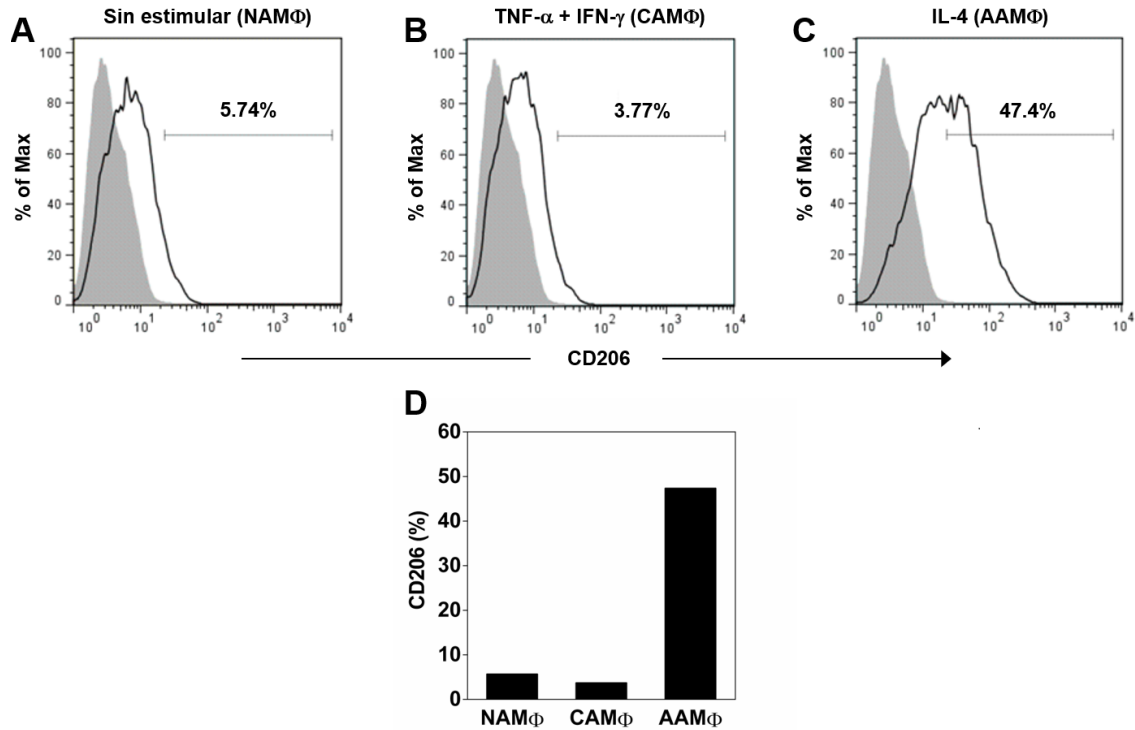


Fig. 23. Caracterización fenotípica de los macrófagos activados de forma clásica (CAMΦ) y de forma alternativa (AAMΦ): expresión diferencial del receptor de manosa (CD206). Los BMMΦ (5×10^5 células/ml) se mantuvieron sin estimular o se estimularon durante 48 h con TNF- α (500 U/ml) + IFN- γ (100 U/ml) o con IL-4 (20 U/ml) para inducir su activación clásica y alternativa, respectivamente. La expresión del receptor de manosa (CD206) se analizó por citometría de flujo en las diferentes poblaciones de macrófagos: no activados o NAMΦ (A y D), activados de forma clásica o CAMΦ (B y D) y activados de forma alternativa o AAMΦ (C y D). Los histogramas sombreados representan a las células sin teñir y los no sombreados a las células teñidas con el anticuerpo que reconoce a la molécula de interés.

Posteriormente, los BMMΦ se estimularon con TNF- α + IFN- γ para inducir la activación clásica (CAMΦ) y con IL-4 para inducir la activación alternativa (AAMΦ) de los mismos. Para caracterizar fenotípicamente a ambas poblaciones de macrófagos, se analizó por citometría de flujo el cambio en la expresión del receptor de manosa (CD206) en dichas células, pues se ha demostrado que la expresión de este receptor se induce en los AAMΦ, pero no en los CAMΦ (69, 71, 160, 161). El análisis por citometría de flujo demostró que la expresión de CD206

fue regulada diferencialmente entre los CAM Φ y los AAM Φ obtenidos (Fig. 23). Se observó un incremento en la expresión de CD206 en los AAM Φ (Fig. 23C y D), pero no en los CAM Φ (Fig. 23B y D). En contraparte, los CAM Φ expresaron niveles de CD206 similares o ligeramente menores que los de los BMM Φ sin estimular (no activados o NAM Φ) (Fig. 23A, B y D). Estos datos demuestran claramente que los BMM Φ estimulados con IL-4 adquirieron el fenotipo de AAM Φ , mientras que los BMM Φ estimulados con TNF- α + IFN- γ adquirieron el fenotipo de CAM Φ .

6.10. La presencia proteínica y la función de la NOS2 y de la Arg-1 se inducen diferencialmente en los CAM Φ y en los AAM Φ

Una de las características funcionales que distinguen a los CAM Φ y a los AAM Φ radica en el metabolismo diferencial de la L-arginina a través de la óxido nítrico sintasa inducible (NOS2) y de la arginasa 1 (Arg-1), respectivamente. Por lo tanto, para caracterizar a nivel funcional a los CAM Φ y a los AAM Φ diferenciados *in vitro*, se analizó la presencia proteínica y la actividad enzimática de la NOS2 y de la Arg-1 en los BMM Φ estimulados con IL-4 y con TNF- α + IFN- γ . La presencia proteínica de ambas enzimas se analizó mediante ensayos de Western blot. La actividad de la NOS2 se analizó mediante la cuantificación de nitritos (metabolitos estables del óxido nítrico) presentes en el sobrenadante del cultivo de las células, utilizando la reacción colorimétrica de Griess; mientras que la actividad enzimática de la Arg-1 se analizó en los lisados de las células mediante la cuantificación de la cantidad de urea producida a partir de la hidrólisis de la L-arginina, utilizando la reacción colorimétrica de Archibald. Así, en los BMM Φ estimulados con TNF- α + IFN- γ se

detectó la presencia proteínica de la NOS2 y una producción notable de nitritos que demostró la funcionalidad de dicha enzima (Fig. 24A y C). En contraparte, en los BMMΦ estimulados con IL-4 no se detectó la presencia proteínica de la NOS2 (Fig. 24A) y sólo se registraron concentraciones bajas de nitritos, similares a las producidas por los BMMΦ sin estimular (no activados o NAMΦ) (Fig. 24C). De esta forma, los datos obtenidos permitieron caracterizar funcionalmente a los BMMΦ estimulados con TNF- α + IFN- γ como CAMΦ. Por otro lado, en los BMMΦ estimulados con IL-4 se detectó la presencia proteínica de la Arg-1 y una elevada actividad de arginasa que demostró la funcionalidad de la enzima (Fig. 24A y B). Adicionalmente, en los BMMΦ estimulados con TNF- α + IFN- γ se detectó una presencia proteínica mínima de la Arg-1 (Fig. 24A). Este fenómeno ha sido explicado como una probable respuesta de los BMMΦ a bajas concentraciones de IL-10 (citocina que también puede inducir, aunque con menor eficacia que la IL-4, la expresión de la Arg-1) producidas por dichas células, como un mecanismo compensatorio, cuando se estimulan con TNF- α en combinación con IFN- γ (50, 68). Sin embargo, cuando se evaluó la actividad de la Arg-1 en los BMMΦ estimulados con TNF- α + IFN- γ , sólo se detectó una baja actividad de arginasa, con valores similares a la de los BMMΦ sin estimular (Fig. 24B). De esta forma, los datos obtenidos permitieron caracterizar funcionalmente a los BMMΦ estimulados con IL-4 como AAMΦ.

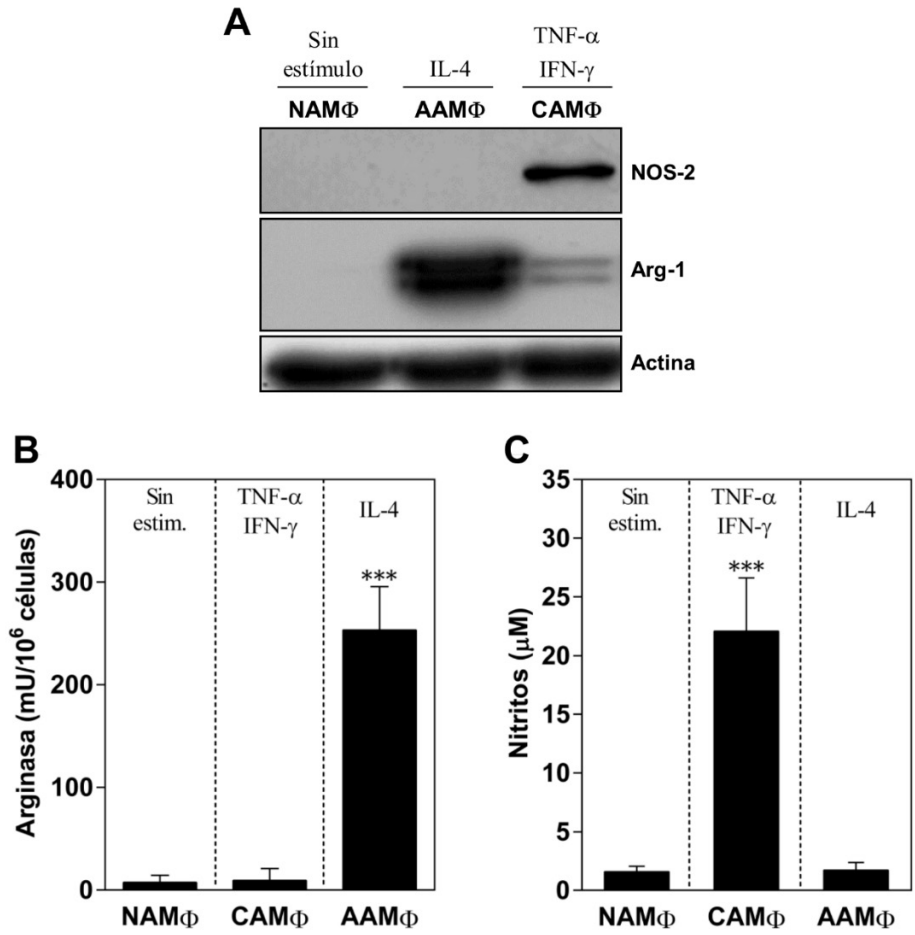


Fig. 24. Caracterización funcional de los macrófagos activados de forma clásica (CAM Φ) y de forma alternativa (AAM Φ): inducción diferencial de la presencia proteínica y de la función de la NOS2 y de la Arg-1. Los BMM Φ (1×10^6 células/ml) se mantuvieron sin estimular (no activados o NAM Φ) o se estimularon durante 48 h con TNF- α (500 U/ml) + IFN- γ (100 U/ml) o con IL-4 (20 U/ml) para inducir su activación clásica (CAM Φ) y alternativa (AAM Φ), respectivamente. (A) La presencia proteínica de la NOS2 y de la Arg-1 se analizó en las diferentes poblaciones de macrófagos mediante ensayos de Western blot. (B) La actividad de la Arg-1 se cuantificó en los extractos de las diferentes poblaciones de macrófagos, mediante un ensayo enzimático de actividad de arginasa, tal y como describe en la sección de material y métodos. (C) La actividad la NOS2 se evaluó cuantificando la concentración de nitritos presentes en los sobrenadantes de cultivo de las diferentes poblaciones de macrófagos, mediante la reacción de Griess. Los datos se expresan como las medias \pm las desviaciones estándares (SD) de los valores obtenidos de tres experimentos independientes analizados por triplicado. ***, $P \leq 0.001$.

6.11. Los amastigotes de *Leishmania mexicana* de aislados de pacientes con LCL y LCD regulan diferencialmente la síntesis proteínica y la actividad de la Arg-1 en los AAMΦ, pero no de la NOS2 en los CAMΦ

Se estimularon BMMΦ con TNF- α + IFN- γ para inducir la activación clásica (CAMΦ) y con IL-4 para inducir la activación alternativa (AAMΦ) de estos fagocitos y se infectaron con los amastigotes de *Leishmania mexicana* de un aislado obtenido de un paciente con LCL y de otro obtenido a partir de un paciente con LCD. Transcurridas 48 h y 72 h de infección, se analizó la presencia proteínica y la actividad enzimática, respectivamente, de la Arg-1 y de la NOS2 en ambas poblaciones de macrófagos. Se detectó una mayor presencia proteínica y actividad de la Arg-1 en los AAMΦ infectados con los amastigotes de *Leishmania mexicana* del aislado obtenido del paciente con LCD que en los AAMΦ infectados con los amastigotes del aislado obtenido de paciente con LCL (Fig. 25A y B, 26A). En contraste, no se detectaron diferencias en la presencia proteínica y actividad de la NOS2 entre los CAMΦ infectados con los amastigotes de uno u otro de los aislados obtenidos de los pacientes (Fig. 25A y B, 26B). De esta forma, los datos obtenidos sugieren que los amastigotes de *L. mexicana* del aislado del paciente con LCD inducen una mayor expresión y función de la Arg-1 en los AAMΦ que los amastigotes de *L. mexicana* del aislado del paciente con LCL, pero no inducen cambios en la expresión y función de la NOS2 en los CAMΦ.

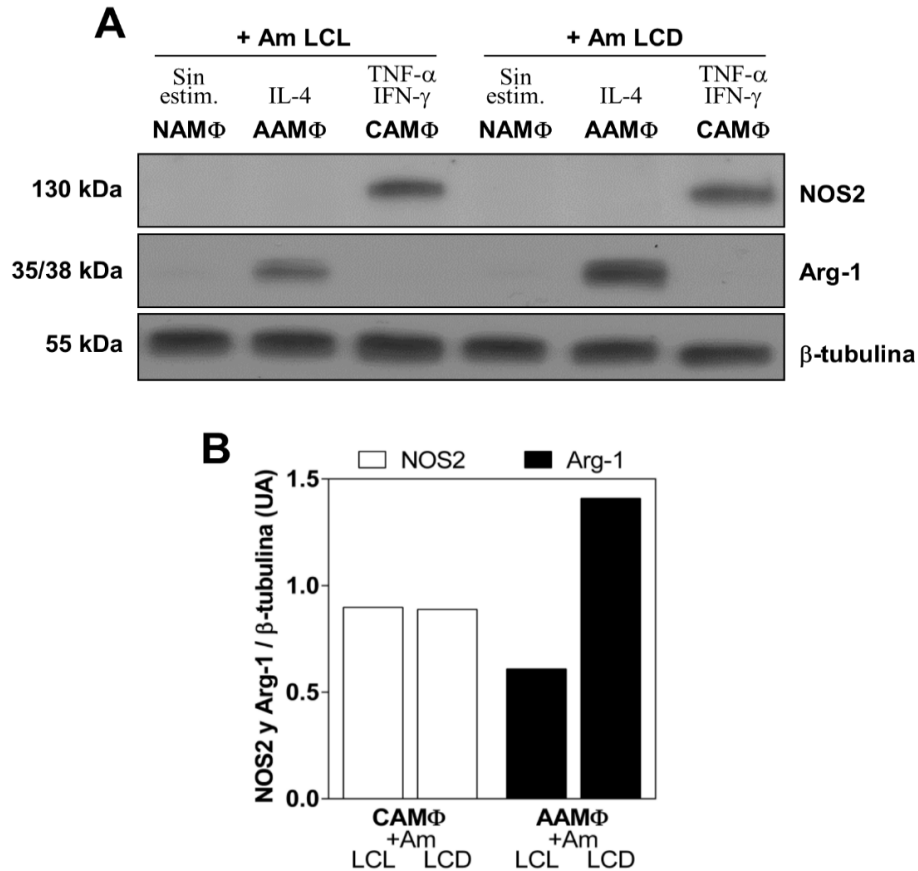


Fig. 25. Los amastigotes de *Leishmania mexicana* de aislados obtenidos de pacientes con LCL y LCD regulan diferencialmente la presencia proteínica de la Arg-1 en los macrófagos activados de forma alternativa (AAM Φ), pero no de la NOS2 en los macrófagos activados de forma clásica (CAM Φ). Los BMM Φ (1×10^6 células/ml) se mantuvieron sin estimular (no activados o NAM Φ) o se estimularon con TNF- α (500 U/ml) + IFN- γ (100 U/ml) o con IL-4 (20 U/ml) para inducir en éstos una activación clásica (CAM Φ) y una activación alternativa (AAM Φ), respectivamente, y se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana* de un aislado obtenido de un paciente con LCL o de un aislado obtenido de un paciente con LCD, en una relación 5:1 (parásitos/célula). El estímulo de las células con las citocinas se inició 4 h antes de ser infectadas y se mantuvo durante el periodo de infección. (A) Transcurridas 48 h de infección, la presencia proteínica de la NOS2 y de la Arg-1 se analizó en las diferentes poblaciones de macrófagos mediante ensayos de Western blot. (B) Las diferencias en la presencia proteínica de ambas enzimas entre las distintas poblaciones de macrófagos se determinó realizando un análisis de densitometría de las bandas obtenidas. Los valores densitométricos (expresados como unidades arbitrarias [U.A.]) se calcularon como el cociente entre las intensidades de las bandas detectadas para la Arg-1 y la NOS2, y las intensidades de las bandas detectadas para la β -tubulina, proteína utilizada como control de carga. Los datos de un experimento se muestran como representativos de dos experimentos independientes en los que se obtuvieron resultados similares.

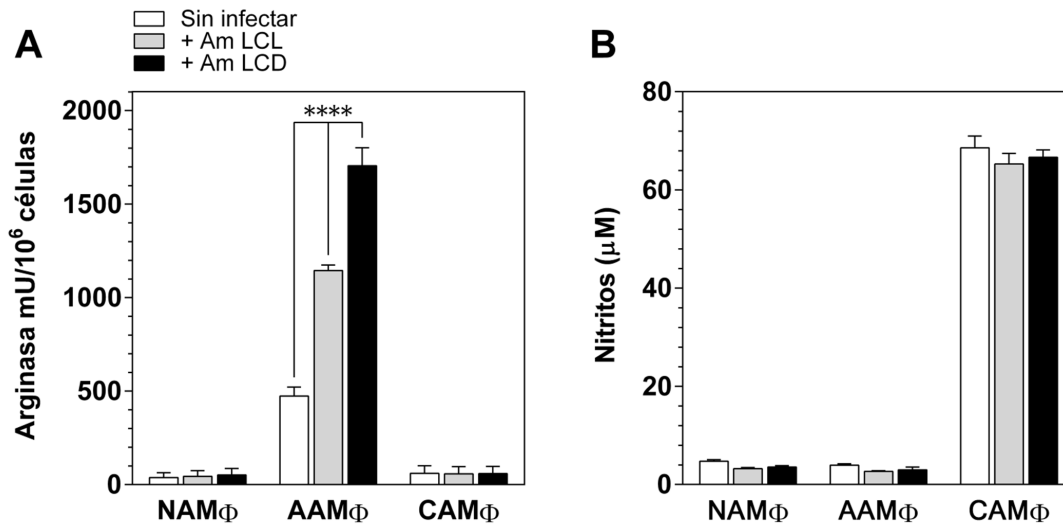


Fig. 26. Los amastigotes de *Leishmania mexicana* de aislados obtenidos de pacientes con LCL y LCD regulan diferencialmente la actividad de la Arg-1 en los macrófagos activados de forma alternativa (AAMΦ), pero no de la NOS2 en los macrófagos activados de forma clásica (CAMΦ). Los BMMΦ (5×10^5 células/ml) se mantuvieron sin estimular (no activados o NAMΦ) o se estimularon con TNF- α (500 U/ml) + IFN- γ (100 U/ml) o con IL-4 (20 U/ml) para inducir en éstos una activación clásica (CAMΦ) y alternativa (AAMΦ), respectivamente, y se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana* de un aislado obtenido de un paciente con LCL o de un aislado obtenido de un paciente con LCD, en una relación 5:1 (parásitos/célula). El estímulo de las células con las citocinas se inició 4 h antes de ser infectadas y se mantuvo durante el periodo de infección. (A) Transcurridas 72 h de infección, la actividad de la Arg-1 se cuantificó en los extractos de las diferentes poblaciones de macrófagos mediante un ensayo enzimático de actividad de arginasa, tal y como describe en la sección de material y métodos. (B) La actividad la NOS2 se evaluó cuantificando la concentración de nitritos presentes en los sobrenadantes de cultivo de las diferentes poblaciones de macrófagos mediante la reacción de Griess. Los datos se expresan como las medias \pm las desviaciones estándares (SD) de los valores obtenidos de al menos dos experimentos independientes analizados por triplicado. ****, $P \leq 0.0001$.

VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En el presente estudio analizamos en un modelo murino *in vivo* la capacidad de dos aislados de *Leishmania mexicana*, uno obtenido de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y el otro de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa (LCD), para regular diferencialmente el metabolismo de la L-arginina a través de la arginasa 1 (Arg-1) y de la óxido nítrico sintasa inducible (NOS2). Para lo anterior, se inocularon ratones BALB/c con ambos aislados de *L. mexicana*, ya que se ha demostrado que esta cepa de ratón es altamente susceptible a la infección con dicha especie de *Leishmania* (151-153). En primera instancia, se evaluaron las diferencias en la patogenicidad de los aislados durante la infección experimental de ratones, analizando el tamaño y la carga parasitaria de las lesiones desarrolladas en los mismos, así como la diseminación de los parásitos a los ganglios linfáticos. Interesantemente, se observó que, a pesar de pertenecer a la misma especie de *Leishmania*, el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCD resultó más virulento que el aislado obtenido del paciente con LCL. Este hecho se vio reflejado en el desarrollo de lesiones de mayor tamaño y con cargas parasitarias más altas en los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD que las lesiones desarrolladas en los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL. En concordancia con las observaciones presentadas, otros estudios han reportado diferencias importantes en el tiempo de evolución y en la carga parasitaria en las lesiones desarrolladas en

ratones infectados con diferentes cepas y aislados de *L. major* y *L. amazonensis* (137, 138, 162). Con respecto a la diseminación de los parásitos desde las lesiones hacia los ganglios linfáticos (ganglios linfáticos popliteales, que son los más cercanos a los cojinetes plantares, sitios donde se desarrollaron las lesiones) y en forma contraria a los hallazgos en las lesiones desarrolladas en los cojinetes plantares de los ratones, se detectaron cargas parasitarias mayores en los ganglios de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL que en los ganglios de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD. Dicho comportamiento podría correlacionarse con hallazgos previamente reportados que demuestran una alteración en la capacidad de células fagocíticas altamente parasitadas con *Leishmania*, las cuales se observan rutinariamente en las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD, para abandonar el sitio de infección y migrar hacia los ganglios linfáticos (154, 163, 164).

En la literatura se ha reportado que existe una clara asociación entre la presencia y actividad de la Arg-1, la proliferación incontrolada del parásito y un aumento de tamaño en las lesiones de ratones susceptibles infectados con *Leishmania* (98, 103, 165). En el presente trabajo se demostró una mayor expresión y actividad de la Arg-1 en las lesiones de los ratones infectados con el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCD que en las lesiones de los ratones infectados con el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCL. Adicionalmente, los niveles en la expresión y función de la Arg-1 en las lesiones se

correlacionaron positivamente con el tamaño y la carga parasitaria de las mismas, por lo que las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD, además de presentar una mayor presencia proteínica y actividad de Arg-1, mostraron también un tamaño mayor y una carga más elevada de amastigotes que las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL. Dado el hecho observado de que el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCD exhibió mayor grado de patogenicidad que el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCL, los hallazgos aquí presentados concuerdan con otros que han demostrado el desarrollo de lesiones de mayor tamaño y con niveles más elevados de actividad de arginasa en ratones susceptibles infectados con una especie de *Leishmania* más patogénica, e.g., *L. major*, que aquellos infectados con otra menos patogénica, e.g., *L. tropica* (165).

En contraparte, la expresión de la NOS2 y la subsecuente producción de óxido nítrico en los tejidos de ratones resistentes clínicamente a la infección con *L. major* (e.g., ratones C57BL/6) se ha asociado estrechamente con la disminución de la infección y la resolución de las lesiones en la leishmaniasis cutánea experimental (106, 107, 166-168). En la presente investigación no se detectó o se detectó una muy baja presencia de la NOS2 (en comparación con la abundante presencia detectada en las lesiones de ratones C57BL/6 infectados con *L. major*, utilizados como control positivo) en las lesiones de los ratones infectados con los aislados de *L. mexicana* obtenidos de los pacientes con LCL y LCD, sin presentar impacto alguno en la progresión de la infección. Dado que existe una regulación recíproca

entre la NOS2 y la Arg-1 (56, 68), es probable que el aumento en la inducción de la Arg-1 a causa de la infección con los aislados de *L. mexicana* haya atenuado la expresión de la NOS2 en las lesiones de los ratones al disminuir la disponibilidad de la L-arginina, pues se ha demostrado que la presencia de dicho aminoácido se requiere para la traducción de la NOS2 (169), o a través de la producción de poliaminas tales como la espermina y espermidina, ya que se ha documentado que éstas tienen la capacidad de inhibir la síntesis proteínica de la NOS2 (88, 170, 171).

En el modelo murino experimental de la leishmaniasis cutánea, la progresión de la infección se ha asociado con la producción de IL-4, IL-10 e IL-13 (156-158), las cuales se conoce que inducen la expresión y función de la Arg-1, hecho que conlleva a una proliferación excesiva del parásito en las células hospederas y a una patología descontrolada de la enfermedad (85, 97, 98, 103). En los experimentos realizados en este trabajo, los niveles de IL-4 e IL-10 detectados en las lesiones y en los ganglios linfáticos popliteales de los ratones infectados con ambos aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes fueron similares. Por lo tanto, este hecho sugiere que la expresión y función diferenciales de la Arg-1 detectadas en las lesiones de los ratones no dependió de la capacidad de cada uno de los aislados para inducir una mayor o menor producción de IL-4 o IL-10. Dado el papel crucial que tiene el IFN- γ en la leishmaniasis, se evaluaron también los niveles de esta citocina en las lesiones y en los ganglios linfáticos de los ratones infectados con los dos aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes. A pesar de que se detectaron mayores niveles de IFN- γ en las lesiones y en los ganglios

linfáticos de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD que en las lesiones y ganglios linfáticos de los ratones infectados con el aislado de paciente con LCL, estas diferencias no se vieron reflejadas ni en la expresión ni en la función de la NOS2, así como tampoco en la disminución de la infección o mejoría de la parasitosis. Sin embargo, dichas observaciones coinciden con diferentes hallazgos clínicos en los que se ha demostrado la presencia de IFN- γ en las lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea y, más aún, una correlación positiva entre el tamaño de la lesión con los niveles de expresión de dicha citocina (172-175).

Es bien conocido que los macrófagos son las principales células hospederas de *Leishmania* y diferentes estudios realizados *in vivo* han demostrado elegantemente que, dependiendo de su estado de activación, estas células pueden tanto eliminar (en el caso de los macrófagos activados de forma clásica) como albergar (en el caso de los macrófagos activados de forma alternativa) a dicho parásito según el metabolismo diferencial de la L-arginina a través de las enzimas NOS2 y Arg-1, respectivamente (85, 97, 116). En este trabajo se identificaron, *in vivo*, macrófagos infectados con amastigotes y que exhibieron un fenotipo de activación alternativa (F4/80⁺ Arg-1⁺ YM1⁺) en las lesiones de los ratones inoculados con cualquiera de los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes. Sin embargo, los macrófagos alternativamente activados presentes en las lesiones de los ratones infectados con el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCD parecieron exhibir una mayor expresión de la Arg-1 y contener una mayor carga de amastigotes que

aquellos presentes en las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL. Existen evidencias contundentes de que el metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 en los macrófagos conlleva a la producción de poliaminas, las cuales favorecen la proliferación intracelular de *Leishmania* (85, 97, 98). De esta forma, los datos presentados proponen que el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCD podría ser más eficiente en inducir la expresión de la Arg-1 en los macrófagos, la cual conllevaría a una mayor síntesis de poliaminas y proliferación del parásito en dicha célula hospedera, que el aislado obtenido del paciente con LCL. Por otra parte, cabe señalar que la presencia de la NOS2 no se observó en los macrófagos presentes en las lesiones de los ratones infectados con cualquiera de los dos aislados de *L. mexicana*.

Con la finalidad de tener una evidencia más directa de una regulación diferencial del metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 en los macrófagos a causa de la infección con los diferentes aislados de *L. mexicana*, se realizaron experimentos, *in vitro*, en macrófagos murinos diferenciados a partir de células precursoras existentes en la médula ósea (BMM Φ) de ratones susceptibles BALB/c y activados de forma clásica y de forma alternativa. En coherencia con los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados en las lesiones de los ratones infectados con los aislados de *L. mexicana*, se observó una mayor expresión y actividad de la Arg-1 en los BMM Φ activados de forma alternativa cuando fueron infectados con el aislado obtenido del paciente con LCD que cuando fueron infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL. En

contraparte, en los BMM Φ activados de forma clásica no se observaron cambios en la expresión y actividad de la NOS2 al ser infectados con uno u otro de los aislados de *L. mexicana*. De esta forma, dichas evidencias refuerzan la propuesta aquí presentada de una capacidad diferencial de los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con LCL y LCD para regular la expresión y función de la Arg-1 en los macrófagos activados de forma alternativa, mismos que participan de forma preponderante en el desarrollo de leishmaniasis cutáneas murinas con diferente grado de severidad.

En la leishmaniasis humana, la presencia proteínica y actividad de la Arg-1 han sido detectadas en las lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea a causa de la infección con diferentes especies de *Leishmania* tales como *L. aethiopica*, *L. major*, *L. tropica* y *L. amazonensis* (111-113); sin embargo, este hecho no se ha estudiado en las lesiones de pacientes infectados con *L. mexicana*. En este estudio se detectó la presencia de macrófagos (CD68⁺) expresando a la Arg-1 en biopsias de las lesiones de pacientes mexicanos con LCL y LCD a causa de la infección con *L. mexicana*. Interesantemente y en congruencia con las observaciones realizadas en el modelo murino, los macrófagos presentes en las lesiones de los pacientes con LCD también presentaron mayor expresión de la Arg-1 y carga de amastigotes que los macrófagos presentes en las lesiones de los pacientes con LCL. Estos hallazgos coinciden con observaciones realizadas en pacientes también con LCL y LCD, pero a causa de la infección con *L. amazonensis*, en los que se ha detectado una mayor expresión de Arg-1 en las lesiones de aquellos

con LCD que en las lesiones de aquellos con LCL (112). Por otra parte, y en contraste con lo que se observó en las lesiones de los ratones, sí fue posible detectar la presencia de macrófagos que expresaban a la NOS2 en las biopsias de la lesiones de los pacientes con LCL, hecho que coincide con el trabajo realizado por Qadoumi y colaboradores, donde se reporta la presencia de macrófagos que expresan a la NOS2 en biopsias de piel de pacientes mexicanos con LCL (114).

Existen múltiples evidencias que respaldan la existencia de una arginasa funcional en diferentes especies del parásito *Leishmania*, incluida *L. mexicana*, y dicha enzima se ha identificado como esencial para la proliferación e infectividad del parásito, además de ser capaz de modular la respuesta inmune del hospedero y la patogénesis de la leishmaniasis (80, 99, 116, 122, 124, 125, 127-129). En este trabajo fue posible detectar la presencia de una arginasa propia de *Leishmania* sólo en los extractos de los amastigotes purificados de las lesiones de los ratones infectados con el aislado de *L. mexicana* obtenido del paciente con LCD, la cual presentó por mucho una mayor actividad que la que logró medirse en los extractos de los amastigotes purificados de las lesiones de los ratones infectados con el aislado obtenido del paciente con LCL. Dado que la actividad de arginasa detectada en los extractos de amastigotes purificados de las lesiones de los ratones infectados con el aislado del paciente con LCL fue muy baja, es muy probable que dicha enzima se encontrara expresada en los extractos de los amastigotes en tan bajos niveles que no fue posible detectarla mediante el

procedimiento de Western blot empleado en el estudio. Tomando en cuenta observaciones previas que sugieren que la arginasa de *Leishmania* puede incrementar la patogénesis de la enfermedad aumentando las actividades de arginasa en las células del hospedero (127), es posible pensar en una correlación directa entre los niveles de expresión y actividad de arginasa presentes en los amastigotes de *L. mexicana* de los aislados obtenidos de los pacientes con LCL y LCD y los niveles de expresión y actividad de arginasa presentes en las lesiones de los ratones infectados con dichos aislados.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio enfatizan el papel preponderante del metabolismo de la L-arginina a través de la Arg-1 durante la infección con el parásito *L. mexicana*. Específicamente, las evidencias derivadas de las observaciones realizadas en el modelo murino, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como los análisis realizados en las lesiones de pacientes, permiten sugerir la existencia de una regulación diferencial de esta ruta en la inmunopatogénesis de la LCL y LCD. Así mismo, en dicha regulación, resulta muy posible la participación de los macrófagos activados de forma alternativa y de factores patogénicos intrínsecos a los parásitos aislados de pacientes con ambas formas clínicas de leishmaniasis cutánea. Sin duda, la realización de experimentos adicionales con otros aislados obtenidos de pacientes con ambas formas clínicas de la enfermedad, así como de otros experimentos enfocados en el campo de la genómica, proteómica y metabolómica, entre otros, serán necesarios y de gran ayuda para fortalecer los hallazgos y propuestas que aquí se presentan.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votypka 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:e0004349.
2. Beattie L, Kaye PM. 2011. *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us? Cell Microbiol 13:1659-67.
3. Akhoundi M, Downing T, Votypka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, Ravel C, Marty P, Delaunay P, Kasbari M, Granouillac B, Gradoni L, Sereno D. 2017. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. Molecular Aspects of Medicine 57:1-29.
4. Burza S, Croft SL, Boelaert M. 2018. Leishmaniasis. Lancet 392:951-970.
5. Colmenares M, Kar S, Goldsmith-Pestana K, McMahon-Pratt D. 2002. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. Trans R Soc Trop Med Hyg 96 Suppl 1:S3-7.
6. World Health Organization. 2020, March 02. Leishmaniasis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Accessed
7. Centers for Disease Control and Prevention. 2020, February 14. Leishmaniasis. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>. Accessed
8. Organization PAH. 2019. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. PAHO, Washington, D.C.
9. Salud OPdl. 2019. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. OPS, Washington, D.C.
10. PAHO/WHO. Leishmaniasis. <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>. Accessed December 10, 2020.
11. World Health Organization. Global Health Observatory data repository: status of endemicity of cutaneous leishmaniasis. Data by country. <https://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCEND?lang=en>. Accessed January 12, 2021.

12. Salud Sd. Centro Nacional de Vigilancia epidemiológica y Control de Enfermedades. Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniasis. México, D.F. 38 p.
13. InDRE-Secretaría de Salud. 2019. Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Leishmaniasis, Primera Edición ed. InDRE, Ciudad de México, México.
14. Maurício IL. 2018. Leishmania Taxonomy, p 15-30, The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases doi:10.1007/978-3-319-72386-0_2.
15. Bates PA. 2007. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol 37:1097-106.
16. Bates PA. 2008. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. Curr Opin Microbiol 11:340-4.
17. Sunter J, Gull K. 2017. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. Open Biol 7.
18. Thakur S, Joshi J, Kaur S. 2020. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. J Parasit Dis doi:10.1007/s12639-020-01212-w:1-20.
19. Kautz-Neu K, Schwonberg K, Fischer MR, Schermann AI, von Stebut E. 2012. Dendritic cells in *Leishmania major* infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. Med Microbiol Immunol 201:581-92.
20. von Stebut E. 2007. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. Exp Dermatol 16:340-6.
21. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Medical and Veterinary Entomology 27:123-147.
22. Lane RP, Natural History M. 1996. Medical insects and arachnids. Chapman & Hall, London.
23. Handman E, Bullen DV. 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. Trends Parasitol 18:332-4.

24. Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, Barillas-Mury C, Sacks DL, Valenzuela JG. 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 119:329-41.
25. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173:6521-5.
26. de Menezes JP, Saraiva EM, da Rocha-Azevedo B. 2016. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasites & Vectors* 9.
27. Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F. 2016. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. *Trends in Parasitology* 32:392-401.
28. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. 2008. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science* 321:970-974.
29. Cuervo P, Domont GB, De Jesus JB. 2010. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics* 73:845-867.
30. Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. 2017. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci* 18:1296-1296.
31. Cunningham AC. 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 72:132-41.
32. Oghumu S, Natarajan G, Satoskar AR. 2015. Pathogenesis of Leishmaniasis in Humans, p 337-348, *Human Emerging and Re-emerging Infections* doi:10.1002/9781118644843.ch18.
33. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. 2017. Leishmaniasis: a review. *F1000Res* 6:750.
34. Becker I. 2006. Leishmaniosis, p 393-409. *In* R FAyP-T (ed), *Aprendizaje de la Parasitología Basado en Problemas Editores de Textos Mexicanos, ETM.*, México, D.F.

35. Velasco CO, Guzmán, B.C., Rivas, S.B., Aguilar, T.F., Hernández, M.J. 1994. Las leishmaniasis con especial referencia a México, II Edición ed, p 51, México, D.F.
36. Monroy-Ostria A, Sanchez-Tejeda G. 2017. Survey of Cutaneous Leishmaniasis in Mexico: *Leishmania* Species, Clinical Expressions and Risk Factors, The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis doi:10.5772/65501.
37. Organización Panamericana de la Salud. 2020. Atlas interactivo de leishmaniasis en las Américas: aspectos clínicos y diagnósticos diferenciales. OPS, Washington, DC.
38. Bryceson AD. 1969. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The clinical and histological features of the disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 63:708-37.
39. Velasco O, Savarino SJ, Walton BC, Gam AA, Neva FA. 1989. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. Am J Trop Med Hyg 41:280-8.
40. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol 5:873-82.
41. Chitnis CE, McCall L-I, Zhang W-W, Matlashewski G. 2013. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. PLoS Pathogens 9.
42. Morris SM, Jr. 2006. Arginine: beyond protein. Am J Clin Nutr 83:508S-512S.
43. Morris SM, Jr. 2012. Arginases and arginine deficiency syndromes. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 15:64-70.
44. Bernard AC, Mistry SK, Morris SM, Jr., O'Brien WE, Tsuei BJ, Maley ME, Shirley LA, Kearney PA, Boulanger BR, Ochoa JB. 2001. Alterations in arginine metabolic enzymes in trauma. Shock 15:215-9.
45. Bronte V, Zanovello P. 2005. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. Nat Rev Immunol 5:641-54.
46. Luiking YC, Hallemeesch MM, Vissers YL, Lamers WH, Deutz NE. 2004. In vivo whole body and organ arginine metabolism during endotoxemia (sepsis) is dependent on mouse strain and gender. J Nutr 134:2768S-2774S; discussion 2796S-2797S.

47. Wu G, Morris SM, Jr. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 (Pt 1):1-17.
48. Mori M, Gotoh T. 2004. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J Nutr* 134:2820S-2825S; discussion 2853S.
49. Munder M, Eichmann K, Modolell M. 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 160:5347-54.
50. Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. 1999. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 163:3771-7.
51. Hofmann F, Kreuzsch J, Maier KP, Munder PG, Decker K. 1978. The urea cycle in different types of macrophages. *Biochem Soc Trans* 6:990-3.
52. Ash DE. 2004. Structure and function of arginases. *J Nutr* 134:2760S-2764S; discussion 2765S-2767S.
53. Munder M. 2009. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol* 158:638-51.
54. Das P, Lahiri A, Chakravorty D. 2010. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog* 6:e1000899.
55. Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, Narayanan SP, Caldwell RB. 2018. Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. *Physiological Reviews* 98:641-665.
56. Rodriguez PC, Ochoa AC, Al-Khami AA. 2017. Arginine Metabolism in Myeloid Cells Shapes Innate and Adaptive Immunity. *Front Immunol* 8:93.
57. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-50.
58. Rath M, Muller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. 2014. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol* 5:532.

59. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. 2019. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal Research Reviews* 40:158-189.
60. Daff S. 2010. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide* 23:1-11.
61. Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2:907-16.
62. Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. 2018. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. *Int J Mol Sci* 19.
63. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. 2007. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:906-11.
64. Mayer AK, Bartz H, Fey F, Schmidt LM, Dalpke AH. 2008. Airway epithelial cells modify immune responses by inducing an anti-inflammatory microenvironment. *Eur J Immunol* 38:1689-99.
65. Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamaignere C, Fuentes JM, Luckner C, Doschko G, Soler G, Eichmann K, Muller FM, Ho AD, Goerner M, Modolell M. 2005. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 105:2549-56.
66. Wanasen N, Soong L. 2008. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res* 41:15-25.
67. Wilkins-Rodriguez AA, Escalona-Montano AR, Aguirre-Garcia M, Becker I, Gutierrez-Kobeh L. 2010. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Exp Parasitol* 126:426-34.
68. Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 25:1101-4.
69. Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-69.
70. Nathan C, Xie QW. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269:13725-8.

71. Martinez FO, Helming L, Gordon S. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27:451-83.
72. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. 1996. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6770-4.
73. Handa AK, Fatima T, Mattoo AK. 2018. Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. *Frontiers in Chemistry* 6.
74. Pegg AE. 2009. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 61:880-94.
75. Tabor CW, Tabor H. 1984. Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53:749-90.
76. Stempin CC, Dulgerian LR, Garrido VV, Cerban FM. 2010. Arginase in Parasitic Infections: Macrophage Activation, Immunosuppression, and Intracellular Signals. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010:1-10.
77. Closs EI, Simon A, Vekony N, Rotmann A. 2004. Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr* 134:2752S-2759S; discussion 2765S-2767S.
78. Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y. 2004. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 447:532-42.
79. Deves R, Boyd CA. 1998. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 78:487-545.
80. Balana-Fouce R, Calvo-Alvarez E, Alvarez-Velilla R, Prada CF, Perez-Pertejo Y, Reguera RM. 2012. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 181:85-93.
81. 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* 75:2802-10.
82. Jungnickel KEJ, Parker JL, Newstead S. 2018. Structural basis for amino acid transport by the CAT family of SLC7 transporters. *Nat Commun* 9:550.

83. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, Bertran J, McLeod C, Palacin M, Modolell M, Lloberas J, Celada A. 2006. Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. *J Immunol* 176:5918-24.
84. Hecker M, Nematollahi H, Hey C, Busse R, Racke K. 1995. Inhibition of arginase by NG-hydroxy-L-arginine in alveolar macrophages: implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis. *FEBS Lett* 359:251-4.
85. Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Corraliza I. 2001. The inhibition of arginase by N^ω-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* 193:777-84.
86. Bussiere FI, Chaturvedi R, Cheng Y, Gobert AP, Asim M, Blumberg DR, Xu H, Kim PY, Hacker A, Casero RA, Jr., Wilson KT. 2005. Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. *J Biol Chem* 280:2409-12.
87. Chaturvedi R, Asim M, Hoge S, Lewis ND, Singh K, Barry DP, de Sablet T, Piazuelo MB, Sarvaria AR, Cheng Y, Closs EI, Casero RA, Jr., Gobert AP, Wilson KT. 2010. Polyamines Impair Immunity to *Helicobacter pylori* by Inhibiting L-Arginine Uptake Required for Nitric Oxide Production. *Gastroenterology* 139:1686-98, 1698 e1-6.
88. 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.
89. Li P, Yin YL, Li D, Kim SW, Wu G. 2007. Amino acids and immune function. *Br J Nutr* 98:237-52.
90. Modolell M, Choi BS, Ryan RO, Hancock M, Titus RG, Abebe T, Hailu A, Muller I, Rogers ME, Bangham CR, Munder M, Kropf P. 2009. Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e480.
91. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, Delgado A, Correa P, Brayer J, Sotomayor EM, Antonia S, Ochoa JB, Ochoa AC. 2004. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* 64:5839-49.

92. Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, Culotta KS, Zabaleta J, Quiceno DG, Ochoa JB, Ochoa AC. 2003. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol* 171:1232-9.
93. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. 2007. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 109:1568-73.
94. Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. 2000. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med* 191:2121-30.
95. Moll H, Flohe S, Rollinghoff M. 1995. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur J Immunol* 25:693-9.
96. Prina E, Abdi SZ, Lebastard M, Perret E, Winter N, Antoine JC. 2004. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J Cell Sci* 117:315-25.
97. Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelen J, Miron C, Alonso C, Corraliza I. 2002. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* 24:113-8.
98. Kropf P, Fuentes JM, Fahrnich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Muller I. 2005. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J* 19:1000-2.
99. Gaur U, Roberts SC, Dalvi RP, Corraliza I, Ullman B, Wilson ME. 2007. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 179:8446-53.
100. Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA. 1990. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 145:4290-7.
101. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Jr., Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 144:278-83.

102. Qi H, Ji J, Wanassen N, Soong L. 2004. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 72:988-95.
103. Iniesta V, Carcelen J, Molano I, Peixoto PM, Redondo E, Parra P, Mangas M, Monroy I, Campo ML, Nieto CG, Corraliza I. 2005. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infect Immun* 73:6085-90.
104. Rogers ME. 2012. The Role of *Leishmania* Proteophosphoglycans in Sand Fly Transmission and Infection of the Mammalian Host. *Front Microbiol* 3:223.
105. 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* 33:1224-34.
106. 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* 104:918-22.
107. 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.
108. Biswas A, Bhattacharya A, Kar S, Das PK. 2011. Expression of IL-10-triggered STAT3-dependent IL-4R α is required for induction of arginase 1 in visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol* 41:992-1003.
109. Osorio EY, Zhao W, Espitia C, Saldarriaga O, Hawel L, Byus CV, Travi BL, Melby PC. 2012. Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. *PLoS Pathog* 8:e1002417.
110. Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. 2001. The Hamster as a Model of Human Visceral Leishmaniasis: Progressive Disease and Impaired Generation of Nitric Oxide in the Face of a Prominent Th1-Like Cytokine Response. *The Journal of Immunology* 166:1912-1920.

111. Abebe T, Hailu A, Woldeyes M, Mekonen W, Bilcha K, Cloke T, Fry L, Seich Al Basatena NK, Corware K, Modolell M, Munder M, Tacchini-Cottier F, Muller I, Kropf P. 2012. Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1684.
112. Franca-Costa J, Van Weyenbergh J, Boaventura VS, Luz NF, Malta-Santos H, Oliveira MC, Santos de Campos DC, Saldanha AC, dos-Santos WL, Bozza PT, Barral-Netto M, Barral A, Costa JM, Borges VM. 2015. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 211:426-35.
113. Mortazavi H, Sadeghipour P, Taslimi Y, Habibzadeh S, Zali F, Zahedifard F, Rahmati J, Kamyab K, Ghandi N, Zamanian A, Reza Tohidinik H, Muller I, Kropf P, Rafati S. 2016. Comparing acute and chronic human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica* focusing on arginase activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 30:2118-2121.
114. Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C. 2002. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 70:4638-42.
115. Morgado FN, Schubach A, Rosalino CMV, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, Conceição-Silva F. 2007. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *British Journal of Dermatology* 0:071018080405005-???
116. da Silva MF, Floeter-Winter LM. 2014. Arginase in *Leishmania*. *Subcell Biochem* 74:103-17.
117. Krassner SM, Flory B. 1971. Essential amino acids in the culture of *Leishmania tarentolae*. *J Parasitol* 57:917-20.
118. Steiger RF, Steiger E. 1977. Cultivation of *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis* in defined media: nutritional requirements. *J Protozool* 24:437-41.
119. Muxel SM, Aoki JI, Fernandes JCR, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Acuna SM, Muller KE, Vanderlinde RH, Floeter-Winter LM. 2017. Arginine and Polyamines Fate in Leishmania Infection. *Front Microbiol* 8:2682.

120. Shaked-Mishan P, Suter-Grotemeyer M, Yoel-Almagor T, Holland N, Zilberstein D, Rentsch D. 2006. A novel high-affinity arginine transporter from the human parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Mol Microbiol* 60:30-8.
121. Camargo EP, Coelho JA, Moraes G, Figueiredo EN. 1978. *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. and *Leptomonas* spp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. *Exp Parasitol* 46:141-4.
122. Boitz JM, Gilroy CA, Olenyik TD, Paradis D, Perdeh J, Dearman K, Davis MJ, Yates PA, Li Y, Riscoe MK, Ullman B, Roberts SC. 2017. Arginase Is Essential for Survival of *Leishmania donovani* Promastigotes but Not Intracellular Amastigotes. *Infect Immun* 85.
123. da Silva ER, Castilho TM, Pioker FC, Tomich de Paula Silva CH, Floeter-Winter LM. 2002. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. *Int J Parasitol* 32:727-37.
124. da Silva MF, Zampieri RA, Muxel SM, Beverley SM, Floeter-Winter LM. 2012. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. *PLoS One* 7:e34022.
125. D'Antonio EL, Ullman B, Roberts SC, Dixit UG, Wilson ME, Hai Y, Christianson DW. 2013. Crystal structure of arginase from *Leishmania mexicana* and implications for the inhibition of polyamine biosynthesis in parasitic infections. *Arch Biochem Biophys* 535:163-76.
126. Garcia AR, Oliveira DMP, Claudia FAA, Jesus JB, Renno Sodero AC, Souza AMT, Supuran CT, Vermelho AB, Rodrigues IA, Pinheiro AS. 2019. *Leishmania infantum* arginase: biochemical characterization and inhibition by naturally occurring phenolic substances. *J Enzyme Inhib Med Chem* 34:1100-1109.
127. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, Okwor IB, Beverley S, Uzonna JE. 2009. Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. *J Immunol* 183:8068-76.
128. Riley E, Roberts SC, Ullman B. 2011. Inhibition profile of *Leishmania mexicana* arginase reveals differences with human arginase I. *Int J Parasitol* 41:545-52.

129. Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B. 2004. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. J Biol Chem 279:23668-78.
130. Reguera RM, Balana-Fouce R, Showalter M, Hickerson S, Beverley SM. 2009. *Leishmania major* lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. Mol Biochem Parasitol 165:48-56.
131. Jiang Y, Roberts SC, Jardim A, Carter NS, Shih S, Ariyanayagam M, Fairlamb AH, Ullman B. 1999. Ornithine decarboxylase gene deletion mutants of *Leishmania donovani*. J Biol Chem 274:3781-8.
132. Genestra M, de Souza WJ, Cysne-Finkelstein L, Leon LL. 2003. Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania* sp. Med Microbiol Immunol 192:217-23.
133. Basu NK, Kole L, Ghosh A, Das PK. 1997. Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite, *Leishmania donovani*. FEMS Microbiol Lett 156:43-7.
134. Genestra M, Guedes-Silva D, Souza WJ, Cysne-Finkelstein L, Soares-Bezerra RJ, Monteiro FP, Leon LL. 2006. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. Arch Med Res 37:328-33.
135. Genestra M, Souza WJ, Guedes-Silva D, Machado GM, Cysne-Finkelstein L, Bezerra RJ, Monteiro F, Leon LL. 2006. Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. Arch Microbiol 185:348-54.
136. Almeida RP, Barral-Netto M, De Jesus AM, De Freitas LA, Carvalho EM, Barral A. 1996. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. Am J Trop Med Hyg 54:178-84.
137. Kebaier C, Louzir H, Chenik M, Ben Salah A, Dellagi K. 2001. Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response. Infect Immun 69:4906-15.
138. Souza VL, Veras PS, Welby-Borges M, Silva TM, Leite BR, Ferraro RB, Meyer-Fernandes JR, Barral A, Costa JM, de Freitas LA. 2011. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. Mem Inst Oswaldo Cruz 106:23-31.

139. Kwakye-Nuako G, Mosore MT, Duplessis C, Bates MD, Puplampu N, Mensah-Attipoe I, Desewu K, Afegbe G, Asmah RH, Jamjoom MB, Ayeh-Kumi PF, Boakye DA, Bates PA. 2015. First isolation of a new species of *Leishmania* responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex. *Int J Parasitol* 45:679-84.
140. Bates PA, Robertson CD, Tetley L, Coombs GH. 1992. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* 105 (Pt 2):193-202.
141. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47:349-58.
142. Rogers M, Kropf P, Choi BS, Dillon R, Podinovskaia M, Bates P, Muller I. 2009. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog* 5:e1000555.
143. Hart DT, Vickerman K, Coombs GH. 1981. A quick, simple method for purifying *Leishmania mexicana* amastigotes in large numbers. *Parasitology* 82:345-55.
144. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. 1994. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174:231-5.
145. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. 2006. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 80:1298-307.
146. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. 2008. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol* Chapter 14:Unit 14 1.
147. Scott P. 1985. Impaired macrophage leishmanicidal activity at cutaneous temperature. *Parasite Immunol* 7:277-88.
148. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141:2407-12.

149. Kropf P, Müller I, Brunson K. 2002. The leishmaniasis model, p 463-492, *Immunology of Infection* doi:10.1016/s0580-9517(02)32102-0.
150. Akhoundi M, Hajjaran H, Baghaei A, Mohebbali M. 2013. Geographical Distribution of *Leishmania* Species of Human Cutaneous Leishmaniasis in Fars Province, Southern Iran. *Iran J Parasitol* 8:85-91.
151. Padigel UM, Alexander J, Farrell JP. 2003. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol* 171:3705-10.
152. Rosas LE, Keiser T, Barbi J, Satoskar AA, Septer A, Kaczmarek J, Lezama-Davila CM, Satoskar AR. 2005. Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *Int Immunol* 17:1347-57.
153. Scott P, Novais FO. 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 16:581-92.
154. Hermida MD, Doria PG, Taguchi AM, Mengel JO, dos-Santos W. 2014. *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC Infect Dis* 14:450.
155. Spolarics Z, Bond JS. 1988. Multiple molecular forms of mouse liver arginase. *Arch Biochem Biophys* 260:469-79.
156. Sacks D, Noben-Trauth N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2:845-58.
157. Etges R, Muller I. 1998. Progressive disease or protective immunity to *Leishmania major* infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interactions. *J Mol Med (Berl)* 76:372-90.
158. Reiner SL, Locksley RM. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13:151-77.
159. Raes G, De Baetselier P, Noel W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh G. 2002. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol* 71:597-602.

160. Gordon S, Martinez FO. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32:593-604.
161. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176:287-92.
162. Kropf P, Herath S, Weber V, Modolell M, Muller I. 2003. Factors influencing *Leishmania major* infection in IL-4-deficient BALB/c mice. *Parasite Immunol* 25:439-47.
163. Carvalhal DG, Barbosa A, Jr., D'El-Rei Hermida M, Clarencio J, Pinheiro NF, Jr., Veras PS, dos-Santos WL. 2004. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. *Exp Parasitol* 107:189-99.
164. Pinheiro NF, Jr., Hermida MD, Macedo MP, Mengel J, Bafica A, dos-Santos WL. 2006. *Leishmania* infection impairs β_1 -integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 74:3912-21.
165. Badirzadeh A, Taheri T, Taslimi Y, Abdossamadi Z, Heidari-Kharaji M, Gholami E, Sedaghat B, Niyayati M, Rafati S. 2017. Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of *Leishmania* parasites. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0005774.
166. Chakour R, Guler R, Bugnon M, Allenbach C, Garcia I, Mael J, Louis J, Tacchini-Cottier F. 2003. Both the Fas ligand and inducible nitric oxide synthase are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with *Leishmania major* whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal. *Infect Immun* 71:5287-95.
167. Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB, Jr. 1993. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J Immunol* 151:907-15.
168. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 144:4794-7.
169. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM, Jr., Ratan RR. 2003. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4843-8.

170. Southan GJ, Szabo C, Thiernemann C. 1994. Inhibition of the induction of nitric oxide synthase by spermine is modulated by aldehyde dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1638-44.
171. Szabo C, Southan GJ, Thiernemann C, Vane JR. 1994. The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase: role of aldehyde metabolites. *Br J Pharmacol* 113:757-66.
172. D'Oliveira A, Jr., Machado P, Bacellar O, Cheng LH, Almeida RP, Carvalho EM. 2002. Evaluation of IFN- γ and TNF- α as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 35:7-10.
173. Gaafar A, Veress B, Permin H, Kharazmi A, Theander TG, el Hassan AM. 1999. Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol* 91:314-20.
174. Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. 2016. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health* 110:247-260.
175. Pompeu MM, Brodskyn C, Teixeira MJ, Clarencio J, Van Weyenberg J, Coelho IC, Cardoso SA, Barral A, Barral-Netto M. 2001. Differences in Gamma Interferon Production In Vitro Predict the Pace of the In Vivo Response to *Leishmania amazonensis* in Healthy Volunteers. *Infect Immun* 69:7453-60.

IX. ARTÍCULO DERIVADO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Wilkins-Rodríguez, A. A., Pérez-Torres, A., Escalona-Montaño, A. R., & Gutiérrez-Kobeh, L. (2020). Differential Regulation of L-Arginine Metabolism through Arginase 1 during Infection with *Leishmania mexicana* Isolates Obtained from Patients with Localized and Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. *Infection and immunity*, 88(7), e00963-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00963-1>



Differential Regulation of L-Arginine Metabolism through Arginase 1 during Infection with *Leishmania mexicana* Isolates Obtained from Patients with Localized and Diffuse Cutaneous Leishmaniasis

Arturo A. Wilkins-Rodríguez,^a Armando Pérez-Torres,^b Alma R. Escalona-Montaño,^a Laila Gutiérrez-Kobeh^a

^aUnidad de Investigación UNAM-INC, División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^bDepartamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

ABSTRACT L-Arginine metabolism through arginase 1 (Arg-1) and inducible nitric oxide synthase (NOS2) constitutes a fundamental axis for the resolution or progression of leishmaniasis. Infection with *Leishmania mexicana* can cause two distinct clinical manifestations: localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). In this work, we analyzed in an *in vivo* model the capacity of two *L. mexicana* isolates, one obtained from a patient with LCL and the other from a patient with DCL, to regulate the metabolism of L-arginine through Arg-1 and NOS2. Susceptible BALB/c mice were infected with *L. mexicana* isolates from both clinical manifestations, and the evolution of the infection as well as protein presence and activity of Arg-1 and NOS2 were evaluated. The lesions of mice infected with the DCL isolate were bigger, had higher parasite loads, and showed greater protein presence and enzymatic activity of Arg-1 than the lesions of mice infected with the LCL isolate. In contrast, NOS2 protein synthesis was poorly or not induced in the lesions of mice infected with the LCL or DCL isolate. The immunochemistry analysis of the lesions allowed the identification of highly parasitized macrophages positive for Arg-1, while no staining for NOS2 was found. In addition, we observed in lesions of patients with DCL macrophages with higher parasite loads and stronger Arg-1 staining than those in lesions of patients with LCL. Our results suggest that *L. mexicana* isolates obtained from patients with LCL or DCL exhibit different virulence or pathogenicity degrees and differentially regulate L-arginine metabolism through Arg-1.

KEYWORDS arginase 1, diffuse cutaneous leishmaniasis, L-arginine, *Leishmania mexicana*, localized cutaneous leishmaniasis, NOS2

The leishmaniasis are a group of vector-borne neglected diseases caused by different species of a protozoan parasite that belongs to the genus *Leishmania* and represent an important public health problem worldwide. In humans, at least 20 different species of *Leishmania* can be etiological agents of the leishmaniasis, originating different clinical manifestations that range from skin lesions (cutaneous leishmaniasis) and mucosal damages (mucocutaneous leishmaniasis) to life-threatening systemic infections that affect internal organs, principally liver, spleen, and bone marrow (visceral leishmaniasis) (1, 2). These different clinical forms result from complex interactions between the infecting *Leishmania* species and the host immune response to the infection. *Leishmania* parasites are transmitted between mammalian hosts, including humans, by the bite of female phlebotomine sand fly vectors. During a blood meal, sand flies inoculate the host skin with flagellated and motile *Leishmania* promastigotes, previously developed in the sand fly gut. Once in the skin of the host, *Leishmania* promastigotes invade several phagocytic cells, including neutrophils, den-

Citation Wilkins-Rodríguez AA, Pérez-Torres A, Escalona-Montaño AR, Gutiérrez-Kobeh L. 2020. Differential regulation of L-arginine metabolism through arginase 1 during infection with *Leishmania mexicana* isolates obtained from patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 88:e00963-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00963-19>.

Editor Jeroen P. J. Saeij, UC Davis School of Veterinary Medicine

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Laila Gutiérrez-Kobeh, lgutierr@unam.mx.

Received 5 January 2020

Returned for modification 27 January 2020

Accepted 31 March 2020

Accepted manuscript posted online 20 April 2020

Published 22 June 2020

dratic cells, monocytes, and macrophages, the latter being the primary host cells for *Leishmania* (2, 3). Within macrophages, promastigotes transform into and multiply as amastigote forms, which possess a nonvisible external flagellum and are responsible for the disease onset and progression in the mammalian host.

Leishmania has developed multiple strategies to evade or benefit from the host immune response and ensure its survival within the host. Among these strategies, the regulation of the catabolism of L-arginine via the inducible nitric oxide synthase (NOS2) and arginase-1 (Arg-1) has arisen as a critical pathway involved in leishmaniasis establishment and progression. In this context, macrophages can either kill or host intracellular *Leishmania* parasites depending on their ability to metabolize L-arginine through NOS2 or Arg-1, whose expression is differentially induced and regulated in these phagocytes, according to their activation status (4–7). In classically activated macrophages (M1 or inflammatory macrophages), Th1 cytokines (e.g., gamma interferon [IFN- γ] and tumor necrosis factor alpha [TNF- α]) induce the expression and function of NOS2, which oxidizes L-arginine into L-citrulline and nitric oxide, the latter being a free radical that mediates one of the most potent mechanisms to eliminate intracellular *Leishmania* parasites (7–12). On the other hand, in alternatively activated macrophages (M2 or wound-healing macrophages), Th2 cytokines (e.g., interleukin 4 [IL-4], IL-10, and IL-13) induce the expression and function of Arg-1, which hydrolyzes L-arginine into urea and L-ornithine, the latter being a precursor for the synthesis of polyamines (small and polycationic molecules that participate in several cellular processes such as differentiation, DNA replication, and protein translation), which are essential for *Leishmania* intramacrophage survival and proliferation (5–7, 9, 11, 12).

Experimental models have demonstrated a critical role for L-arginine metabolism via Arg-1 in the pathogenesis of murine leishmaniasis. Indeed, in nonhealing cutaneous leishmaniasis models, high levels of Arg-1 and its activity have been detected locally within the lesions of mice, correlating this fact with an uncontrolled growth and elevated loads of *Leishmania* parasites (6, 13). In this line, in nonhealing lesions, an accumulation of high numbers of alternative activated macrophages has been revealed, which in turn promote *Leishmania* parasite growth via polyamine synthesis due to L-arginine metabolism through Arg-1 (6, 14). In addition to the direct promotion of *Leishmania* parasite multiplication via polyamine synthesis, high Arg-1 expression and activity in alternatively activated macrophages and other myeloid cells have also been shown to modulate T cell immune responses against *Leishmania* infection by reducing the bioavailability of L-arginine in the microenvironment (6, 14, 15). Due to the fact that T cells are extremely susceptible to L-arginine starvation, a low availability of this amino acid makes them hyporesponsive to antigen stimulation besides affecting their proliferation and effector functions (15). Moreover, *Leishmania* parasites harbor their own arginase, whose activity has been demonstrated to be essential for their replication and infectivity, both *in vitro* and *in vivo* (16–24).

Contrary to the identified role of Arg-1 in disease exacerbation, the expression and function of NOS2 has been demonstrated to be decisive for *Leishmania* parasite killing and infection resolution in experimental murine cutaneous leishmaniasis (25–27). Within this context, a marked expression and activity of NOS2, which correlates with few or no parasites, has been identified in skin lesions of mice resistant to *Leishmania* infection (26, 27). Additionally, macrophages infiltrating the lesions of these resistant mice have been shown to express NOS2 (27), a fact that suggests the presence and importance of classically activated macrophages in healing lesions. In the same way that *Leishmania* parasites harbor their own arginase, a *Leishmania*-derived nitric oxide synthase has also been reported and associated with the infectivity of the parasite and/or a mechanism to evade host immune responses (28, 29).

In Mexico, *Leishmania mexicana* is the main etiological agent responsible for cutaneous leishmaniasis and can cause two main different clinical manifestations in patients: localized cutaneous leishmaniasis (LCL), characterized by the development of an ulcer at the sites of parasite inoculation, and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), where parasites spread throughout the skin, forming multiple disfiguring nodules (30,

TABLE 1 Clinical data of patients from which *Leishmania mexicana* isolates were obtained

Pathology	Sex	Age at the beginning of the disease (yrs)	Duration of disease (mo)	No. of nodules	No. of ulcers	Treatment
LCL	M	28	1	0	1	None
DCL	F	6	360	>300	0	Intermittent ^a

^aPatient had received, intermittently, meglumine antimoniate (intramuscularly, at a dose of 20 mg/kg body weight per day) as treatment for different periods along the course of the disease. At the time when the isolate was obtained, the patient was under disease relapse and not receiving treatment.

31). The factors determining the development of LCL or DCL after infection with *L. mexicana* remain unclear. In patients, LCL has been associated with a polarized Th1 immune response against *L. mexicana* infection and low macrophage parasite loads, whereas DCL has been associated with a polarized Th2 response and high macrophage parasite loads (32–34).

In the present study, we tested in an *in vivo* murine model the hypothesis that an *L. mexicana* isolate obtained from a patient with LCL and an *L. mexicana* isolate obtained from a patient with DCL differentially regulate L-arginine metabolism through Arg-1 and NOS2, influencing the infection course and severity in the host. Furthermore, we examined the participation of macrophages and their activation status in this process. Finally, we analyzed the differential expression of Arg-1 and NOS2 in biopsy specimens obtained from Mexican patients with LCL and DCL.

RESULTS

Molecular and morphological characterization of *Leishmania mexicana* isolates. Two isolates of *L. mexicana* obtained from Mexican patients, one with localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and the other with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), were used throughout the present study (Table 1). Both isolates were identified as *L. mexicana* after performing restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses of the internal transcribed spacer 1 (ITS1; the DNA sequence separating the genes coding for the small subunit and for the 5.8S large subunit of rRNA), which was amplified by PCR and digested with HaeIII restriction enzyme (Fig. 1A and B). It has been shown that the ITS1 region is highly variable in size and nucleotide sequence among *Leishmania* species, and its digestion with restriction enzymes after PCR amplification allows identification of most *Leishmania* species of medical importance (35). Amplification by PCR of ITS1 from the two *L. mexicana* isolates obtained from patients, an *L. mexicana* reference strain (positive control), and a *Leishmania major* reference strain (nonrelated species control) resulted in a 300- to 350-bp-length product (Fig. 1A), the size reported for *Leishmania* ITS1 (35). Further digestion of ITS1 amplicons with the HaeIII restriction enzyme resulted in different *Leishmania* species RFLP patterns (Fig. 1B). A pattern with three fragments of 188, 88, and 60 bp each, which is characteristic for *L. mexicana* (35), was obtained for the two isolates obtained from patients and for the *L. mexicana* reference strain (Fig. 1B). In contrast, a pattern with two fragments of 220 and 130 bp each, which is characteristic for *L. major* (36), was obtained for the *L. major* reference strain (Fig. 1B).

For experiments, *L. mexicana* isolates obtained from patients were cultured and used as amastigotes, due to the fact that when *Leishmania* is maintained in culture, this stage of the parasite is more infective for experimental mouse inoculation than stationary-phase promastigotes (37). Interestingly, amastigotes of *L. mexicana* isolates displayed some different growth patterns when cultured *in vitro*. Among these, the most notable difference was in the contact between amastigotes (cell to cell) when growing (Fig. 1C and D). Amastigotes of the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with LCL grew mainly as individual cells (Fig. 1C), while amastigotes of the isolate obtained from the patient with DCL grew mostly forming tight and large clusters (Fig. 1D). Importantly, these differences were maintained when the isolates were passaged periodically through mice to preserve virulence.

Susceptible mice infected with *Leishmania mexicana* isolates obtained from LCL and DCL patients exhibit lesions with different sizes and parasite loads as well

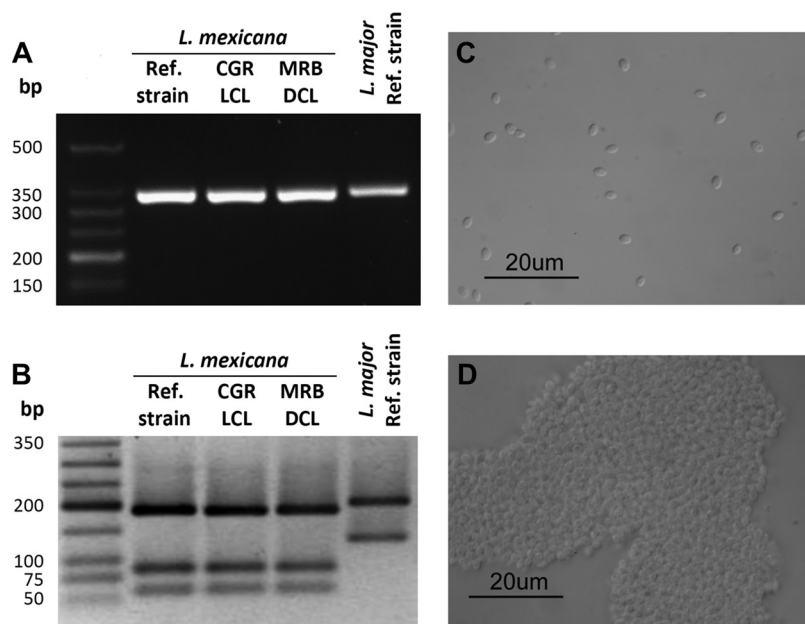


FIG 1 Characterization of *Leishmania mexicana* isolates. Two *L. mexicana* isolates were obtained from Mexican patients: one with LCL and the other with DCL. Isolates were adapted to *in vitro* culture and maintained as axenic amastigotes. Amastigotes of *L. mexicana* and promastigotes of *L. major* from reference strains were used as controls. DNA was purified from *Leishmania* parasites by using phenol chloroform and used for identification of isolates as *L. mexicana* species by *Leishmania* ITS1 PCR-RFLP analysis. (A) *Leishmania* ITS1 was amplified by PCR, and the obtained amplicons were resolved on 2% ethidium bromide-stained agarose gels. (B) Amplicons obtained from ITS1 PCR were further digested with *HaeIII* restriction enzyme, and obtained fragments giving RFLP patterns were separated on 3% ethidium bromide-stained agarose gels. Micrographs showing growth patterns of axenic culture-maintained amastigotes from isolates obtained from a patient with LCL (C) and from a patient with DCL (D). Bars, 20 μ m.

as a differential migration of parasites to draining lymph nodes. After characterization, we analyzed if the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with LCL and the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with DCL showed differences in behavior during infection in a murine leishmaniasis model. As a first approach to evaluate this issue, BALB/c mice, which have been demonstrated to be highly susceptible to *L. mexicana* infection (38–40), were inoculated in the footpad with both isolates, and sizes of developed lesions were measured every 7 days during a 4-week period, followed by a final evaluation made 8 weeks postinfection (Fig. 2A). Lesions in mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with DCL became apparent during the first week of infection, while lesion onset in mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with LCL occurred during the second week of infection (Fig. 2A). From the second up to the eighth week of infection, mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with DCL developed bigger lesions (almost twice the size) than mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with LCL (Fig. 2A). Furthermore, we determined the number of parasites present in the footpad lesions of mice at 4 and 8 weeks after infection, as another parameter to evaluate the differential behavior of the *L. mexicana* isolates during infection (Fig. 2B). At the fourth week of infection, footpad lesions of mice inoculated with the isolate obtained from the patient with DCL exhibited higher parasite loads (at least three times more) than the lesions of mice inoculated with the isolate from the patient with LCL (Fig. 2B). At the eighth week of infection, footpad lesions in both groups of mice showed higher parasite loads than those observed at the fourth week of infection; however, parasite numbers between the two groups were similar (Fig. 2B).

In murine experimental models, cutaneous infection of BALB/c mice with *L. mexicana* generally results in the development of progressive, nonhealing, and chronic

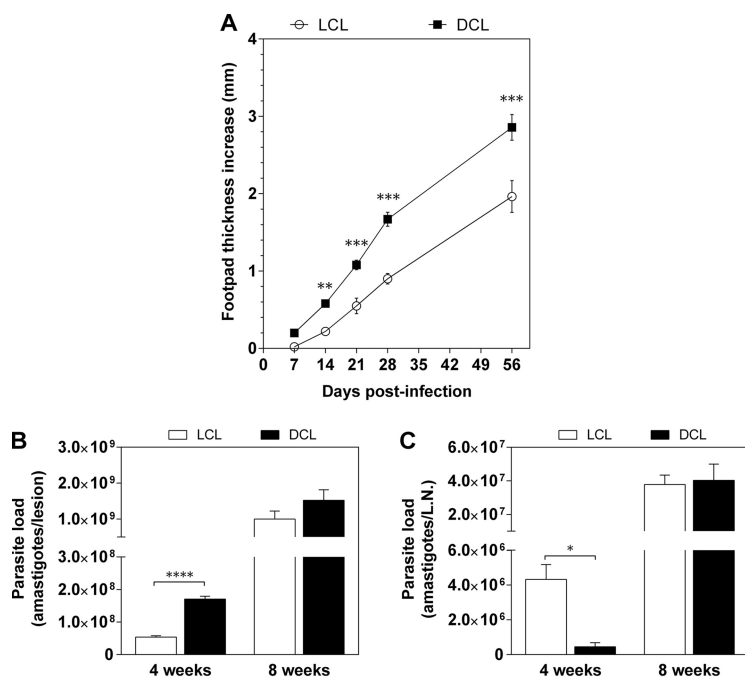


FIG 2 Susceptible mice infected with *Leishmania mexicana* isolates obtained from LCL and DCL patients exhibit lesions with different sizes and parasite loads as well as differential migration of parasites to draining lymph nodes. BALB/c mice were infected subcutaneously into the right hind footpads with 5×10^6 *L. mexicana* axenic amastigotes from isolates obtained from LCL and DCL patients. (A) The course of lesion development (ten mice per group) was monitored every 7 days during a 4-week period, followed by a final evaluation made 8 weeks postinfection, by measuring the footpad thickness increase. Parasite loads were determined in footpad lesion (B) and popliteal lymph node (C) homogenates from mice (four mice per group) after 4 and 8 weeks of infection. Data are expressed as the means \pm SEMs and are representative of at least two independent experiments. L.N., lymph node; *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$.

lesions (38). Moreover, it has been shown that in progressive forms of murine cutaneous leishmaniasis, parasites are continuously detected in lesions as well as in the lymph nodes draining them (41). Consequently, we also evaluated the presence and abundance of parasites in the popliteal lymph nodes (pLNs) of mice infected for 4 and 8 weeks with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with LCL and with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with DCL (Fig. 2C). At the fourth week of infection, we were able to detect the presence of parasites in the pLNs of mice infected with both *L. mexicana* isolates, and surprisingly, pLNs of mice inoculated with the isolate obtained from the patient with LCL exhibited higher parasite loads (almost ten times more) than the pLNs of mice inoculated with the isolate from the patient with DCL (Fig. 2C). However, at the eighth week of infection, pLNs of both groups of mice showed higher parasite loads than those observed at the fourth week of infection; nevertheless, parasite numbers between the two groups were similar (Fig. 2C).

It should be noted that the clear differences found in the parasite loads after 4 weeks of infection with the two *L. mexicana* isolates were probably masked at the eighth week of infection by the tendency of BALB/c mice to develop chronic lesions when infected with *L. mexicana*.

Arg-1 and NOS2 protein presence is differentially regulated in the lesions of susceptible mice infected with *Leishmania mexicana* isolates obtained from LCL and DCL patients. Using *in vivo* murine experimental models, it has been demonstrated that Arg-1 is induced during disease development after infection with different *Leishmania* species (13, 42, 43); furthermore, the presence of this enzyme at the site of infection has been correlated with proliferation of the parasite and disease progression (6, 19, 21). On the other hand, NOS2 presence at the site of infection has been correlated with parasite clearance and disease resolution in the *L. major* murine model (13, 26, 27). Thus, we analyzed if infection with the *L. mexicana* isolate obtained from

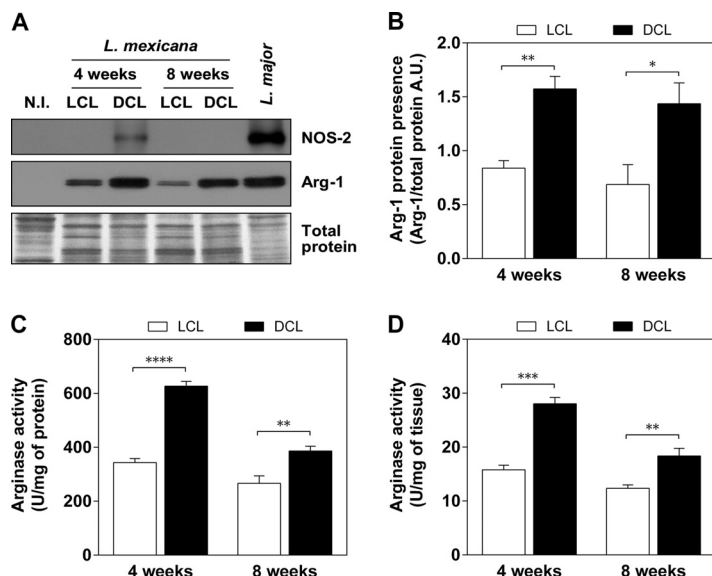


FIG 3 Arg-1 and NOS2 protein presence and activity are differentially regulated in the lesions of susceptible mice infected with *Leishmania mexicana* isolates obtained from LCL and DCL patients. BALB/c mice (four mice per group) were infected subcutaneously in the right hind footpads with 5×10^6 *L. mexicana* axenic amastigotes from isolates obtained from LCL and DCL patients. (A) Arg-1 and NOS2 protein levels were evaluated in footpad lesion homogenates by Western blotting after 4 and 8 weeks of infection. Footpad lesion homogenates from mice infected with *L. major* were used as control for NOS2 protein presence. Coomassie blue staining of total protein in the membrane was used for the loading control. For the Western blot image, lesion homogenates from mice belonging to each group were pooled, and the protein presence of Arg-1 and NOS2 was evaluated. (B) Densitometric values (expressed in arbitrary units [A.U.]) for Arg-1 protein presence were calculated as the ratio of Arg-1 and total protein band intensities detected in the lesion homogenates from all mice for each group. Arg-1 activity, expressed as units per milligram of protein (C) or units per milligram of tissue (D), was determined by enzymatic assay performed in footpad lesion homogenates from mice infected for 4 and 8 weeks. Data are expressed as the means \pm SEMs and are representative of at least two independent experiments. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$.

the patient with LCL and infection with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with DCL resulted in differential protein synthesis of Arg-1 and NOS2 in BALB/c mice. For this purpose, footpad lesions of infected mice were removed at 4 and 8 weeks of infection for tissue homogenization, and the presence of Arg-1 and NOS2 was detected by Western blotting (Fig. 3A). The assays demonstrated that infection with both *L. mexicana* isolates led to Arg-1 protein synthesis, with higher expression levels (almost two times more) of this enzyme detected in the lesions of mice infected with the isolate obtained from the patient with DCL than in the lesions of mice infected with the isolate obtained from the patient with LCL (Fig. 3A and B). Regarding NOS2 presence, interestingly, this protein was expressed at lower levels only in the lesions of mice infected for 4 weeks with the isolate obtained from the patient with DCL (Fig. 3A). In addition, lesions of C57BL/6 mice infected for 4 weeks with *L. major* were used as a positive control to analyze NOS2 protein presence by Western blotting, which showed an intense band for this protein (Fig. 3A).

Arg-1 enzymatic activity is differentially regulated in lesions of susceptible mice infected with *Leishmania mexicana* isolates obtained from LCL and DCL patients. Once we determined that the *L. mexicana* isolates obtained from patients with LCL and DCL differentially upregulated Arg-1 protein synthesis at the site of infection, we evaluated if this upregulation at the protein synthesis level paralleled enzyme activity. For this aim, arginase activity was determined in the lesion homogenates of mice infected with these *L. mexicana* isolates for 4 and 8 weeks (Fig. 3C and D). The obtained data revealed, at both times postinfection, higher arginase activity values, expressed either as units per milligram of protein (Fig. 3C) or as units per milligram of tissue (Fig. 3D), in the lesions of mice infected with the *L. mexicana* isolate

obtained from the patient with DCL than in the lesions of mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with LCL. Interestingly, even though arginase activity in the lesions of mice infected with any of the isolates diminished at 8 weeks of infection compared to the levels found at 4 weeks, the activity registered in the lesions of mice infected with the isolate obtained from the patient with DCL was always higher than the one obtained after infection with the isolate obtained from the patient with LCL. In relation to NOS2 activity, although a minimal presence of NOS2 was detected in the lesions of mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with DCL, we tried to determine the activity of this enzyme by quantifying nitrites present in the tissue using the Griess reaction; however, we were not able to detect any nitrite levels (data not shown).

Lesions and draining lymph nodes of susceptible mice infected with *Leishmania mexicana* isolates obtained from LCL and DCL patients exhibit similar production of IL-4 and IL-10 but different production of IFN- γ . The murine infection model with *L. major* has demonstrated a host resistance or susceptibility to the disease depending on the development of a polarized Th1 or Th2 immune response, respectively (44). In this regard, host ability to the control of infection has been associated with the expansion of CD4⁺ Th1 cells, which produce IFN- γ . In contrast, host impossibility to control the infection has been associated with the expansion of CD4⁺ Th2 cells, which produce IL-4, IL-10, and IL-13 (6, 44–46). Furthermore, it has been demonstrated that induction of Arg-1 in the host, driven by IL-4 and IL-10, is clearly associated with the susceptibility to the infection, where the presence and activity of this enzyme clearly parallel lesion development and parasite burden increase (6, 13). Consequently, we analyzed if the changes that we observed in the induction of Arg-1 protein and activity in the lesions and lymph nodes of susceptible BALB/c mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with LCL and the isolate obtained from the patient with DCL were related to changes in the production of Th1 and Th2 cytokines during the infection course. For this aim, we assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) the production of IL-4, IL-10, and IFN- γ in footpad lesions and pLN homogenates of infected mice. There were no significant differences in the production of IL-4 and IL-10 between footpad lesions of mice infected with each of the *L. mexicana* isolates, either at 4 or at 8 weeks postinfection; however, both cytokine levels increased according to disease progression (Fig. 4A and B). Importantly, when comparing the amounts of both cytokines, we noticed that IL-10 levels were around ten times higher than those observed for IL-4 (Fig. 4A and B). Regarding IL-4 and IL-10 production in the pLNs, also, no changes in the production of these cytokines were detected between the groups of mice after 8 weeks of infection (Fig. 4A and B). With respect to IFN- γ production, interestingly, the infection of mice with the isolate obtained from the patient with DCL elicited a higher production of IFN- γ than the infection with the isolate obtained from the patient with LCL, both in the footpad lesions and pLNs, after 8 weeks of infection (Fig. 4C). Contrarily, there were no differences in the production of IFN- γ in the footpad lesions of mice infected for 4 weeks (Fig. 4C).

Lesions of susceptible mice infected with *Leishmania mexicana* isolates obtained from LCL and DCL patients contain macrophages with an alternatively activated phenotype. Arg-1 has been found in different cell types, including macrophages, dendritic cells, myeloid-derived suppressor cells, and granulocytes, among others, and the expression of this enzyme in such myeloid cells has been proved to be induced by IL-4, IL-13, and IL-10 Th2 cytokines (12, 47, 48). Macrophages are the main host cells for *Leishmania* parasites and can be instructed to host or kill this parasite depending on their activation status, which influences L-arginine metabolism through Arg-1 and NOS2 (5, 6). Classically activated macrophages upregulate the NOS2 enzyme, which metabolizes L-arginine into nitric oxide, a powerful leishmanicidal agent that contributes to parasite killing. Contrarily, alternatively activated macrophages upregulate the Arg-1 enzyme, which metabolizes L-arginine into polyamines, which allow parasite persistence and proliferation (5, 6). Given these facts, after determining the presence and activity of Arg-1 and NOS2 in the homogenates of lesions from suscep-

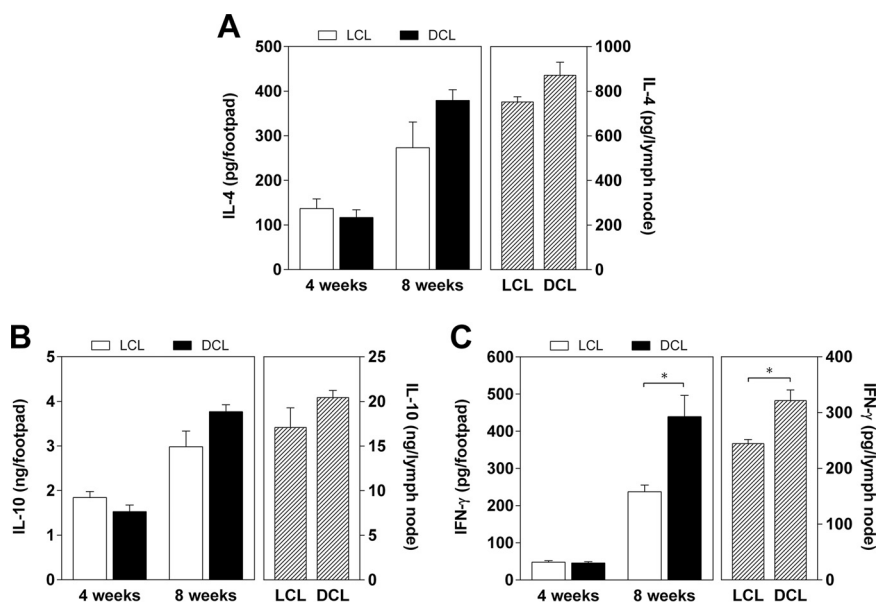


FIG 4 Lesions and draining lymph nodes of susceptible mice infected with *Leishmania mexicana* isolates obtained from LCL and DCL patients exhibit similar production of IL-4 and IL-10 but different production of IFN-γ. Footpad lesions of mice infected with isolates obtained from LCL and DCL patients were removed after 4 or 8 weeks of infection, while popliteal lymph nodes were removed after 8 weeks of infection. Excised tissues were homogenized, and IL-4 (A), IL-10 (B), and IFN-γ (C) expression levels were quantified by ELISA. Data are the means ± SEMs from three independent experiments. *, $P \leq 0.05$.

tible BALB/c mice infected with the *L. mexicana* isolates obtained from patients with LCL and DCL, we next decided to identify, by immunohistochemistry, the presence of both enzymes in the lesions and if macrophages were expressing them. Lesions of mice infected with both *L. mexicana* isolates showed abundant Arg-1-positive cells harboring *Leishmania* amastigotes and morphologically identifiable as macrophages (Fig. 5A). In addition, these cells were shown to be positive for the macrophage marker F4/80 (Fig. 5B, representative staining for F4/80 in a tissue section of a lesion from a mouse infected with the isolate obtained from the DCL patient is shown). Interestingly, in lesions of mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with DCL, macrophages showed more intense and widespread Arg-1 staining and seemed more heavily parasitized than the macrophages present in lesions of mice infected with the LCL isolate (Fig. 5A). In murine macrophages, L-arginine metabolism through Arg-1 and NOS2 is one of the most-used criteria to identify alternatively activated macrophages and classically activated macrophages, respectively (12, 49). Thus, the presence of Arg-1 in the macrophages allowed us to suggest an alternative activation status for these cells. To further corroborate this idea, we evaluated the presence, in the lesions of infected mice, of another characteristic marker of alternative activated murine macrophages, the chitinase-like secretory protein YM-1 (50). In this line, we first detected by Western blotting the presence of YM-1 in lesion lysates from mice infected with both *L. mexicana* isolates (Fig. 5D), and thereafter we performed immunohistochemistry assays which allowed us to detect this protein in macrophages expressing Arg-1 and harboring *Leishmania* amastigotes (Fig. 5A). On the other hand, immunohistochemistry against NOS2 revealed no presence of this enzyme in the lesions of mice infected with either of the *L. mexicana* isolates (Fig. 5A). Detection by immunohistochemistry of NOS2 in lesions of C57BL/6 mice infected with *L. major* was used as a positive control for the experiments (Fig. 5C).

Lesions of Mexican patients with LCL and DCL contain macrophages with different Arg-1 and NOS2 expression as well as parasite load. After immunohistochemical analysis of Arg-1 and NOS2 presence in lesions of mice infected with the *L. mexicana* isolates obtained from patients with LCL and DCL, we pursued the same

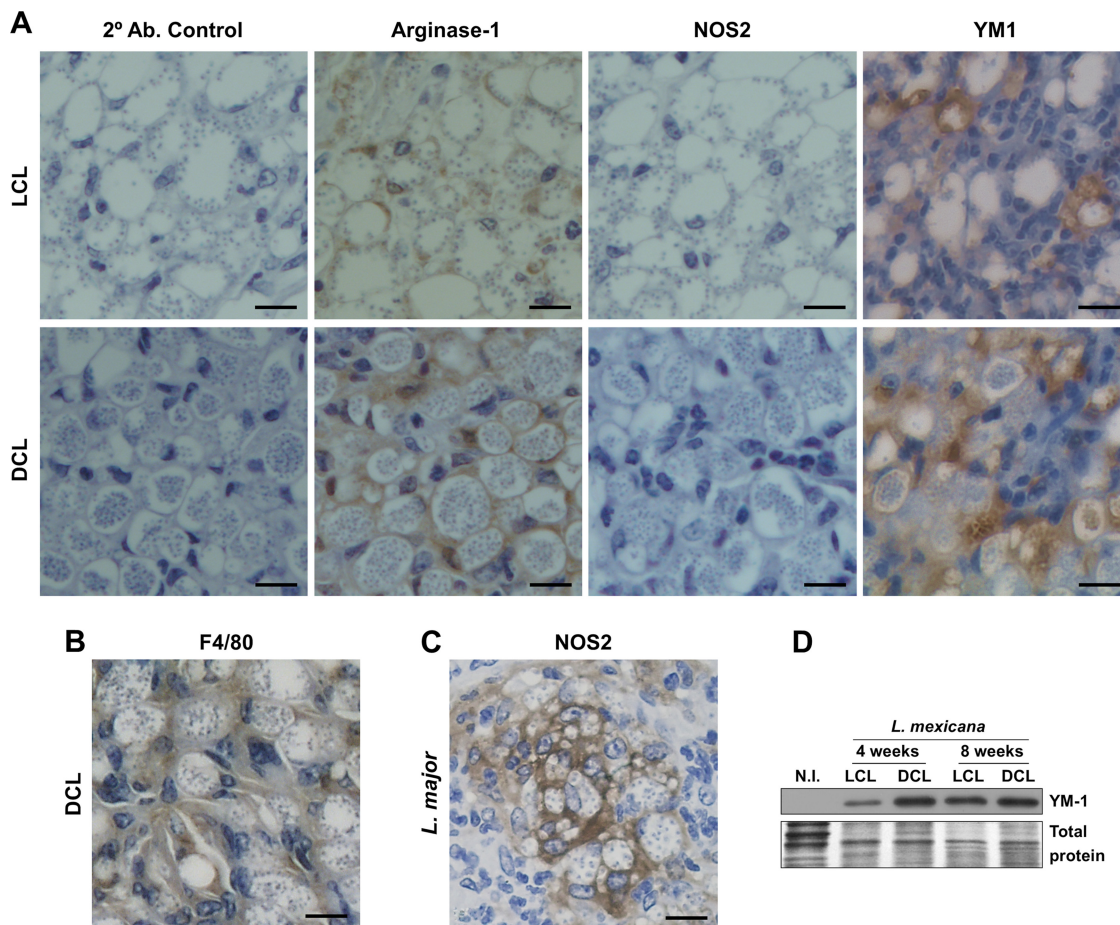


FIG 5 Lesions of susceptible mice infected with *Leishmania mexicana* isolates obtained from LCL and DCL patients contain macrophages with an alternatively activated phenotype. BALB/c mice (three mice per group) were infected subcutaneously in the right hind footpads with 5×10^6 *L. mexicana* axenic amastigotes from isolates obtained from LCL and DCL patients or 5×10^6 *L. major* promastigotes. After 8 weeks of infection, footpad lesions were dissected and processed for immunohistochemistry as described in Materials and Methods. (A) Tissue sections were incubated with specific primary antibodies against arginase-1, NOS2, and YM-1, followed by incubation with an HRP-conjugated secondary antibody. Immunolabeling was developed with DAB and further counterstained with Gill's hematoxylin. Sections incubated only with the secondary antibody were used as a control for unspecific staining. (B) F4/80 staining in a tissue section of a lesion from a mouse infected with DCL isolate is shown as representative for macrophage identification. (C) Staining for NOS2 in tissue sections of lesions from C57BL/6 mice infected with 5×10^6 *L. major* promastigotes was used as positive control for NOS2 detection. (D) YM-1 protein presence was also evaluated by Western blotting in footpad lesion homogenates from mice 4 and 8 weeks after infection. Coomassie blue staining of total protein in the membrane was used for the loading control. Bars, 10 μ m. Micrographs are representative of the sections from two independent experiments.

analysis in lesion biopsy specimens obtained from Mexican patients diagnosed with LCL and DCL. The lesions of patients with both types of cutaneous leishmaniasis showed Arg-1-positive cells harboring *Leishmania* amastigotes and morphologically identifiable as macrophages (Fig. 6A). In addition, these cells were shown to be positive for the macrophage marker CD68 (Fig. 6B, representative staining for CD68 in a tissue section of a lesion from a patient with DCL is shown). Interestingly, lesions of DCL patients showed macrophages with greater Arg-1 expression and were more heavily parasitized than those found in the lesions of LCL patients (Fig. 6A). Regarding NOS2 detection, immunohistochemistry staining revealed that only macrophages in the lesions of patients with LCL were positive for this enzyme (Fig. 6A).

Amastigotes in lesions of susceptible mice infected with *Leishmania mexicana* isolates obtained from LCL and DCL patients exhibit different protein presence and enzymatic activity of *Leishmania*-harbored arginase. Due to the fact that *Leishmania* parasites also express an arginase and a nitric oxide synthase, which have been proposed as virulence factors (16–24, 28, 29), we analyzed the presence and

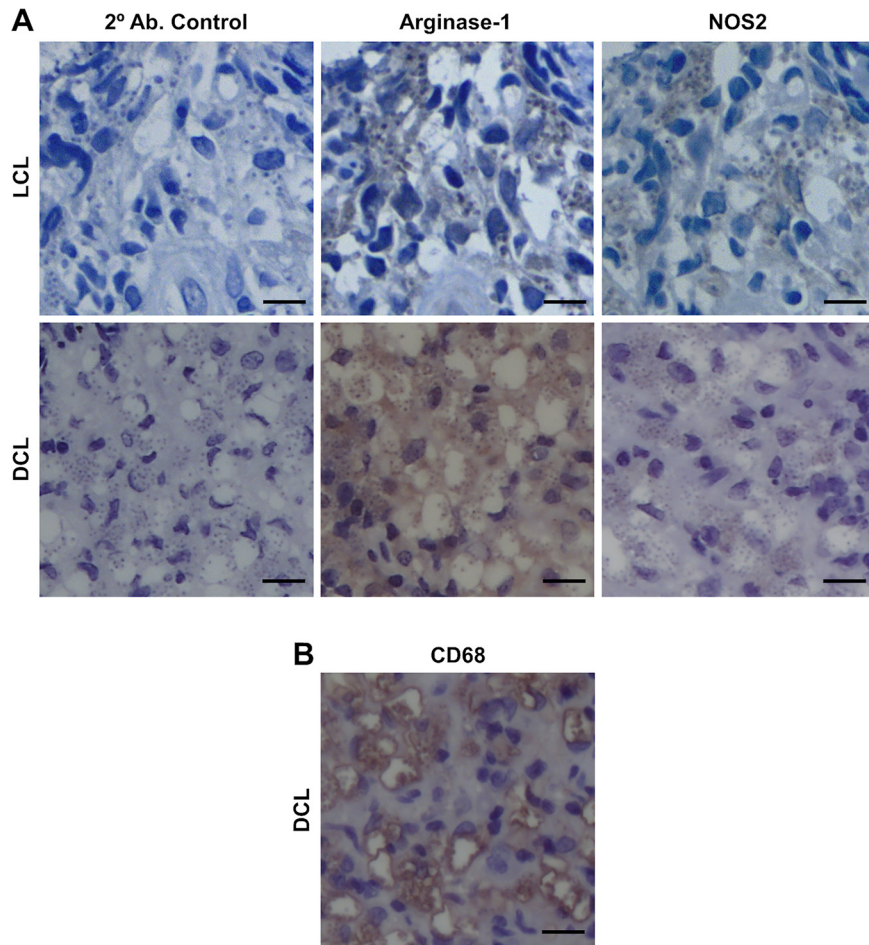


FIG 6 Lesions of Mexican patients with LCL and DCL contain macrophages with different Arg-1 and NOS2 expression as well as parasite load. Biopsy specimens from lesions of Mexican patients with LCL and DCL were taken and processed for immunohistochemistry as described in Materials and Methods. (A) Tissue sections of biopsy specimens were incubated with specific primary antibodies against arginase-1 and NOS2, followed by incubation with an HRP-conjugated secondary antibody. Immunolabeling was developed with DAB and further counterstained with Gill's hematoxylin. Sections incubated only with the secondary antibody were used as control for unspecific staining. (B) CD68 staining in a tissue section of a lesion from the patient with DCL is shown as representative for macrophage identification. Bars, 10 μ m. Micrographs are representative of the sections from two LCL patient biopsy specimens and from three DCL patient biopsy specimens.

functionality of these enzymes in amastigotes directly purified from lesions of mice infected with *L. mexicana* isolates obtained from patients with LCL and DCL. In Western blot experiments, a *Leishmania*-harbored arginase was only detected in the extracts of amastigotes purified from lesions of mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with DCL (Fig. 7A). Arginase activity assays detected a much higher arginase activity (almost 20 times more) in the extracts of amastigotes purified from lesions of mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with DCL than in those purified from lesions of mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with LCL (Fig. 7B), in which *Leishmania* arginase protein was not detected by Western blotting (Fig. 7A). Regarding *Leishmania*-harbored nitric oxide synthase, neither the protein (Fig. 7A) nor activity of the enzyme (data not shown) was detected in the extracts of amastigotes purified from lesions of mice infected with any of the *L. mexicana* isolates.

DISCUSSION

In the present study, we examined in an *in vivo* model the ability of two *Leishmania mexicana* isolates, one obtained from a patient with LCL and another obtained from a

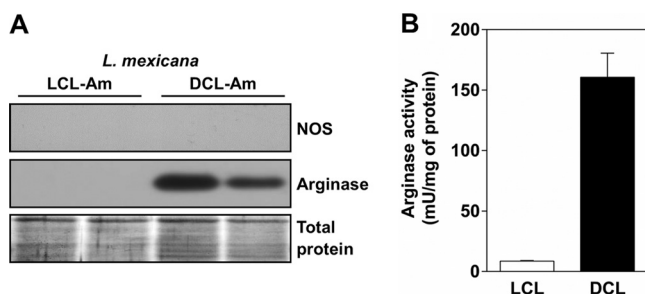


FIG 7 Amastigotes in lesions of susceptible mice infected with *Leishmania mexicana* isolates obtained from LCL and DCL patients exhibit different protein presence and enzymatic activity of *Leishmania*-harbored arginase. BALB/c mice (three mice per group) were infected subcutaneously in the right hind footpads with 5×10^6 *L. mexicana* axenic amastigotes from isolates obtained from LCL and DCL patients. After 8 weeks of infection, *Leishmania* amastigotes were purified from footpad lesions and lysed. (A) Amastigote lysates were tested for *Leishmania* arginase and NOS protein presence by Western blotting. Indian ink staining of total proteins in the membrane was used for the loading control. (B) Arginase activity, expressed as milliunits (mU) per milligram of protein, was determined in amastigote lysates by enzymatic assay. For the Western blot image, the protein presence of Arg-1 and NOS2 in the homogenates from only two mice is shown. Data are expressed as the means \pm SEMs and are representative of at least two independent experiments.

patient with DCL, to differentially regulate L-arginine metabolism through Arg-1 and NOS2. In our model, we inoculated BALB/c mice with these isolates, due to the high susceptibility of this mouse strain to *L. mexicana* infection (39). First, we assessed the pathogenic behavior of the isolates during experimental infection by analyzing the size and parasite loads of the developed lesions as well as the dissemination of the parasites to the lymph nodes. We observed that, despite belonging to the same *Leishmania* species, the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with DCL exhibited greater virulence than the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with LCL. This was reflected by the development of lesions that were bigger and harbored higher parasite numbers in mice infected with the isolate obtained from the patient with DCL than those developed in mice infected with the isolate obtained from the patient with LCL. In agreement with our observations, other studies have also highlighted differences in the evolution time of lesions and their parasitic loads in mice infected with different strains and isolates of *L. major* and *Leishmania amazonensis* (51–53). Regarding the dissemination of parasites from lesions to the lymph nodes, contrary to our findings in the footpad lesions, we detected greater parasite loads in the lymph nodes of mice infected with the isolate obtained from the patient with LCL than in the lymph nodes of mice infected with the isolate obtained from the patient with DCL. This fact could be related to reported findings that propose an impairment in the ability of phagocytes heavily infected with *Leishmania*, which we have routinely observed in the lesions of mice infected with the isolate obtained from the patient with DCL, to exit from the infection site and migrate to the lymph nodes (41, 54, 55).

A clear association between Arg-1 presence and activity, uncontrolled replication of parasites, and increase in size has been found in the lesions of susceptible mice infected with *Leishmania* parasites (6, 13, 56). Here, we demonstrate higher Arg-1 expression and activity levels, accompanied by an increase in size and parasite load, in the lesions of susceptible mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the DCL patient than in the lesions of mice infected with the isolate obtained from the patient with LCL. Due to the fact that we found the isolate obtained from the patient with DCL more pathogenic than the isolate obtained from the patient with LCL, our findings are in line with others where it has been shown that lesions of susceptible mice infected with a more pathogenic *Leishmania* species, e.g., *L. major*, exhibit higher arginase activity and bigger size than the lesions of mice infected with a less pathogenic species, e.g., *Leishmania tropica* (56).

On the other hand, NOS2 expression and subsequent nitric oxide production in the tissues of mice clinically resistant to *L. major* infection have been closely associated with

disease amelioration and lesion healing in experimental cutaneous leishmaniasis (26, 27, 57–59). In our experiments, we found very little (compared to the lesions of C57BL/6 resistant mice infected with *L. major*, used here as positive controls for NOS2 expression) or no presence of NOS2 in the lesions of mice infected with the *L. mexicana* isolates obtained from patients with LCL and DCL, with no impact in the progression of the infection. Given the fact that a reciprocal regulation of NOS2 and Arg-1 exists (9, 48), we find possible that the increased upregulation of Arg-1 induced during the infection of susceptible mice infected with the *L. mexicana* isolates could have impaired NOS2 expression by decreasing the availability of L-arginine, which has been demonstrated to be needed for NOS2 translation (60), or by the production of polyamines such as spermine and spermidine, which have been found capable to suppress the induction of NOS2 (61–63).

In experimental murine cutaneous leishmaniasis, progressive infection in mice is associated with IL-4, IL-10, and IL-13 production (44–46), which in turn induce Arg-1 expression and function, leading to an excessive parasite proliferation and uncontrolled disease pathology (4–6, 13). In this line, we detected similar amounts of IL-4 or IL-10 in the lesions and in the lymph nodes of mice infected with either of the two *L. mexicana* isolates obtained from patients. This observation suggests that the differential expression and function of Arg-1 observed in the lesions of mice was not dependent on the capability of the isolates to induce the production of higher or lower levels of each of these Th2 cytokines. Given the pivotal role of IFN- γ in leishmaniasis, we also evaluated the presence of this cytokine. Regardless, we detected higher levels of IFN- γ in the lesions and lymph nodes of mice infected with the isolate obtained from the patient with DCL than in those of mice infected with the isolate obtained from the patient with LCL; these differences were not reflected either in NOS2 expression and function or disease amelioration. Our findings agree with different clinical studies that have demonstrated the presence of IFN- γ in the lesions of patients with cutaneous leishmaniasis; moreover, a positive correlation of lesion size with IFN- γ expression levels has been well documented (64–67).

It is well known that macrophages are the main host cells for *Leishmania* parasites, and elegant studies using *in vitro* approaches have demonstrated that, depending on their activation status, they can either kill (in classically activated macrophages) or host (in alternatively activated macrophages) intracellular *Leishmania* parasites via the metabolism of L-arginine through NOS2 or Arg-1, respectively (4, 5, 17). Here, we identified, *in vivo*, infected macrophages with an alternatively activation phenotype (F4/80⁺ Arg-1⁺ YM-1⁺) in the lesions of mice inoculated with either of the two *L. mexicana* isolates obtained from patients. However, alternatively activated macrophages present in the lesions of mice infected with the isolate obtained from the patient with DCL seemed to exhibit higher Arg-1 expression and to harbor larger numbers of amastigotes than those present in lesions of mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with LCL. It is well known that metabolism of L-arginine through Arg-1 in macrophages leads to the production of polyamines, which in turn favors *Leishmania* intracellular growth (4–6). In this regard, we propose that the isolate obtained from the patient with DCL could be more efficient in inducing Arg-1 expression in macrophages, leading to both higher polyamine synthesis and proliferation of the parasite in these host cells, than the isolate obtained from the patient with LCL. On the other hand, the presence of NOS2 was not observed in the lesion macrophages from mice infected with either of the two isolates.

In human leishmaniasis, Arg-1 protein and activity have been detected in the lesions of patients with cutaneous leishmaniasis infected with different *Leishmania* species such as *L. aethiopica*, *L. major*, *L. tropica*, and *L. amazonensis* (68–70); however, this issue has not yet been studied in the lesions of patients infected with *L. mexicana*. In this work, we detected infected macrophages (CD68⁺) expressing Arg-1 in lesion biopsy specimens from Mexican patients suffering LCL and DCL due to *L. mexicana* infection. Interestingly and in a similar manner to our observations in the murine model, detected macrophages in the lesions of patients with DCL exhibited higher Arg-1 expression and

greater numbers of amastigotes than the macrophages found in the lesions of patients with LCL. These findings are in line with what has been shown in *L. amazonensis*-infected patients suffering LCL and DCL, where higher expression of Arg-1 has been detected in the lesions of patients with DCL than in those of patients with LCL (69). On the other hand, and differently from what we found in the lesions of infected mice, we were able to detect macrophages expressing NOS2 in the biopsy specimens of patients with LCL, an observation that coincides with the work performed by Qadoumi and colleagues, which reports the presence of macrophages expressing NOS2 in skin biopsy specimens from Mexican patients with LCL (71).

A large body of evidence supports the existence of a functional parasite-harbored arginase in different *Leishmania* species, including *L. mexicana*, and this enzyme has been found to be essential for parasite replication and infectivity as well as for modulating host immune response and disease pathogenesis (16–24). In this study, we were able to detect a *Leishmania*-harbored arginase only in the extracts of amastigotes purified from lesions of mice infected with the *L. mexicana* isolate obtained from the patient with DCL, which also exhibited far higher activity than the one detected in the extracts of amastigotes purified from lesions of mice infected with the isolate obtained from the patient with LCL. Because very little enzymatic activity was detected in the latter, we believe that arginase was expressed in these extracts of amastigotes, but the concentration of this protein was not enough to be detected by our Western blot procedure. Consistent with previous observations proposing that *Leishmania*-harbored arginase enhances disease pathogenesis by augmenting host cellular arginase activities (19), we found a possible correlation between the arginase expression and activity levels present in the *L. mexicana* amastigotes from the isolates obtained from the patients with DCL and LCL and the Arg-1 expression and activity levels present in the lesions of mice infected with these isolates.

In conclusion, our results emphasize the preponderant role of L-arginine metabolism through Arg-1 during infection with *L. mexicana*. Specifically, the evidences shown here tempt us to suggest a differential regulation of this novel pathway during the immunopathogenesis of LCL and DCL, where pathogenic factors intrinsic to the parasites isolated from patients with each of these two clinical manifestations may be involved. Undoubtedly, further thorough studies involving experimentation with other isolates obtained from patients, gene expression profile identification during experimental and human infection, and evaluation of new parameters will be needed to strengthen our findings.

MATERIALS AND METHODS

Mice. BALB/c and C57BL/6 mice were purchased from Charles Rivers Laboratories (Wilmington, MA, USA) and bred at the animal facility of the Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. Mice were maintained in accordance with the national guidelines for animal care (NOM 062 ZOO 1999) and used for experiments at 8 to 10 weeks of age, according to protocols that previously were approved by the Ethical Committee of the Facultad de Medicina, UNAM (approval number 004/2014).

Parasites. Two *Leishmania mexicana* isolates were used in this study: MHOM/MX/2012/CGR, obtained from a Mexican patient diagnosed with localized cutaneous leishmaniasis (LCL), and MHOM/MX/2012/MRB, obtained from a Mexican patient diagnosed with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). The LCL patient was a resident of the Mexican state of Campeche, while the DCL patient was a resident of the Mexican state of Tabasco, two states with high leishmaniasis endemicity in the southeast region of Mexico. After obtaining informed written consent from the patients, asepsis of the lesions, and local anesthesia administration, a 3-mm-punch biopsy sample was taken from the active edge of the skin ulcer of the LCL patient, while needle aspirations were taken from nodular lesions of the DCL patient. The biopsy specimen obtained from the LCL patient was homogenized in phosphate-buffered saline (PBS) by grinding the tissue with a pestle in a 1.5-ml conical tube in order to release amastigotes from infected cells. Both biopsy specimen homogenate and aspirates containing amastigotes were inoculated in Sloppy Evans semisolid medium, maintained at 26°C, and observed every 48 h until the transformation of amastigotes into promastigotes was detected. Upon transformation, promastigotes were cultured at 26°C in medium 199, pH 7.2, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 1% basal medium Eagle (BME) vitamins (all from Gibco of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Once reaching the stationary phase of growth, promastigotes were inoculated subcutaneously into the right hind footpads of BALB/c mice. After lesion development, amastigotes were isolated from infected footpads and cultured as axenic amastigotes at

33°C in Grace's insect medium, pH 5.4, supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin G, and 100 µg/ml streptomycin (all from Gibco of Thermo Fisher Scientific), as previously described (37, 72). As controls, *Leishmania mexicana* reference strain MNYC/BZ/62/M379 and *Leishmania major* reference strain MHOM/IL/81/Friedlin (both kindly donated by Paul A. Bates, Division of Biomedical and Life Sciences, Faculty of Health and Medicine, Lancaster University, United Kingdom) were used for some experiments. The infectivity of *Leishmania* strains and isolates was maintained by regular passage through BALB/c mice.

Identification of *Leishmania* isolates by ITS1 PCR-RFLP. *Leishmania* isolates obtained from patients were confirmed as *Leishmania mexicana* species by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses of PCR-obtained amplicons of the internal transcribed spacer 1 (ITS1), the sequence of DNA that separates the genes coding for the rRNA forming the ribosome small subunit (SSU) and for the 5.8S rRNA forming the ribosome large subunit (LSU), as previously described (35), with minor modifications. After being washed three times in PBS, 1×10^8 *L. mexicana* axenic amastigotes or *L. major* promastigotes were resuspended in lysis buffer (50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1% SDS, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0]), and 100 µg/ml proteinase K) and incubated at 60°C overnight. DNA was purified from the lysates by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation according to standard operating procedures. Isolated DNA was used as the template for PCR amplification of *Leishmania* ITS1 employing the primers LITSR, 5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3', and L5.8S, 5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3'. PCRs were performed in a final volume of 50 µl containing $1 \times$ Phusion HF buffer, 0.5 µM each primer, 200 µM deoxynucleoside triphosphate (dNTP) mixture, 1 U Phusion HF DNA polymerase (all from New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), and 1 µg of *Leishmania* DNA. The thermocycling profile consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 40 s (denaturation), 53°C for 30 s (annealing), and 72°C for 60 s (extension), and a final extension step at 72°C for 7 min. PCR products were resolved on 2% ethidium bromide-stained agarose gels. After PCR amplification, RFLP analysis of ITS1 amplicons was performed by digesting 10 µl of PCR products with BsuRI (HaeIII) restriction enzyme (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The obtained restriction fragments were analyzed on 3% ethidium bromide-stained agarose gels.

Infection of mice, disease course evaluation, and parasite load assessment. Female BALB/c and C57BL/6 mice were inoculated subcutaneously in the right hind footpads with 5×10^6 *L. mexicana* amastigotes and *L. major* promastigotes, respectively, both from stationary phase of growth. The course of disease was monitored weekly by measuring the increase in footpad thickness with a Vernier caliper (model DTG-001; iGaging, San Clemente, CA, USA). Footpad thickness increase was calculated by subtracting the thickness value of the uninfected contralateral footpad from that of the infected footpad. Parasite burdens in the footpad lesions and popliteal lymph nodes (pLNs) of infected mice were determined by direct counting of amastigotes in a Neubauer chamber, after tissue homogenization (37, 73). For this purpose, footpads and pLNs were excised and forced, in the presence of PBS, with a 10-ml syringe plunger through a 100-µm nylon cell strainer (Falcon; Corning, Corning, NY, USA) coupled to a 50-ml conical tube in order to disrupt the tissue and achieve mechanical lysis of infected cells. The resultant homogenate, containing free amastigotes and some undisrupted host cells, was passed five times through a 25-gauge needle to ensure release of amastigotes from the infected cells that were not lysed during the previous step and to break amastigotes clumps to proceed with parasite counting.

Western blotting. Footpads of infected mice were excised and homogenized in 0.1% Triton X-100, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer, containing $1 \times$ EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Resultant homogenates were clarified by centrifugation at $12,000 \times g$ for 15 min at 4°C and assayed for total protein concentration using the bicinchoninic acid (BCA) assay protein kit (Novagen-Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Equal amounts of protein (20 µg) were boiled with reducing Laemmli buffer and resolved on 7.5% SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis, proteins were transferred (25 V for 60 min) onto Immobilon-P membranes (Millipore-Merck KGaA, Darmstadt, Germany) using a wet Mini Trans-Blot Cell apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). After transference, membranes were blocked with 10% nonfat dried milk (Bio-Rad Laboratories) diluted in TBST (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) for 30 min at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4°C with 1:50,000 monoclonal mouse anti-arginase-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), 1:1,000 polyclonal rabbit anti-iNOS (GeneTex, Inc., Irvine, CA, USA), or 1:10,000 polyclonal rabbit anti-YM-1 (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) primary antibodies diluted in TBST containing 10% nonfat dried milk. Then, membranes were washed with TBST (three times for 5 min each) and incubated for 60 min at room temperature with either 1:50,000 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated horse anti-mouse IgG or 1:10,000 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibodies (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) diluted in TBS containing 10% nonfat dried milk. After incubation with secondary antibodies, membranes were washed with TBST (three times for 10 min each), developed with a chemiluminescent substrate for HRP (Millipore-Merck KGaA), and exposed to X-ray films (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Coomassie blue staining of membranes was used as a loading control when comparing protein expression levels. Densitometric analyses of bands were performed using the ImageJ software (Image Analysis Processing in Java rings; NIH, Bethesda, MD, USA).

Protein presence of *Leishmania*-harbored arginase and nitric oxide synthase was also evaluated in lesion-derived amastigotes. For this purpose, amastigotes were purified from footpad lesions as previously described (74), whole-cell lysates were prepared, and 20 µg of protein was used for Western blot assays, according to the method described above. To detect arginase protein in amastigote lysates, 1:5,000 polyclonal rabbit anti-arginase-1 (GeneTex, Inc.) primary antibody was used, while 1:100 monoclonal mouse anti-NOS2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), 1:100 monoclonal mouse anti-NOS1 (Santa Cruz

Biotechnology, Inc.), and 1:100 polyclonal rabbit anti-NOS2 (GeneTex, Inc.) primary antibodies were used to detect nitric oxide synthase protein. Indian ink staining of membranes was used for the loading control.

Determination of arginase enzymatic activity. Arginase enzymatic activity was determined in the lesions of infected mice by measuring the amount of urea generated from the hydrolysis of L-arginine, as previously described (6, 75) with some modifications. Briefly, footpads of infected mice were excised, weighed, and homogenized in 0.1% Triton X-100, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer, containing 1× EDTA-free protease inhibitor cocktail. Resultant homogenates were clarified by centrifugation at 12,000 × g for 15 min at 4°C and assayed for total protein concentration as described above. A volume of 1 to 5 μl of footpad lesion homogenates was diluted to a 50-μl final volume, per sample, with 0.1% Triton X-100, 10 mM MnCl₂, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer, followed by heating for 10 min at 56°C to achieve enzyme activation. A volume of 50 μl of L-arginine (0.5 M, pH 9.7) was added to each sample, and arginine hydrolysis was conducted at 37°C for 15 min. The reaction was stopped by adding 400 μl of a H₂SO₄-H₃PO₄-H₂O (1:3:7 [vol/vol]) mixture. The concentration of produced urea was measured at 550 nm, according to the Archibald colorimetric method, after the addition of 20 μl of 7% α-isonitrosopropiophenone (dissolved in absolute ethanol) and heating at 100°C for 30 min. Arginase activity was reported as units per milligram of tissue or units per milligram of protein, where one unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μmol of urea per min.

Assessment of arginase enzymatic activity in lysates of purified lesion-derived amastigotes was performed according to the method described above, with the exception that L-arginine hydrolysis was conducted for 120 min instead of 15 min.

Quantification of cytokines by ELISA. Cytokine levels were measured in homogenates of footpad lesions and popliteal lymph nodes of *L. mexicana*-infected mice by standard sandwich ELISA. Tissue homogenates were prepared as described above and assayed to quantify IL-4, IL-10, and IFN-γ levels by using specific ELISA kits for IL-4 and IL-10 (BioLegend, San Diego, CA, USA) and IFN-γ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) according to the manufacturers' instructions.

Immunohistochemistry. Footpads of infected mice or 4- to 6-mm-diameter lesion biopsy specimens from Mexican patients with LCL and DCL were fixed for 24 h in 10% neutral buffered formalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), followed by standard processing for paraffin embedding. For immunostaining, 4-μm-thick sections were mounted on charged microscope glass slides (Thermo Fisher Scientific), deparaffinized, and rehydrated. To unmask epitopes, antigen retrieval was performed either by heating the tissue slides in sodium citrate buffer (10 mM, pH 6) at 95°C for 20 min or by incubation with proteinase K (20 μg/ml in Tris-EDTA [TE] buffer, pH 8) for 10 min at room temperature. Endogenous peroxidase activity in the tissue was quenched by incubation in 3% H₂O₂ in TBS (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl) for 20 min at room temperature. Nonspecific antibody binding was blocked with 10% normal serum from the species in which the secondary antibody was generated and 1% bovine serum albumin, both diluted in TBST (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20). Sections were then incubated overnight at 4°C with 1:500 polyclonal rabbit anti-arginase 1, 1:100 polyclonal rabbit anti-iNOS, 1:50 polyclonal rat anti-F4/80 (all from GeneTex, Inc.), 1:200 polyclonal rabbit anti-YM-1 (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada), and monoclonal mouse anti-CD68 (Abcam, Cambridge, UK) primary antibodies diluted in TBST supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA). After washing with TBST (three times for 5 min each), sections were incubated for 60 min at room temperature with 1:500 polyclonal HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich), 1:100 HRP-conjugated goat anti-rat IgG, or 1:500 HRP-conjugated goat anti-human IgG (both from Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA) secondary antibodies diluted in TBST supplemented with 1% BSA. Afterwards, sections were washed with TBST, and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich) was added as the substrate for HRP to visualize immunodetection. Finally, sections were counterstained with Gill's hematoxylin, dehydrated, cleared, and mounted. Tissue sections were observed by light microscopy (Microphot-FXA microscope; Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) and digital images were acquired using a Nikon DXM1200F digital camera and the ACT-1 software (Nikon Instruments Inc.).

Data analysis. Data are reported as the means ± standard errors of the means (SEMs) and were analyzed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical differences between groups were evaluated using Student's *t* tests (when comparing two groups) and one-way analyses of variance (ANOVAs) followed by Bonferroni *post hoc* tests (when comparing multiple groups). Differences between groups were considered significant when the *P* value was <0.05.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants IN225116 and IN218119 from PAPIIT, DGAPA, UNAM, to L.G.-K. Arturo A. Wilkins Rodríguez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received fellowship 269394 from CONACYT.

We thank Ingeborg Becker Fauser (Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM) and Norma Galindo Sevilla (Instituto Nacional de Perinatología) for providing the biopsy samples from patients with leishmaniasis and the technician in pathology, Victor Hugo Torres (Hospital General de México), for sectioning paraffin-embedded tissues for immunohistochemistry.

REFERENCES

- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votpyka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersal of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>.
- Beattie L, Kaye PM. 2011. *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us? *Cell Microbiol* 13:1659–1667. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01658.x>.
- de Menezes JP, Saraiva EM, da Rocha-Azevedo B. 2016. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasit Vectors* 9:264. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1540-3>.
- Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Corraliza I. 2001. The inhibition of arginase by *N*^ω-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* 193:777–784. <https://doi.org/10.1084/jem.193.6.777>.
- Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelen J, Miron C, Alonso C, Corraliza I. 2002. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* 24:113–118. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2002.00444.x>.
- Kropf P, Fuentes JM, Fahnrich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Muller I. 2005. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis *in vivo*. *FASEB J* 19:1000–1002. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3416fje>.
- Wanase N, Soong L. 2008. L-Arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res* 41:15–25. <https://doi.org/10.1007/s12026-007-8012-y>.
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2:907–916. <https://doi.org/10.1038/ni1001-907>.
- Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 25:1101–1104. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250436>.
- Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375:408–411. <https://doi.org/10.1038/375408a0>.
- Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.
- Munder M, Eichmann K, Modolell M. 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 160:5347–5354.
- Iniesta V, Carcelen J, Molano I, Peixoto PM, Redondo E, Parra P, Mangas M, Monroy I, Campo ML, Nieto CG, Corraliza I. 2005. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infect Immun* 73:6085–6090. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.6085-6090.2005>.
- Rogers ME. 2012. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front Microbiol* 3:223. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00223>.
- Modolell M, Choi BS, Ryan RO, Hancock M, Titus RG, Abebe T, Hailu A, Muller I, Rogers ME, Bangham CR, Munder M, Kropf P. 2009. Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e480. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000480>.
- Boitz JM, Gilroy CA, Olenyik TD, Paradis D, Perdeh J, Dearman K, Davis MJ, Yates PA, Li Y, Riscoe MK, Ullman B, Roberts SC. 2017. Arginase is essential for survival of *Leishmania donovani* promastigotes but not intracellular amastigotes. *Infect Immun* 85:e00554-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00554-16>.
- da Silva MF, Floeter-Winter LM. 2014. Arginase in *Leishmania*. *Subcell Biochem* 74:103–117. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_4.
- Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B. 2004. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J Biol Chem* 279:23668–23678. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402042200>.
- Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, Okwor IB, Beverley S, Uzonna JE. 2009. Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. *J Immunol* 183:8068–8076. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803979>.
- Balaña-Fouce R, Calvo-Álvarez E, Álvarez-Velilla R, Prada CF, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM. 2012. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 181: 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.10.007>.
- Gaur U, Roberts SC, Dalvi RP, Corraliza I, Ullman B, Wilson ME. 2007. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 179:8446–8453. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.12.8446>.
- da Silva MF, Zampieri RA, Muxel SM, Beverley SM, Floeter-Winter LM. 2012. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. *PLoS One* 7:e34022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034022>.
- D'Antonio EL, Ullman B, Roberts SC, Dixit UG, Wilson ME, Hai Y, Christianson DW. 2013. Crystal structure of arginase from *Leishmania mexicana* and implications for the inhibition of polyamine biosynthesis in parasitic infections. *Arch Biochem Biophys* 535:163–176. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.03.015>.
- Riley E, Roberts SC, Ullman B. 2011. Inhibition profile of *Leishmania mexicana* arginase reveals differences with human arginase I. *Int J Parasitol* 41:545–552. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.12.006>.
- 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. <https://doi.org/10.1002/eji.200323825>.
- 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. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009006000017>.
- 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* 180:783–793. <https://doi.org/10.1084/jem.180.3.783>.
- Genestra M, Guedes-Silva D, Souza WJ, Cysne-Finkelstein L, Soares-Bezerra RJ, Monteiro FP, Leon LL. 2006. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. *Arch Med Res* 37:328–333. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.07.011>.
- Genestra M, Souza WJ, Guedes-Silva D, Machado GM, Cysne-Finkelstein L, Bezerra RJ, Monteiro F, Leon LL. 2006. Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. *Arch Microbiol* 185:348–354. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0105-9>.
- Grimaldi G, Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 41:687–725. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.687>.
- Velasco O, Savarino SJ, Walton BC, Gam AA, Neva FA. 1989. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 41:280–288. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.280>.
- Diaz NL, Zerpa O, Tapia FJ. 2013. Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:446–452. <https://doi.org/10.1590/S0074-0276108042013008>.
- Ritter U, Korner H. 2002. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 24:295–301. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2002.00467.x>.
- Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. 2017. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *Int J Mol Sci* 18:1296–1296. <https://doi.org/10.3390/ijms18061296>.
- Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 349–358. [https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(03)00093-2).
- Akhoundi M, Hajjarian H, Baghaei A, Mohebbi M. 2013. Geographical distribution of *Leishmania* species of human cutaneous leishmaniasis in Fars Province, Southern Iran. *Iran J Parasitol* 8:85–91.
- Bates PA, Robertson CD, Tetley L, Coombs GH. 1992. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* 105:193–202. <https://doi.org/10.1017/S0031182000074102>.
- Padigel UM, Alexander J, Farrell JP. 2003. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol* 171:3705–3710. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.7.3705>.

39. Rosas LE, Keiser T, Barbi J, Satoskar AA, Septer A, Kaczmarek J, Lezama-Davila CM, Satoskar AR. 2005. Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *Int Immunol* 17:1347–1357. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh313>.
40. Scott P, Novais FO. 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 16:581–592. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>.
41. Hermida MD, Doria PG, Taguchi AM, Mengel JO, dos-Santos W. 2014. *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC Infect Dis* 14:450. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-450>.
42. Biswas A, Bhattacharya A, Kar S, Das PK. 2011. Expression of IL-10-triggered STAT3-dependent IL-4R α is required for induction of arginase 1 in visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol* 41:992–1003. <https://doi.org/10.1002/eji.201040940>.
43. Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D. 2010. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog* 6:e1000899. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000899>.
44. Sacks D, Noben-Trauth N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2:845–858. <https://doi.org/10.1038/nri933>.
45. Etges R, Muller I. 1998. Progressive disease or protective immunity to *Leishmania major* infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interactions. *J Mol Med (Berl)* 76:372–390. <https://doi.org/10.1007/s001090050230>.
46. Reiner SL, Locksley RM. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13:151–177. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.001055>.
47. Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modollell M. 1999. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 163:3771–3777.
48. Rodriguez PC, Ochoa AC, Al-Khami AA. 2017. Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity. *Front Immunol* 8:93. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00093>.
49. Rath M, Muller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. 2014. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol* 5:532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>.
50. Raes G, De Baetselier P, Noel W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh G. 2002. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol* 71:597–602.
51. Kropf P, Herath S, Weber V, Modollell M, Muller I. 2003. Factors influencing *Leishmania major* infection in IL-4-deficient BALB/c mice. *Parasite Immunol* 25:439–447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2003.00655.x>.
52. Souza VL, Veras PS, Welby-Borges M, Silva TM, Leite BR, Ferraro RB, Meyer-Fernandes JR, Barral A, Costa JM, de Freitas LA. 2011. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:23–31. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000100004>.
53. Kebaier C, Louzir H, Chenik M, Ben Salah A, Dellagi K. 2001. Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response. *Infect Immun* 69:4906–4915. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4906-4915.2001>.
54. Carvalhal DGF, Barbosa A, D'El-Rei Hermida M, Clarencio J, Pinheiro NF, Veras PST, dos-Santos WLC. 2004. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion *in vitro*: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. *Exp Parasitol* 107:189–199. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.06.003>.
55. Pinheiro NF, Jr, Hermida MD, Macedo MP, Mengel J, Bafica A, dos-Santos WL. 2006. *Leishmania* infection impairs β_1 -integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 74:3912–3921. <https://doi.org/10.1128/IAI.02103-05>.
56. Badirzadeh A, Taheri T, Taslimi Y, Abdossamadi Z, Heidari-Kharaji M, Gholami E, Sedaghat B, Niyati M, Rafati S. 2017. Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of *Leishmania* parasites. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0005774. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005774>.
57. Chakour R, Guler R, Bugnon M, Allenbach C, Garcia I, Mauel J, Louis J, Tacchini-Cottier F. 2003. Both the Fas ligand and inducible nitric oxide synthase are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with *Leishmania major* whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal. *Infect Immun* 71:5287–5295. <https://doi.org/10.1128/iai.71.9.5287-5295.2003>.
58. Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB, Jr. 1993. Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J Immunol* 151:907–915.
59. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 144:4794–4797.
60. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM, Jr, Ratan RR. 2003. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4843–4848. <https://doi.org/10.1073/pnas.0735876100>.
61. 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. <https://doi.org/10.1006/pupt.2001.0297>.
62. Southan GJ, Szabo C, Thiemeermann C. 1994. Inhibition of the induction of nitric oxide synthase by spermine is modulated by aldehyde dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1638–1644. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2374>.
63. Szabo C, Southan GJ, Thiemeermann C, Vane JR. 1994. The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase: role of aldehyde metabolites. *Br J Pharmacol* 113:757–766. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb17058.x>.
64. D'Oliveira A, Machado P, Bacellar O, Cheng LH, Almeida RP, Carvalho EM. 2002. Evaluation of IFN- γ and TNF- α as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 35:7–10. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822002000100002>.
65. Gaafar A, Veress B, Permin H, Kharazmi A, Theander TG, el Hassan AM. 1999. Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol* 91:314–320. <https://doi.org/10.1006/clim.1999.4705>.
66. Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. 2016. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health* 110:247–260. <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1232042>.
67. Pompeu MM, Brodskyn C, Teixeira MJ, Clarencio J, Van Weyenberg J, Coelho IC, Cardoso SA, Barral A, Barral-Netto M. 2001. Differences in gamma interferon production *in vitro* predict the pace of the *in vivo* response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. *Infect Immun* 69:7453–7460. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7453-7460.2001>.
68. Abebe T, Hailu A, Woldeyes M, Mekonen W, Bilcha K, Cloke T, Fry L, Seich Al Basatena N-K, Corware K, Modollell M, Munder M, Tacchini-Cottier F, Müller I, Kropf P. 2012. Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1684. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001684>.
69. Franca-Costa J, Van Weyenberg J, Boaventura VS, Luz NF, Malta-Santos H, Oliveira MC, Santos de Campos DC, Saldanha AC, dos-Santos WL, Bozza PT, Barral-Netto M, Barral A, Costa JM, Borges VM. 2015. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 211:426–435. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu455>.
70. Mortazavi H, Sadeghipour P, Taslimi Y, Habibzadeh S, Zali F, Zahedifard F, Rahmati J, Kamyab K, Ghandi N, Zamanian A, Reza Tohidinik H, Muller I, Kropf P, Rafati S. 2016. Comparing acute and chronic human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica* focusing on arginase activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 30:2118–2121. <https://doi.org/10.1111/jdv.13838>.
71. Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C. 2002. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 70:4638–4642. <https://doi.org/10.1128/iai.70.8.4638-4642.2002>.
72. Wilkins-Rodríguez AA, Escalona-Montano AR, 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. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.07.014>.
73. Rogers M, Kropf P, Choi BS, Dillon R, Podinovskaia M, Bates P, Muller I. 2009. Proteophosphoglycans reorgnated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog* 5:e1000555. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000555>.
74. Hart DT, Vickerman K, Coombs GH. 1981. A quick, simple method for purifying *Leishmania mexicana* amastigotes in large numbers. *Parasitology* 82:345–355. <https://doi.org/10.1017/s003118200066889>.
75. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modollell M. 1994. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174:231–235. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90027-2).

X. OTRAS PUBLICACIONES

- Aguirre-Garcia MM, Escalona-Montaña AR, Wilkins-Rodríguez AA, and Kobeh-Gutiérrez L. 2018. Immune Evasion Strategies. In Farhat Afrin and Hassan Hemeg (ed), *Leishmaniasis as Re-emerging Diseases*. IntechOpen, London, UK. DOI: 10.5772/intechopen.75169.

- Gutiérrez-Kobeh L. and Wilkins-Rodríguez AA. 2019. L-arginine Metabolism in the Infection with *Trypanosoma cruzi*. In Wanderley De Souza (ed), *Biology of Trypanosoma cruzi*. IntechOpen, London, UK. DOI: 10.5772/intechopen.85010.

Immune Evasion Strategies

M. Magdalena Aguirre-Garcia,
Alma R. Escalona-Montaño,
Arturo A. Wilkins-Rodríguez and
Laila Gutiérrez-Kobeh

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.75169>

Abstract

Leishmania is the causative protozoan parasite of leishmaniasis. Distinct species provoke localized/diffuse cutaneous leishmaniasis or visceral leishmaniasis. *Leishmania* parasites have developed diverse strategies to evade the host immune response expressed through various cells, especially macrophages, NK cells, and dendritic cells. Participating in some of these strategies are *Leishmania* surface molecules, such as lipophosphoglycan (LPG) and protease gp63, which are thus considered virulence factors. LPG has been shown to modulate proinflammatory responses. For example, *L. major* LPG activates NK cells through toll-like receptor-2 (TLR2), while *L. mexicana* LPG elicits a differential production of cytokines in human dendritic cells and monocytes. Moreover, *L. mexicana* LPG activates MAP kinases in macrophages, which in turn enhance proinflammatory cytokine production through TLRs. Additionally, *Leishmania* exosomes have been found to strongly affect macrophage signaling and functions. Furthermore, proteins secreted by *Leishmania* promastigotes and amastigotes modulate the production of proinflammatory cytokines in human macrophages. Since *Leishmania* is an obligate intracellular parasite, its promastigotes utilize several mechanisms to survive and duplicate inside host cells, including the inhibition of apoptosis. It is now clear that MAPK p38, JNK, ERK 1/2, and PI3K/Akt participate in the inhibition of both natural and induced apoptosis of macrophages, neutrophils, and dendritic cells.

Keywords: *Leishmania*, cytokines, TLR, inflammasome, apoptosis, NO

1. Introduction

Leishmaniasis is a complex of neglected tropical diseases (NTDs) caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. Epidemiological studies have revealed that 12 million people are

infected worldwide, with 2 million new cases each year. Approximately 350 million people are currently at risk of contracting leishmaniasis, mostly in developing countries.

Leishmania is a dimorphic protozoan parasite that completes its life cycle in two organisms: the sand fly vector and a mammalian host (a rodent, canid, or human). In the vector, the parasite enters the insect as aflagellated amastigotes through a blood meal from a mammal. In the sand fly midgut, this form changes into motile extracellular flagellated promastigotes that divide by binary fission. After being injected into the bloodstream of a mammalian host, the promastigotes are quickly engulfed by macrophages, where they differentiate into aflagellated intracellular amastigotes that can survive in this acidic environment. In macrophages, the amastigotes replicate by binary fission, causing the lysis of the cell and the invasion of other cells [1].

The outcome of a *Leishmania* infection depends on a wide array of factors, especially the species of the parasite and the host immune response. Species such as *L. major*, *L. mexicana* and *L. guyanensis* induce cutaneous leishmaniasis, while *L. amazonensis* and *L. braziliensis* cause the mucocutaneous form. *L. donovani* and *L. chagasi*, on the other hand, cause visceral leishmaniasis (VL) [2].

Whether *Leishmania* parasites manage to establish themselves in mammalian cells depends on their capacity to surpass host defense mechanisms. The survival strategies of the protozoan are based on the manipulation of distinct host cell functions, including modulation of cell signaling pathways through phosphorylation and dephosphorylation mechanisms [3]. The different strategies of *Leishmania* to evade the host immune response during the process of infection involve macrophages, NK cells, and dendritic cells. One of the most successful survival strategies displayed by *Leishmania* is the inhibition of apoptosis of host cells through the activation or silencing of proapoptotic or antiapoptotic signaling pathways [4, 5]. Among the *Leishmania* surface components participating in such evasion strategies is lipophosphoglycan (LPG), an abundant molecule that exerts its activity by binding to TLR2. Although the ability of *Leishmania* to inhibit inflammatory signaling pathways has been proposed as a virulence mechanism, the molecular events underlying this process have still not been fully elucidated [6].

2. Parasite molecules that regulate host cell signaling pathways

Two of the most studied molecules of *Leishmania* spp. are LPG and glycoprotein 63 (gp63), postulated as possible virulence factors for some species. LPG covers the surface of the parasite and the flagellum, forming a glycocalyx. The structure of LPG, which differs between the distinct species of *Leishmania*, is mainly constituted by repeating units of a disaccharide and a phosphate bound to the membrane by glycosylphosphatidylinositol (GPI). This molecule is more abundant in promastigotes than amastigotes [7]. Contrarily, gp63 is more frequently expressed in amastigotes than promastigotes. The absence of LPG in amastigotes emphasizes the relevance of gp63 in protozoan survival, as well as in the regulation of signaling pathways of host cells [8, 9].

Other important molecules for *Leishmania* are glycosylinositolphospholipids (GPIs), a class of glycolipids bound by GPIs and expressed 10 times more frequently than LPG. Their small size keeps them close to the parasite membrane [10, 11].

The term “secretome” was introduced for the first time in the global study of the genome of proteins secreted by *Bacillus subtilis*. The authors defined the secretome as a subset of the proteome consisting of secreted proteins and the components of the cellular machinery involved in protein secretion. They predicted all exported *B. subtilis* proteins by employing computational methods to search for signal peptides and cellular retention signals in protein sequences [12]. In *Plasmodium falciparum*, the secretome refers to all proteins exported to the host erythrocyte and mediated by an endoplasmic reticulum signal sequence, along with one export element of this parasite [13, 14]. Until very recently, there was very little information about the proteins secreted by protozoan parasites. Given the role of these proteins as virulence factors and their capacity to modulate host cells, this scant information represented an important scientific limitation.

Regarding trypanosomatids, the term secretome was introduced by Silverman in a proteomics approach used to identify a large number of extracellular proteins in a culture media conditioned by *L. donovani* [15]. Several studies on trypanosomatids have aimed to identify and characterize excreted/secreted factors due to their potential for the development of vaccines and/or new drugs [16].

Leishmania and other intracellular pathogens have developed strategies to invade and persist within the respective host cell. In some cases, the mechanisms entail the export of virulence factors to the cytosol of this same cell [15]. Almost a decade has passed since the first report of the secretion proteins by *L. donovani*. By means of a stable isotope label of amino acids in a culture called SILAC, the authors identified 151 proteins secreted by this species into the culture media. Interestingly, few of these are secreted through classical mechanisms [15]. Additionally, the bioinformatic analysis in the same study showed that none of the histidine phosphatase proteins result from the classical mechanism of secretion.

The authors found various proteins with several possible functions. For instance, some proteins take part in the vesicular transport process, essential for the survival of the parasite, and may thus be virulence factors. Among the proteins participating in signal transduction are those encoded by the gene LmjF 25.0750 of *L. major*, including a phosphatase serine threonine type phosphoprotein, a metal-dependent phosphatase (PPM) called PP2C [15]. This protein was cloned from the DNA genome of *L. major* and localized in the pocket and flagellum of the parasite through fluorescence microscopy assays and transmission electron microscopy [3].

Since the flagellum of *L. major* represents an important structure for differentiation in trypanosomatids, this location of PP2C suggests a role in a vital biological process of the parasite [3]. The same authors have shown that *L. mexicana* promastigotes and amastigotes secrete proteins with phosphatase activity into the culture medium. Such activity was more pronounced in the promastigote than amastigote secretion medium. Both media stimulated the production of various cytokines in human macrophages: tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-12p70, and IL-10 [17].

2.1. Exosomes secreted by *Leishmania*

Exosomes are organelles (30–100 nm) released by numerous mammalian cells, including reticulocytes, B cells, T cells, dendritic cells, and macrophages [18]. Bioactive exosomes are released

by cells infected with viruses and bacteria as well as some tumor cells [19, 20]. The release of exosomes also constitutes a mechanism for the secretion of proteins by *Leishmania*, and these vesicles allow for communication with the host cell [15]. Among the proteins released through exosomes, the metalloprotease 63 kDa and the elongation factor 1 alpha (EF-1 α) are known to have a substantial role in deregulating certain signaling pathways. These two molecules, contained in microvesicles, are responsible for the activation of tyrosine phosphatases (SHP-1) in the host cell [21]. A study of *L. mexicana* demonstrated a type of vesicle induced at a temperature of 37°C that did not correspond to exosomes, as evidenced by its size.

Other studies confirm a nonclassical route of secretion for *Leishmania* proteins. Two-dimensional electrophoresis displayed 270 secreted protein spots originating from *L. braziliensis*, of which 42 were identified. About 57% of these proteins presented non-classical secretion mechanisms [22].

In *L. infantum*, distinct proteins were observed in exovesicles of the parasites in the different phases of their growth. Ribosomal proteins were detected in the logarithmic phase of growth, thus indicating their crucial role in protein turnover. In the stationary phase, contrarily, there was a specific enrichment of vesicles with properties similar to apoptotic vesicles [23].

Diverse *Leishmania* species have been analyzed to explore the effect exerted by their secreted molecules on the host immune response. For example, in infection by *L. donovani* and interferon (IFN)- γ treatment, the exposure of human monocytes to the exosomes secreted by this parasite led to an alteration in the cytokine response. The resulting inhibition of IL-8 and TNF- α production combined with enhanced levels of IL-10 caused an anti-inflammatory effect. This immune suppression induced during *Leishmania* infection suggests that the secretion of exosomes by *Leishmania* likely plays a major role in the establishment of infection. Indeed, exosomes may be a mechanism of immune modulation used more generally by intracellular and extracellular pathogens [24].

3. *Leishmania* modulates proinflammatory cytokines, inflammasomes, and TLR expression

To detect *Leishmania* infections, the innate immune system utilizes different sets of germline-encoded receptors, including the TLRs found on cell membranes and in the endosome. Other receptors that have only been detected in the cytoplasm, such as the NOD-like receptor (NLR) family, also play a role in defending the host from a *Leishmania* invasion. Encompassing 34 members in all, NLRs sense pathogen- and danger-associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs, respectively).

There is a subset of NLRs that assembles large multiprotein complexes known as inflammasomes. The latter trigger inflammatory caspase 1, which in turn promotes the conversion of pro-IL-1 β and pro-IL-18 into their bioactive forms. For instance, NLRP3 (the best-characterized inflammasome) consists of the NLRP3 protein, the bipartite adaptor protein ASC, and caspase 1 (in its minimum form). It has been demonstrated that this inflammasome, activated

by bacterial toxins, bacterial RNA, ATP, nigericin, uric acid, and silica crystals, is an essential component of the host immune response against bacterial and viral pathogens [25].

Leishmania parasites have developed diverse strategies to evade the immune response, especially in the form of macrophages, NK cells, and dendritic cells. Becker analyzed the interaction between *Leishmania* LPG and TLR2 receptors on human NK cells, finding that LPG purified from metacyclic and procyclic promastigotes of *L. major* stimulates these host cells. The consequent activation of NK cells leads to an upregulation of TLR2 expression, the nuclear translocation of NF- κ B, and an increased production of IFN- γ and TNF- α . Indeed, the activation of NK cells turned out to be greater with the infective metacyclic form than the non-infective procyclic form of LPG [26].

L. mexicana LPG elicits a differential production of proinflammatory cytokines, such as IL-12, TNF- α and IL-10, as well as the nuclear translocation of NF- κ B in monocytes and dendritic cells [27]. It also activates ERK and p38 MAP kinase in macrophages and induces proinflammatory cytokine production through TLR2 and TLR4 signaling [28].

After infecting the THP1 human cell line with *L. donovani*, the production of IL-10, TNF- α and IFN- γ was measured, and the expression of TLR2, TLR4, and TLR9 was determined in blood samples and the THP1 cell line. IL-10 levels were higher in controls positive to the leishmanin skin test (LST+) compared to patients with VL. TNF- α was moderately produced, exhibiting no variation between patients, controls, and THP1 cells. TLR4 and TLR9 expression was elevated in patients with VL. *L. donovani* increased the expression of TLR4 and TLR9 in patients with VL, and of TLR2 in THP1 cells, which suggests a link between TLRs and the generation of a mixed cytokine response [29].

Interestingly, other authors analyzed the expression of some components related to the inflammasome pathway in murine macrophages infected with *L. major*. At 6 and 18 h post infection, they evaluated the mRNA expression levels in control and infected macrophages of two NLRs (NLRP3 and NAIP5), the inflammasome adaptor molecule ASC, proinflammatory caspase-1, and proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18. The components related to the inflammasome pathway (NLRP3, ASC, IPAF, IL-1 β , and IL-18) were upregulated in murine macrophages infected with *L. major*. The activity of caspase-1 was more pronounced in infected than noninfected macrophages. Infected (versus uninfected) macrophages also showed significantly greater caspase-1 activity in harvested cells and a significantly higher concentration of IL-1 β in the supernatant of the cultured media [30].

It has been documented, based on *in vitro* (in macrophages) and *in vivo* studies, that a *Leishmania* infection activates the NLRP3 inflammasome and that the latter is key to the inhibition of parasite replication. For example, the capacity of inflammasome-deficient mice to resist infection with *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, and *L. chagasi* was favored by IL-1 β production resulting from inflammasome activation. The mechanism involved in such activation was the increase in the level of nitric oxide (NO), which in turn was mediated by the elevated availability of nitric oxide synthase NOS2 resulting from signaling through the IL-1 receptor and MyD88. Lima-Junior et al. previously showed that the NLR3 inflammasome is vital for the host response to *L. amazonensis* infection, having proven to restrict

parasite replication in both isolated macrophages and *in vivo*. As can be appreciated, IL-1 β production is involved in the host resistance to infection. The signaling that triggers the production of this cytokine takes place through the IL-1 receptor and MyD88, contributing to elevated levels of NOS2. An increase in the latter enzyme leads to a greater generation of NO, a major host defense mechanism against *Leishmania* spp. [31].

In the case of *L. major*, secreted antigens suppressed the proliferation of BALB/c mice lymphocytes *in vitro*. After semi-purifying these secreted antigens, they were found to suppress 60% of lymphocyte proliferation and prevent the stimulation of lymphocytes. The fractions obtained decreased the production of IFN- γ and increased the level of IL-4 in lymphocytes, whereas they downregulated the formation of NO by activated macrophages. Hence, proteins secreted by *L. major* may function as immunosuppressive factors that downregulate the immune system [32]. On the other hand, the immunomodulatory effect of proteins excreted/secreted by *L. infantum* was described in the context of differentiation and maturation of human dendritic cells [33].

Regarding *L. donovani*, an immunomodulatory role has also been established for leishmanial excretory-secretory antigens (LESAs) released by promastigotes to the culture medium. The separation of fractions from LESAs revealed proteins of different molecular weights. Both fractions were highly immunogenic, as they significantly enhanced the activity of NADPH oxidase and SOD, as well as the production of NO, TNF- α , IFN- γ , and IL-12 in stimulated RAW 264.7 macrophages. These results strongly suggest the potential role of LESAs in the modulation of macrophage effector functions and Th1 responses, which could possibly be used in the development of a potent vaccine for visceral leishmaniasis [34]. Similarly, Kumar reported a potential immunostimulatory effect of soluble exogenous antigens of *L. donovani*, which may be instrumental in developing a subunit vaccine against VL [35].

4. *Leishmania* modulates L-arginine metabolism via NOS2 and arginase-1

Among other strategies developed by *Leishmania* parasites to avoid elimination by the host immune response, regulation of L-arginine metabolism via NOS2 and arginase-1 (ARG-1) enzymes has emerged as a crucial mechanism for parasite survival. Macrophages, the main host cells that battle *Leishmania*, can be instructed to kill or host intracellular amastigote forms of this parasite, depending on their ability to express NOS2 or ARG-1. The expression of these enzymes, which share L-arginine as a substrate, is regulated in macrophages by their perception of the environmental balance of cytokines.

Proinflammatory cytokines (e.g., TNF- α and IFN- γ) induce the classical activation of macrophages, upregulating NOS2 expression. This enzyme catalyzes the conversion of L-arginine into L-citrulline and NO, the latter molecule being considered the most potent leishmanicidal agent for the elimination of intracellular *Leishmania* parasites [36]. On the other hand, anti-inflammatory cytokines (e.g., IL-4, IL-10 and IL-13) elicit an alternative activation of macrophages that upregulates ARG-1 [37], which in turn catalyzes the conversion of L-arginine into

urea and L-ornithine. The latter is a basic source for the synthesis of polyamines, essential nutrients for the growth and surveillance of *Leishmania* [38, 39]. Hence, whether L-arginine metabolism takes place through ARG-1 or NOS2 is decisive for the life or death of *Leishmania* during infection [40].

To establish infection and avoid host surveillance, *Leishmania* parasites have developed different strategies to hijack L-arginine metabolism in order to promote the production of polyamines rather than NO. During its development inside the vector, for instance, the parasite generates a mucin-rich gel that sand flies deliver into the host skin when transmitting *Leishmania* promastigotes [41]. This gel, called promastigote secretory gel, is known to modulate L-arginine metabolism in macrophages [42]. Accordingly, promastigote secretory gel stimulates the recruitment of macrophages and promotes their alternative activation, causing an increased expression of arginase-1 along with its greater capacity to metabolize L-arginine to afford polyamines, which in turn enhance the growth of *Leishmania* [42].

The parasite-induced upregulation of arginase-1 can affect the production of NO through substrate (L-arginine) competition [41]. Additionally, the generation of some polyamines resulting from L-arginine metabolism via arginase-1 (e.g., spermine, spermidine and putrescine) inhibit NOS2 function [38, 39, 43]. The modulation of L-arginine metabolism is relevant not only during the onset of the infection but throughout the course the disease. The success of host immunity or the pathology of leishmaniasis depends mainly on the balance of the immune response. Since the formation of either NOS2 or arginase leads to the inhibition of the other, these two metabolic states are competitive and tightly regulated [44], determining the levels of NO and therefore the outcome of *Leishmania* infection (survival versus elimination) in the host.

Besides the production of polyamines and the resulting enhancement of *Leishmania* intracellular growth in alternatively activated macrophages, recently findings have shown that *Leishmania*-induced L-arginine metabolism via ARG-1 polarization is advantageous to the parasite in yet another way. A substantial accumulation of alternatively activated macrophages causes an elevated demand, consumption, and depletion of L-arginine in the microenvironment [41]. Since T lymphocytes are very sensitive to L-arginine starvation, a greater consumption of this amino acid via ARG-1 limits its availability to T cells, which in turn notably impairs the development and function of these cells that are required for the control of a *Leishmania* infection [45, 46].

5. Inhibition of apoptosis

Leishmania is an obligate intracellular parasite that invades a variety of host cells, but it is in dendritic cells and macrophages where it can survive and replicate inside the phagosome. The condition of being obligate intracellular parasites presupposes the utilization by *Leishmania* of mechanisms to manipulate host cells in order to evade the immune response and survive inside cells. Along the evolutionary history of this parasite, diverse survival strategies have been developed.

Although the inhibition of the phagosome-lysosome fusion comprises one such strategy, one of the most intriguing is the inhibition of apoptosis. The latter process is a type of programmed cell death characterized by a very orderly and immunologically silent dismantling of a cell [47, 48]. The activation or inhibition of several signaling pathways is required for apoptosis to occur [49–53]. Whereas the initiation of apoptosis involves gene activation and transduction pathways, the executioner phase requires the activation of the cellular machinery necessary for the dismantling of the cell.

Apoptosis is a crucial defense mechanism against intracellular pathogens [54]. However, many pathogenic microorganisms such as virus [55], bacteria [56], and protozoan parasites [57, 58] have developed mechanisms to persist within host cells without inducing apoptosis. It has been widely documented that *Leishmania* inhibits apoptosis of different cells such as macrophages [59–61], monocytes [64] and neutrophils [66].

Recently, it has been demonstrated that *L. mexicana* promastigotes and amastigotes also inhibit apoptosis in dendritic cells [62, 63]. In some of these studies, monocytes, dendritic cells, and macrophages were grown under apoptogenic conditions and infected with different species of *Leishmania*, resulting in the inhibition of normal apoptosis.

In particular, infection with *L. donovani* or a stimulus with its LPG inhibits apoptosis in macrophages. Cellular activation caused by infection increases the production of TNF- α , TGF- β , IL-6, and GM-CSF, while decreasing the secretion of M-CSF and IL-1 β [60]. Additionally, *L. major* delayed apoptosis by inhibiting the release of mitochondrial cytochrome C in infected macrophages grown in the presence of staurosporine [59]. Studies performed on other cell lines report a similar outcome, such as the inhibition of actinomycin D-induced apoptosis in the monocyte cell line U937 infected with *L. infantum* [64]. In macrophages from the cell line RAW 264.7 infected with *L. major*, apoptosis diminished even in the presence of cycloheximide [65]. Exposing neutrophils to *L. major* led to reduced caspase-3 activity, thus inhibiting spontaneous apoptosis [66]. Moreover, amastigotes and promastigotes of *L. mexicana* inhibited camptothecin-induced apoptosis in monocyte-derived dendritic cells [62, 63]. In the majority of reports, the antiapoptotic effect has been associated with a significant decline in caspase-3 activity in cells.

5.1. Signaling pathways involved in *Leishmania*-induced inhibition of host cell apoptosis

Although *Leishmania* infection is known to inhibit apoptosis in several cells, the mechanism(s) through which this process takes place in infected cells is not fully clear. One signaling pathway involved in apoptosis is that of MAPKs, a family of serine/threonine kinases. Four major pathways have been identified in mammalian cells for signaling by MAPKs: extracellular signal-related kinases (ERK1/2), c-Jun amino-terminal kinases (JNK1/2/3), p38 (α , β , γ , δ), and ERK5 [67–70]. MAPKs respond to a wide variety of stimuli, such as proinflammatory cytokines, environmental stress, DNA damage, and growth factors [50, 71]. The p38 pathway is associated with cytokine production, inflammation, cell growth and differentiation, and cell death. JNK participates in the control of cell death and is encoded by three genes: JNK1/SAPK γ , JNK2/SAPK α , and JNK3/SAPK β . Contrarily, the signaling pathway of PI3K/AKT has an antiapoptotic role through the phosphorylation of PI3K/AKT that conducts to the downstream activation of multiple signaling pathways related to growth, development, and

cellular survival processes [72]. MAPKs [73, 74] and PI3K [75] are activated during *Leishmania* infections and participate in the apoptosis or survival cells [76–78].

Diverse signaling pathways have been implicated in the inhibition of apoptosis by *Leishmania*, such as NF- κ B, PI3K, and p38 MAPK PI3K. However, only the inhibition of PI3K resulted in the abrogation of the antiapoptotic phenotype, whose activation confers apoptosis inhibition in infected macrophages [79] and dendritic cells [5]. ERK1/2 is activated in neutrophils infected with *L. major* and modulates multiple apoptotic pathways [80]. Contrarily, p38 and JNK are deactivated to prevent apoptosis [4, 5]. Survival is mediated by signaling pathways (e.g., PI3K/Akt), as well as by the expression of antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family (e.g., Bcl-2, Bcl-xL, MCL-1, and A1). We have demonstrated that *L. mexicana* promastigotes and amastigotes also inhibit apoptosis in dendritic cells [62, 63] through the downregulation of proapoptotic pathways (e.g., MAPK p38 and JNK), as well as the activation of antiapoptotic routes such as PI3K/Akt [4, 5].

6. Conclusion

Leishmania parasites have developed diverse strategies to evade the immune response: elicitation of a differential production of proinflammatory cytokines, upregulation of TLR2 and TLR4 expression, the nuclear translocation of NF- κ B, and modulation of inflammasome. These parasites have a dual relation with host cells. Whereas host cells provide them with nutrients and a place to survive and replicate, these same cells exhibit an immune response aimed at the destruction of the parasites. Hence, the latter must display a wide array of strategies to overcome host cells defense mechanisms. One of the most successful strategies utilized by *Leishmania* inside host cells is the inhibition of apoptosis.

Apoptosis is a type of programmed cell death involving a precisely orchestrated series of steps that culminate in the orderly dismantling of the cell. This process encompasses the activation and silencing of a wide variety of signaling pathways, among which a leading role is played by MAPK, PI3K/Akt and proapoptotic/antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family. *Leishmania* has the capacity to inhibit apoptosis of different cells, especially macrophages, monocytes, neutrophils, and dendritic cells. Although the precise mechanisms have not been fully elucidated, it is now clear that MAPK p38, JNK, ERK 1/2, and PI3K/Akt participate in the inhibition of apoptosis in macrophages, neutrophils, and dendritic cells. The inhibition of apoptosis is a key strategy for the survival and replication of *Leishmania* in host cells and may have implications for its pathogenesis because of favoring the invasion of the host and the persistence of the parasite in host cells. Further research is needed on the mechanisms of activation and regulation of the inflammasome pathway to provide insights into the pathophysiology of chronic diseases and reveal new therapeutic targets.

Acknowledgements

The authors are especially grateful to Bruce Allan Larsen for proofreading the manuscript.

Financial support

This work was supported by grant IN220816 from DGAPA-PAPIIT to MMAG.

Author details

M. Magdalena Aguirre-García*, Alma R. Escalona-Montaña, Arturo A. Wilkins-Rodríguez and Laila Gutiérrez-Kobeh

*Address all correspondence to: maguirre@unam.mx

División de Investigación, Facultad de Medicina, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Unidad Periférica de Investigación UNAM-INC, Ciudad de México, Mexico

References

- [1] Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 1990;**65**(Suppl 1):37-42. DOI: 10.1051/parasite/1990651037
- [2] Faria MS, Reis FC, Lima AP. Toll-like receptors in leishmania infections: Guardians or promoters? *Journal of Parasitology Research*. 2012;**2012**:930257. DOI: 10.1155/2012/930257
- [3] Escalona-Montano AR, Pérez-Montfort R, Cabrera N, Mondragón-Flores R, Vélez-Ramírez DE, Gómez-Sandoval JN, Gutiérrez-Kobeh L, Becker I, Aguirre-García MM. Protein phosphatase PP2C, in the flagellum of *Leishmania major*: Cloning and characterization. *Parasitology Open*. 2017;**3**:1-9. DOI: 10.1017/pao.2017.14
- [4] Rodríguez-González J, Wilkins-Rodríguez A, Argueta-Donohue J, Aguirre-García M, Gutiérrez-Kobeh L. *Leishmania mexicana* promastigotes down regulate JNK and p-38 MAPK activation: Role in the inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Experimental Parasitology*. 2016;**163**:57-67. DOI: 10.1016/j.exppara.2015.12.005
- [5] Vázquez-López R, Argueta-Donohue J, Wilkins-Rodríguez A, Escalona-Montano A, Aguirre-García M, Gutiérrez-Kobeh L. *Leishmania mexicana* amastigotes inhibit p38 and JNK and activate PI3K/AKT: Role in the inhibition of apoptosis of dendritic cells. *Parasite Immunology*. 2015;**37**:579-589. DOI: 10.1111/pim.12275
- [6] Srivastav S, Kar S, Chande AG, Mukhopadhyaya R, Das PK. *Leishmania donovani* exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response. *Journal of Immunology*. 2012;**189**:924-934. DOI: 10.4049/jimmunol.1102845

- [7] Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: A signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;**18**:293-305. DOI: 10.1128/CMR.18.2.293-305.2005
- [8] McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: Inter- and intra-specific polymorphism in old World species. *The Biochemical Journal*. 1995;**310**(Pt 3):807-818
- [9] McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MA, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *The EMBO Journal*. 1992;**11**:3593-3600
- [10] Ferguson MA. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 1997;**352**: 1295-1302. DOI: 10.1098/rstb.1997.0113
- [11] McConville MJ, Ralton JE. Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of *Leishmania* parasites. *Behring Institute Mitteilungen*. 1997:34-43
- [12] Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S, van Dijl JM. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: A genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000;**64**:515-547
- [13] Hiller NL, Bhattacharjee S, van Ooij C, Liolios K, Harrison T, Lopez-Estrano C, Haldar K. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science*. 2004;**306**:1934-1937. DOI: 10.1126/science.1102737
- [14] van Ooij C, Tamez P, Bhattacharjee S, Hiller NL, Harrison T, Liolios K, Kooij T, Ramesar J, Balu B, Adams J, Waters AP, Janse CJ, Haldar K. The malaria secretome: From algorithms to essential function in blood stage infection. *PLoS Pathogens*. 2008;**4**:e1000084. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000084
- [15] Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, Reiner NE. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biology*. 2008;**9**:R35. DOI: 10.1186/gb-2008-9-2-r35
- [16] Corrales RM, Sereno D, Mathieu-Daude F. Deciphering the *Leishmania* exoproteome: What we know and what we can learn. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2010;**58**:27-38. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2009.00608.x
- [17] Escalona-Montano AR, Ortiz-Lozano DM, Rojas-Bernabe A, Wilkins-Rodriguez AA, Torres-Guerrero H, Mondragon-Flores R, Mondragon-Gonzalez R, Becker I, Gutierrez-Kobeh L, Aguirre-Garcia MM. *Leishmania mexicana*: Promastigotes and amastigotes secrete protein phosphatases and this correlates with the production of inflammatory cytokines in macrophages. *Parasitology*. 2016;**143**:1409-1420. DOI: 10.1017/S0031182016000949
- [18] Wang GJ, Liu Y, Qin A, Shah SV, Deng ZB, Xiang X, Cheng Z, Liu C, Wang J, Zhang L, Grizzle WE, Zhang HG. Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells. *Journal of Immunology*. 2008;**181**:5242-5248

- [19] Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, Mitchell DA, Bigner DD. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *The FASEB Journal*. 2009;**23**:1541-1557. DOI: 10.1096/fj.08-122184
- [20] Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JE. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;**278**:52347-52354. DOI: 10.1074/jbc.M309009200
- [21] Silverman JM, Reiner NE. Leishmania exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2011;**1**:26. DOI: 10.3389/fcimb.2011.00026
- [22] Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia L, Mendonca-Lima L, Domont GB, Cupolillo E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *Journal of Proteomics*. 2009;**73**:79-92. DOI: 10.1016/j.jprot.2009.08.006
- [23] Santarem N, Silvestre R, Tavares J, Silva M, Cabral S, Maciel J, Cordeiro-da-Silva A. Immune response regulation by leishmania secreted and nonsecreted antigens. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 2007;**2007**:85154. DOI: 10.1155/2007/85154
- [24] Silverman JM, Clos J, de'Oliveira CC, Shirvani O, Fang Y, Wang C, Foster LJ, Reiner NE. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *Journal of Cell Science*. 2010;**123**:842-852. DOI: 10.1242/jcs.056465
- [25] Gurung P, Karki R, Vogel P, Watanabe M, Bix M, Lamkanfi M, Kanneganti TD. An NLRP3 inflammasome-triggered Th2-biased adaptive immune response promotes leishmaniasis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;**125**:1329-1338. DOI: 10.1172/JCI79526
- [26] Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, Gonzalez A, Maldonado C, Isibasi A. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2003;**130**:65-74
- [27] Argueta-Donohue J, Carrillo N, Valdes-Reyes L, Zentella A, Aguirre-Garcia M, Becker I, Gutierrez-Kobeh L. *Leishmania mexicana*: Participation of NF-kappaB in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Experimental Parasitology*. 2008;**120**:1-9. DOI: 10.1016/j.exppara.2008.04.002
- [28] Rojas-Bernabe A, Garcia-Hernandez O, Maldonado-Bernal C, Delegado-Dominguez J, Ortega E, Gutierrez-Kobeh L, Becker I, Aguirre-Garcia M. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. *Parasitology*. 2014;**141**:788-800. DOI: 10.1017/S0031182013002187
- [29] Babiker DT, Bakhiet SM, Mukhtar MM. *Leishmania donovani* influenced cytokines and Toll-like receptors expression among Sudanese visceral leishmaniasis patients. *Parasite Immunology*. 2015;**37**:417-425. DOI: 10.1111/pim.12202

- [30] Mahmoudian-Sani M, Hajizade A, Sankian M, Fata A, Mellat M, Hassanpour K, Farnoosh. Evaluation of the expression of the inflammasome pathway related components in *Leishmania major* infected murine macrophages. *European Journal of Experimental Biology*. 2013;**3**(1):104-109
- [31] Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, Mineo TW, Gutierrez FR, Bellio M, Bortoluci KR, Flavell RA, Bozza MT, Silva JS, Zamboni DS. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nature Medicine*. 2013;**19**:909-915. DOI: 10.1038/nm.3221
- [32] Tabatabaee PA, Abolhassani M, Mahdavi M, Nahrevanian H, Azadmanesh K. *Leishmania major*: secreted antigens of *Leishmania major* promastigotes shift the immune response of the C57BL/6 mice toward Th2 in vitro. *Experimental Parasitology*. 2011;**127**:46-51. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.06.033
- [33] Markikou-Ouni W, Drini S, Bahi-Jaber N, Chenik M, Meddeb-Garnaoui A. Immunomodulatory effects of four *Leishmania infantum* potentially excreted/secreted proteins on human dendritic cells differentiation and maturation. *PLoS One*. 2015;**10**:e0143063. DOI: 10.1371/journal.pone.0143063
- [34] Gour JK, Kumar V, Singh N, Bajpai S, Pandey HP, Singh RK. Identification of Th1-responsive leishmanial excretory-secretory antigens (LESAs). *Experimental Parasitology*. 2012;**132**:355-361. DOI: 10.1016/j.exppara.2012.04.022
- [35] Kumar A, Samant M, Misra P, Khare P, Sundar S, Garg R, Dube A. Immunostimulatory potential and proteome profiling of *Leishmania donovani* soluble exogenous antigens. *Parasite Immunology*. 2015;**37**:368-375. DOI: 10.1111/pim.12189
- [36] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*. 2001;**2**:907-916. DOI: 10.1038/ni1001-907
- [37] Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *European Journal of Immunology*. 1995;**25**:1101-1104. DOI: 10.1002/eji.1830250436
- [38] Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelen J, Miron C, Alonso C, Corraliza I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunology*. 2002;**24**:113-118
- [39] Kropf P, Fuentes JM, Fahnrich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Muller I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *The FASEB Journal*. 2005;**19**:1000-1002. DOI: 10.1096/fj.04-3416fje
- [40] Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunologic Research*. 2008;**41**:15-25. DOI: 10.1007/s12026-007-8012-y

- [41] Rogers ME. The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host. *Frontiers in Microbiology*. 2012;**3**:223. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00223
- [42] Rogers M, Kropf P, Choi BS, Dillon R, Podinovskaia M, Bates P, Muller I. Proteophosphoglycans regurgitated by Leishmania-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathogens*. 2009;**5**:e1000555. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000555
- [43] Blachier F, Mignon A, Soubrane O. Polyamines inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in rat liver cytosol. *Nitric Oxide*. 1997;**1**:268-272. DOI: 10.1006/niox.1997.0127
- [44] Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *Journal of Immunology*. 1998;**160**:5347-5354
- [45] Choi BS, Martinez-Falero IC, Corset C, Munder M, Modolell M, Muller I, Kropf P. Differential impact of L-arginine deprivation on the activation and effector functions of T cells and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009;**85**:268-277. DOI: 10.1189/jlb.0508310
- [46] Munder M, Choi BS, Rogers M, Kropf P. L-arginine deprivation impairs *Leishmania major*-specific T-cell responses. *European Journal of Immunology*. 2009;**39**:2161-2172. DOI: 10.1002/eji.200839041
- [47] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: Critical control points. *Cell*. 2004;**116**:205-219
- [48] Green DR. Overview: Apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunological Reviews*. 2003;**193**:5-9
- [49] Hoeflich KP, Yeh WC, Yao Z, Mak TW, Woodgett JR. Mediation of TNF receptor-associated factor effector functions by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1). *Oncogene*. 1999;**18**:5814-5820. DOI: 10.1038/sj.onc.1202975
- [50] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*. 2001;**81**:807-869. DOI: 10.1152/physrev.2001.81.2.807
- [51] Luo HR, Hattori H, Hossain MA, Hester L, Huang Y, Lee-Kwon W, Donowitz M, Nagata E, Snyder SH. Akt as a mediator of cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;**100**:11712-11717. DOI: 10.1073/pnas.1634990100
- [52] Macdonald NJ, Delderfield SM, Zhang W, Tagliabatella G. Tumour necrosis factor- α -vs. growth factor deprivation-promoted cell death: Distinct converging pathways. *Aging Cell*. 2003;**2**:245-256
- [53] Tran TH, Andreka P, Rodrigues CO, Webster KA, Bishopric NH. Jun kinase delays caspase-9 activation by interaction with the apoptosome. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;**282**:20340-20350. DOI: 10.1074/jbc.M702210200

- [54] Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: All roads lead to death. *Nature Reviews. Immunology*. 2002;**2**:401-409. DOI: 10.1038/nri819
- [55] Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and apoptosis. *Annual Review of Microbiology*. 1999;**53**:577-628. DOI: 10.1146/annurev.micro.53.1.577
- [56] Gao LY, Kwai YA. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends in Microbiology*. 2000;**8**:306-313
- [57] Schaumburg F, Hippe D, Vutova P, Luder CG. Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. *Parasitology*. 2006;**132**(Suppl):S69-S85. DOI: 10.1017/S0031182006000874
- [58] Sinai AP, Payne TM, Carmen JC, Hardi L, Watson SJ, Molestina RE. Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 2004;**34**:381-391. DOI: 10.1016/j.ijpara.2003.11.009
- [59] Akarid K, Arnoult D, Micic-Polianski J, Sif J, Estaquier J, Ameisen JC. *Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004;**76**:95-103. DOI: 10.1189/jlb.1001877
- [60] Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *Journal of Immunology*. 1994;**152**:2930-2937
- [61] Moore KJ, Turco SJ, Matlashewski G. *Leishmania donovani* infection enhances macrophage viability in the absence of exogenous growth factor. *Journal of Leukocyte Biology*. 1994;**55**:91-98
- [62] Gutierrez-Kobeh L, de Oyarzabal E, Argueta J, Wilkins A, Salaiza N, Fernandez E, Lopez O, Aguirre M, Becker I. Inhibition of dendritic cell apoptosis by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Parasitology Research*. 2013;**112**:1755-1762. DOI: 10.1007/s00436-013-3334-2
- [63] Gutierrez-Kobeh L, de Oyarzabal E, Argueta J, Wilkins A, Salaiza N, Fernandez E, Lopez O, Aguirre M, Becker I, Gutierrez-Kobeh L. *Leishmania mexicana*: Inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Experimental Parasitology*. 2009;**121**:199-207. DOI: 10.1016/j.exppara.2008.10.020
- [64] Lisi S, Sisto M, Acquafredda A, Spinelli R, Schiavone M, Mitolo V, Brandonisio O, Panaro M. Infection with *Leishmania infantum* inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2005;**52**:211-217. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2005.00026.x
- [65] Donovan MJ, Maciuba BZ, Mahan CE, McDowell MA. *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Experimental Parasitology*. 2009;**123**:58-64. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.05.012
- [66] Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W, Laskay T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of Immunology*. 2002;**169**:898-905

- [67] Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *The Journal of Biological Chemistry*. 1996;**271**:17920-17926
- [68] Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997;**272**:30122-30128
- [69] Pimienta G, Pascual J. Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle*. 2007;**6**:2628-2632. DOI: 10.4161/cc.6.21.4930
- [70] Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*. 1991;**353**:670-674. DOI: 10.1038/353670a0
- [71] Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007;**26**:3100-3112. DOI: 10.1038/sj.onc.1210392
- [72] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews. Cancer*. 2002;**2**:489-501. DOI: 10.1038/nrc839
- [73] Agallou M, Dotsika E, Frydas S, Karagouni E. Toll-like receptor 4 promotes control of *Leishmania infantum* infection through inducement of leishmanicidal activity in host macrophages: Role of mitogen activated kinases. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2014;**28**:41-52
- [74] Boggiatto PM, Martinez PA, Pullikuth A, Jones DE, Bellaire B, Catling A, Petersen C. Targeted extracellular signal-regulated kinase activation mediated by *Leishmania amazonensis* requires MP1 scaffold. *Microbes and Infection*. 2014;**16**:328-336. DOI: 10.1016/j.micinf.2013.12.006
- [75] Ruhland A, Kima PE. Activation of PI3K/Akt signaling has a dominant negative effect on IL-12 production by macrophages infected with *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Experimental Parasitology*. 2009;**122**:28-36. DOI: 10.1016/j.exppara.2008.12.010
- [76] Handley ME, Thakker M, Pollara G, Chain BM, Katz DR. JNK activation limits dendritic cell maturation in response to reactive oxygen species by the induction of apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005;**38**:1637-1652. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.022
- [77] Nakagawa S, Ohtani T, Mizuashi M, Mollah ZU, Ito Y, Tagami H, Aiba S. p38 mitogen-activated protein kinase mediates dual role of ultraviolet B radiation in induction of maturation and apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2004;**123**:361-370. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.23238.x
- [78] Xie J, Qian J, Yang J, Wang S, Freeman ME 3rd, Yi Q. Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. *Experimental Hematology*. 2005;**33**:564-572. DOI: 10.1016/j.exphem.2005.03.001

- [79] Ruhland A, Leal N, Kima PE. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cellular Microbiology*. 2007;**9**:84-96. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00769.x
- [80] Sarkar A, Aga E, Bussmeyer U, Bhattacharyya A, Moller S, Hellberg L, Behnen M, Solbach W, Laskay T. Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. *Medical Microbiology and Immunology*. 2013;**202**:25-35. DOI: 10.1007/s00430-012-0246-1

L-arginine Metabolism in the Infection with *Trypanosoma cruzi*

Laila Gutiérrez-Kobeh and Arturo A. Wilkins-Rodríguez

Abstract

Trypanosoma cruzi is the causal agent of Chagas disease that affects 6–7 million people around the world, principally in Latin America. This disease is characterized for the presence of an acute phase in which the host immune response plays a central role in the elimination of the parasite. If the parasite is not efficiently eliminated, patients can remain asymptomatic or develop a chronic infection. One of the cells that are primarily infected with this intracellular parasite is macrophages (M ϕ). M ϕ present a wide array of activation states with classically activated macrophages in one pole (CAM ϕ) and alternatively activated macrophages (AAM ϕ) in the other. One of the most important differences between these two activation states is the presence of the inducible nitric oxide synthase (iNOS or NOS2) in CAM ϕ and arginase 1 (Arg-1) in AAM ϕ ; both enzymes share the same substrate, L-arginine, and are reciprocally regulated by the action of Th1 cytokines in the case of NOS2 and Th2 cytokines in the case of Arg-1. The activation of CAM ϕ permits the production of nitric oxide (NO), highly trypanotoxic, while the activation of AAM ϕ allows the synthesis of polyamines, necessary for parasite duplication. L-arginine is a very important metabolite situated in the center between the elimination and perpetuation of *T. cruzi*.

Keywords: arginase-1, L-arginine, inducible nitric oxide synthase, macrophages, *trypanosoma cruzi*

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is the causal agent of Chagas disease that affects 6–7 million people around the world, mainly in Latin America [1], although in the last years it has also become a potential public health problem in developed countries due to the constant migrations with cases reported in the USA, Canada, Europe, Japan, and Australia [2].

This intracellular obligate parasite enters the human host in the form of metacyclic promastigotes that are released from the triatomine feces during the blood meal, through damaged skin or mucosae. Alternatively, infection can occur through other routes such as oral, congenital, blood transfusions, or organ transplants. After entering the host, trypomastigotes are phagocytized mainly by macrophages, where they transform to amastigotes, the intracellular form that has the ability to replicate. In order to evade the host immune response and ensure its persistence inside macrophages, *Trypanosoma* has developed multiple strategies. One of these has as a target L-arginine metabolism. Macrophages can eliminate amastigotes or permit their survival depending on the balance of two inducible enzymes nitric

oxide synthase (iNOS or NOS2) and arginase-1 (Arg-1) that share the same substrate: L-arginine. During the activation of macrophages in the context known as classical activation, L-arginine is metabolized by iNOS giving rise to the production of nitric oxide (NO), one important trypanotoxic agent that permits these cells to destroy the parasite. On the other hand, during the activation of macrophages in the context known as alternative activation, L-arginine is metabolized by Arg-1 giving rise to the production of polyamines that favor multiplication and persistence of *Trypanosoma* in these cells. Thus, L-arginine is situated as a frontier between the elimination and survival of *Trypanosoma* in macrophages, and its metabolism is a determinant factor for the evolution of the disease.

2. Phases of the infection with *Trypanosoma cruzi*

The infection with *T. cruzi* presents an acute phase that is auto-limiting and can go unnoticed in many infected individuals. During this phase, parasites actively duplicate in different cells and tissues such as macrophages; muscular cells of smooth, striated, and cardiac muscles; adipocytes; and cells of the central nervous system [3]. While some patients succumb during the acute phase of the disease, the development of an adaptive immune generally permits the control of infection with *T. cruzi*. If the parasite is not completely eradicated, individuals remain infected for life, and a dynamic equilibrium is established with the parasite that results in different clinical outcomes. In this way, while many individuals chronically infected remain in an asymptomatic intermediate phase, a significant proportion (30–35%) of patients develop cardiac or digestive manifestations that can drive them to congestive cardiac failure, arrhythmias, and eventually death or develop colon or esophageal megasyndromes. All of these are irreversible pathologic changes that occur even though the presence of the parasite is scarce. One experimental model that recapitulates chagasic myocarditis is present in infected mice for long periods with different *T. cruzi* strains that develop chronic lesion in the myocardium [4, 5].

3. Generalities of L-arginine

L-arginine is one of the most versatile amino acids at the metabolic level. Besides serving as a precursor for protein synthesis, it is also a precursor of multiple compounds of great biologic importance such as urea, nitric oxide, polyamines, L-proline, glutamate, creatinine, and agmatine (**Figure 1**) [6, 7].

In adult mammals, L-arginine is a nonessential amino acid; nevertheless, during childhood and certain physiologic or pathologic conditions (e.g., pregnancy, sepsis, trauma, catabolic stress, intestinal or renal damage), it is considered as a semi-essential amino acid or conditioned nonessential, due to the fact that its consumption exceeds the capacity of being synthesized by the organism and has to be supplied exogenously [8–10]. In mammals, the provision of L-arginine depends on its procurement through the protein diet, endogenous synthesis (de novo synthesis), and its release during the process of protein replacement (**Figure 1**) [6]. Approximately 40% of the L-arginine that is obtained from the protein diet is catabolized in the intestine before entering the circulation [11]. In the absence of the contribution by the protein diet, approximately 80% of the L-arginine that enters the circulation derives from the protein replacement, and the remaining percentage is obtained through the novo synthesis [11]. L-arginine metabolism occurs basically in the liver and kidney; nevertheless, other tissues and cells also possess the required enzymes to metabolize it, including some cells of the immune response [12]. Regarding last point, it is

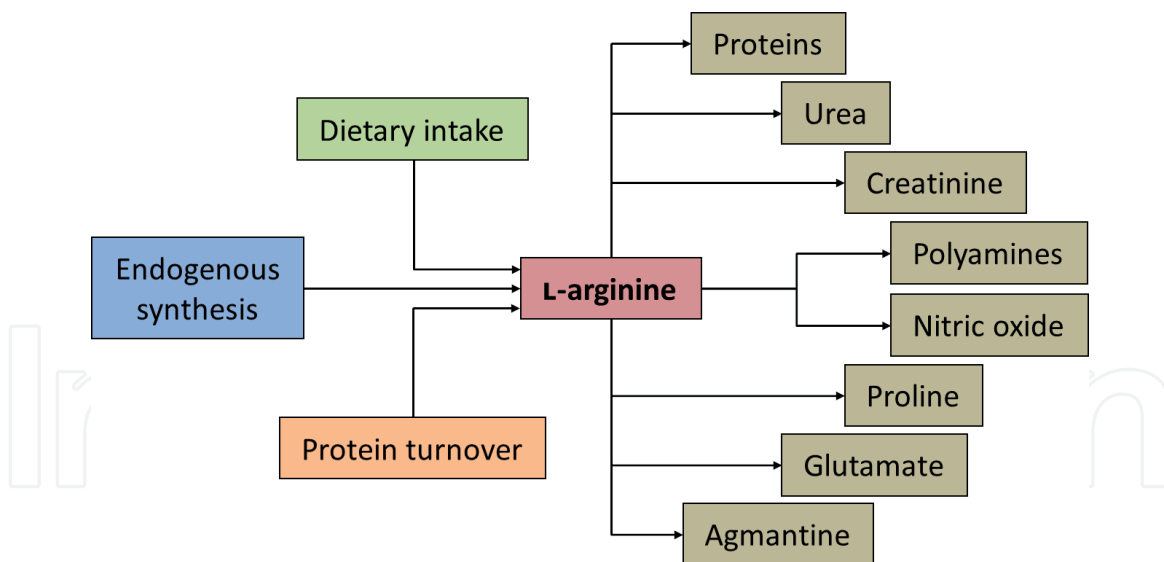


Figure 1.
Sources of L-arginine in mammals and its metabolic products.

interesting to note that a complete urea cycle has been described in macrophages [13]. Although only two enzymes directly involved in L-arginine synthesis have been identified (arginine succinate synthetase and arginine succinate lyase that are the third and fourth enzymes of the urea cycle), four enzymes utilize this amino acid as substrate: arginine decarboxylase, arginine/glycine aminotransferase, different isoforms of arginase (Arg), and the different isoforms of the nitric oxide synthases (NOS), the last two being the most studied and characterized [12]. In mammals two arginase isoforms exist, Arg-1 and Arg-2, that catalyze the same reaction but differ in cellular expression and subcellular localization. Arg-1 is cytosolic and is highly expressed in the liver and some cells of the immune response. Compared to Arg-1, Arg-2 is mitochondrial and is expressed in a great variety of peripheral tissues, mainly in the kidney, prostate, small intestine, and mammary glands during lactation [14]. Regarding NOS, this enzyme is present in three isoforms: neuronal NOS (nNOS or NOS1), inducible nitric oxide synthase (iNOS or NOS2), and endothelial NOS (eNOS or NOS3). NOS 1 is expressed in specific neurons of the central nervous system (CNS), and NOS3 is mostly expressed in endothelial cells [15]. NOS 2 is not usually expressed in cells, but its expression can be induced by bacterial lipopolysaccharide, cytokines, and other agents. Although primarily identified in macrophages, the expression of this enzyme can be stimulated in almost any cell or tissue, provided that the appropriate inducing agents are present [16].

4. L-arginine metabolism in the immune response: special emphasis in macrophages

In the immune response, L-arginine metabolism through NOS2 and Arg-1 has a pivotal role in the regulation of the effector capabilities of macrophages, dendritic cells, and neutrophils [17–20] during infectious processes caused by a great variety of microorganisms: different species of *Mycobacterium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Schistosoma*, and *Salmonella*, among others [21, 22].

L-arginine metabolism in the immune response acquired great relevance with the discovery that murine macrophages express both NOS2 and Arg-1 and that their expression is reciprocally regulated by the action of Th1/proinflammatory cytokines (e.g., IFN- γ and TNF- α) and Th2/anti-inflammatory (e.g., IL-4, IL-10, and IL-13) that determine the activation state of macrophages [19, 23–27].

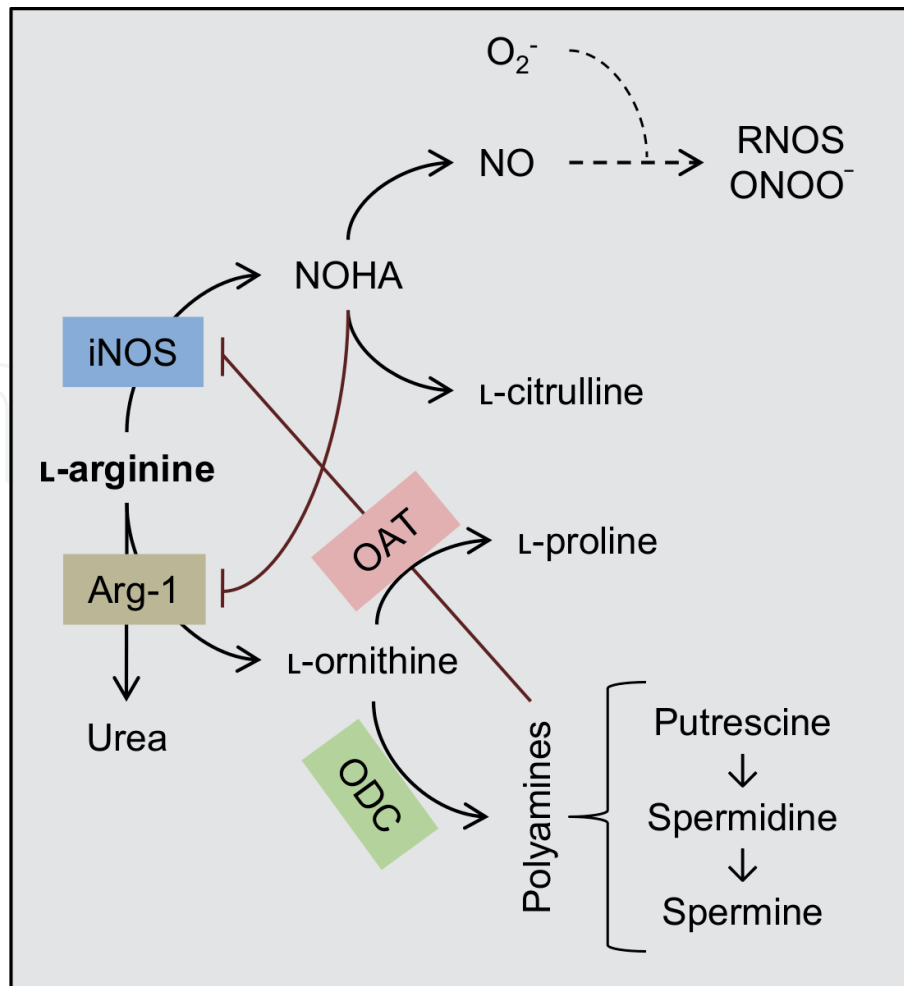


Figure 2. L-arginine metabolism through iNOS and Arg-1. iNOS, inducible nitric oxide synthase; Arg-1, arginase 1; NOHA, N^ω-OH-L-arginine; OAT, ornithine-aminotransferase; ODC, ornithine-decarboxylase; NO•, nitric oxide; O₂⁻, superoxide, RNOS, oxygen and nitrogen reactive species; ONOO⁻, peroxynitrite.

Th1 cytokines activate macrophages in a classical way (CAMΦ) and induce the expression and function of NOS2, while Th2 cytokines activate macrophages in an alternative way (AAMΦ) and induce the expression and function of Arg-1.

NOS2 or iNOS is an oxide-reductase responsible for the synthesis of L-citrulline and nitric oxide (NO•) from L-arginine in the presence of NADPH and oxygen. This reaction occurs through two successive reactions: the monooxygenation of L-arginine that drives to the production of the intermediary N^ω-OH- L-arginine (NOHA) and the subsequent hydrolysis of this last compound, thus producing L-citrulline and NO• (Figure 2). NOS2 generates both NO• and superoxide (O₂⁻) that together react to form the radical peroxynitrite (ONOO⁻) [28]. This last compound has been identified as a reactive species derived both from oxygen and nitrogen (RONS) that constitutes the principal cytostatic or cytotoxic mechanism of CAMΦ to fight the infections generated by virus, bacteria, fungi, and protozoan parasites [20, 23, 26, 29].

5. Immune response to *Trypanosoma cruzi*

Inside the mammalian host, macrophages represent an important site for the duplication of *T. cruzi*. One of the most important mechanisms in the protective immunity against *T. cruzi* is the activation of macrophages in order to achieve the elimination of parasites (Figure 3). CAMφ are able eliminate *T. cruzi* thanks to

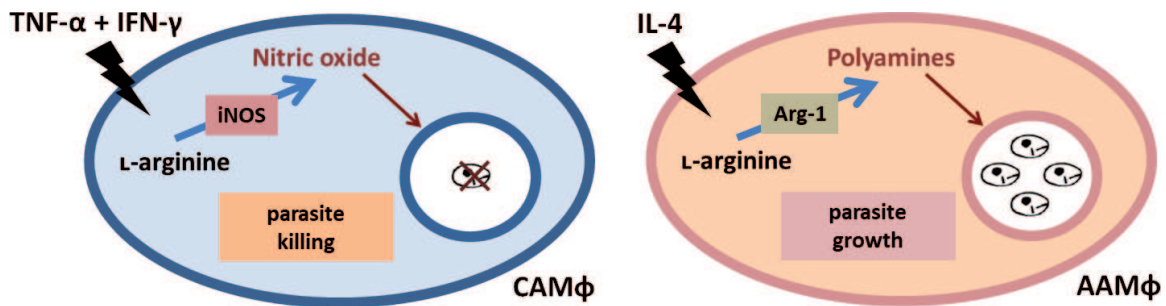


Figure 3.

*L-arginine metabolism in macrophages during *T. cruzi* infection. In classically activated macrophages (CAM ϕ), inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and function are induced. L-arginine metabolism through this enzyme entails the production of nitric oxide that possesses great trypanocidal capacity. In alternatively activated macrophages (AAM ϕ), arginase 1 (Arg-1) expression and function are induced. L-arginine metabolism through this enzyme entails the production of polyamines that favor *T. cruzi* multiplication inside macrophages.*

NOS2 and RONS that kill intracellular parasites by the modification of structural properties of *T. cruzi* molecules. On the other hand, the different forms of AAM ϕ present high levels of mannose receptor (MR) and an overregulation of Arginase 1 [30]. Arg-1 hydrolyzes L-arginine in urea and L-ornithine; the latter is the principal intracellular source for the synthesis of polyamines and trypanothione. Polyamines are small cationic molecules required for cellular proliferation and macrophage homeostatic processes, besides being vital for the intracellular growth of *Trypanosoma* [19, 31]. Both inducible enzymes share L-arginine as substrate, and the expression and function of both enzymes are reciprocally regulated by the action of Th1 and Th2 cytokines. Thus, L-arginine is situated as a frontier between the elimination and survival of *Trypanosoma* in host cells, and its metabolism is a determinant factor in the evolution of the disease.

In response to the defense mechanisms of the host, parasites have developed several strategies in order to escape host immune response and take advantage of some host's molecules. In this way, parasites must reduce the production of toxic molecules, including nitric oxide and its derivatives, that are synthesized by the immune system, in particular by macrophages [32–34]. In addition, internalized parasites of different *T. cruzi* strains are able to escape from the parasitophorous vacuole of resident macrophages [35], a strategy that utilizes a variety of molecules with antioxidant properties [36, 37]. Nevertheless, as the infection progresses, the evasion strategies displayed by *T. cruzi* are widely surpassed by the development of a humoral specific immune response and the activation of macrophages by IFN- γ and other cytokines. As has been previously mentioned, the infection with *T. cruzi* can have an acute or a chronic phase. One of the possible causes of the passage from one phase to another is the fact that the effector immune response against the parasite is insufficient or inappropriate due to a deficient activation of the specific immune response or an excessive regulation of this response.

6. Role of Arg-1 in the infection with *Trypanosoma*

The induction of Arg-1 in macrophages promotes the infection of parasites of the genus *Trypanosoma* by providing nutrients derived from polyamines, since *Trypanosoma* parasites cannot generate their own source of ornithine through the activity of a functional arginase [38, 39]. The increase in arginase activity counteracts the host's immune response and favors parasite growth. It has been shown that in African trypanosomiasis caused by *Trypanosoma gambiense*, there is an increase in the serum level of Arg-1 that returns to basal values after the treatment

[40]. Similarly, in experimental murine trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei*, macrophage Arg-1 activity represents a disease susceptibility marker [41]. In *T. brucei* Arg-1 activity is induced by excretion/secretion factors, particularly TbKHC1, kinesin H chain, and has been identified as an inductor factor of Arg-1 [38]. Other studies have demonstrated that the addition of an Arg-1 inhibitor reduces parasite growth, which is restored with L-ornithine supplementation. The essential requirement of L-ornithine is related with the absence of a functional arginase in *Trypanosoma* [39], which results in a dependence toward host's arginase for the synthesis of polyamines and trypanothione, which are essential for parasite survival, growth, and differentiation [42]. The difluoromethylornithine, structural analog of L-ornithine, has been used alone or in combination with nifurtimox as an effective drug against African trypanosomiasis [43]. Nevertheless, its administration is difficult and requires large amounts of i.v. injected fluids, which limits its use in remote areas. Thus, it is of utmost importance to find easier ways to select polyamine synthesis as a target against *Trypanosoma*. Alternatively, inhibitors of the route that conducts to arginase activity might reduce parasite loads in infected animals.

7. Conclusion

Trypanosoma cruzi is the causal agent of Chagas disease that affects 6–8 million people primarily in Latin America. It is an intracellular parasite that infects a variety of cells, among which macrophages are a very important target and thus transcendental for the immune response against the parasite. Macrophages can traverse through a gradient of stages of activation with classically activated macrophages in one end and alternatively activated macrophages in the other. These two phases of activation are characterized by the expression of two enzymes that are reciprocally regulated and share the same substrate: L-arginine. Classically activated macrophages express iNOS or NOS2 that is induced by Th1 cytokines and catalyze the conversion of L-arginine to L-citrulline and NO. Contrarily, alternatively activated macrophages express Arg-1 that is induced by Th2 cytokines. Thus, L-arginine metabolism is in the center of *Trypanosoma* elimination or survival. The better knowledge of this route during the different stages of *Trypanosoma* infection is of great importance for the better comprehension of disease progression and design of drugs.

Acknowledgements

This work was funded by project number IN218119 from Papiit, DGAPA, UNAM, to LGK.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interests.

IntechOpen

IntechOpen

Author details

Laila Gutiérrez-Kobeh* and Arturo A. Wilkins-Rodríguez
Research Unit UNAM-INC, Research Division, School of Medicine, National
Autonomous University of Mexico-National Institute of Cardiology “Ignacio
Chávez”, Mexico City, Mexico

*Address all correspondence to: lgutierr@unam.mx

IntechOpen

© 2019 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 

References

- [1] Coura JR, Vias PA. Chagas disease: A new worldwide challenge. *Nature*. 2010;**465**(7301):S6-S7. DOI: 10.1038/nature09221
- [2] Tibayrenc M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (discrete typing units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2003;**2**(1):12. DOI: 10.1186/1475-9292-2-12
- [3] Andrade SG, Andrade ZA. Pathology of prolonged experimental Chagas disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1968;**10**(3):180-187
- [4] Laguens RP, Meckert PC, Gelpi RJ. Chronic Chagas disease in the mouse. I. Electrocardiographic and morphological patterns of the cardiopathy. *Medicina (Buenos Aires)*. 1981;**41**(1):35-39
- [5] Pinto Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas disease. A clinical epidemiological review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1989;**22**(3):147-156
- [6] Morris SM Jr. Arginine: Beyond protein. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;**83**(2):508S-512S. DOI: 10.1093/ajcn/83.2.508S
- [7] Morris SM Jr. Arginases and arginine deficiency syndromes. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2012;**15**(1):64-70. DOI: 10.1097/MCO.0b013e32834d1a08
- [8] Bernard AC, Mistry SK, Morris SM Jr, O'Brian WE, Tsuei BJ, Maley ME, et al. Alterations in arginine metabolic enzymes in trauma. *Shock*. 2001;**15**(3):215-219
- [9] Luiking YC, Hallemeesch MM, Vissers YL, Lamers WH, Deutz NE. In vivo whole body and organ arginine metabolism during endotoxemia (sepsis) is dependent on mouse strain and gender. *Journal of Nutrition*. 2004;**134**(10 Suppl):2768S-2774S; discussion 2796S-2797S. DOI: 10.1093/jn/134.10.2768S
- [10] Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature Reviews Immunology*. 2005;**5**(8):641-654. DOI: 10.1038/nri1668
- [11] Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*. 1998;**336**:1-17. DOI: 10.1042/bj3360001
- [12] Mori M, Gotoh T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *Journal of Nutrition*. 2004;**134**(10 Suppl):2820S-2825S; discussion 2853S. DOI: 10.1093/jn/134.10.2820S
- [13] Hofmann F, Kreuzsch J, Maier KP, Munder PG, Decker K. The urea cycle in different types of macrophages. *Biochemical Society Transactions*. 1978;**6**(5):990-993. DOI: 10.1042/bst0060990
- [14] Munder M. Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system. *British Journal of Pharmacology*. 2009;**158**(3):638-651. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x
- [15] Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*. 2012;**33**:829-837, 837a-837d. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304
- [16] Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994;**23**:1121-1131

- [17] Mayer AK, Bartz H, Fey F, Schmidt LM, Dalpke AH. Airway epithelial cells modify immune responses by inducing an anti-inflammatory microenvironment. *European Journal of Immunology*. 2008;**38**(6):1689-1699. DOI: 10.1002/eji.200737936
- [18] Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil Lammagere C, Fuentes JM, et al. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*. 2005;**105**(6):2549-2556. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2521
- [19] Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *Journal of Immunology*. 1999;**163**(7):3771-3777
- [20] Wilkins-Rodriguez AA, Escalona-Montaño AR, Becker I, Gutiérrez-Kobeh L. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Experimental Parasitology*. 2010;**126**(3):426-434. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.07.014
- [21] Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunology Research*. 2008;**41**(1):15-25. DOI: 10.1007/s12026-007-8012-y
- [22] Das PA, Lahiri A, Chakravorty D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: A metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathogens*. 2010;**6**(6):e1000899. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000899
- [23] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. 2008;**8**(12):958-969. DOI: 10.1038/nri2448
- [24] Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *European Journal of Immunology*. 1995;**25**(4):1101-1104. DOI: 10.1002/eji.1830250436
- [25] Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;**269**(19):13725-13728
- [26] MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 1997;**15**:323-350. DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323
- [27] Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: Competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *Journal of Immunology*. 1998;**160**(11):5347-5354
- [28] Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1996;**93**(13):6770-6774
- [29] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*. 2001;**2**(10):907-916. DOI: 10.1038/ni1001-907
- [30] Stempin C, Tanos TB, Coso OA, Cerbán FM. Arginase induction promotes *Trypanosoma cruzi* intracellular replication in cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways. *European Journal of Immunology*. 2004;**34**:200-209. DOI: 10.1002/eji.200324313
- [31] Stempin C, Giordanengo L, Gea S, Cerbán F. Alternative activation and

increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *Journal of Leukocyte Biology*. 2002;72:727-734. DOI: 10.1189/jlb.72.4.727

[32] Vincendeau P, Daulouède S. Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma musculi* involves an L-arginine-dependent mechanism. *Journal of Immunology*. 1991;146:4338-4343

[33] Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends in Immunology*. 2015;36:161-178. DOI: 10.1016/j.it.2015.01.003

[34] Nogueira N, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*: Mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1976;143(6):1402-1420. DOI: 10.1084/jem.143.6.1402

[35] Metz G, Carlier Y, Vray B. *Trypanosoma cruzi* upregulates nitric oxide release by IFN- γ -preactivated macrophages, limiting cell infection independently of the respiratory burst. *Parasite Immunology*. 1993;15:693-699. DOI: 10.1111/j.1365-3024.1993.tb00584.x

[36] Pakianathan DR, Kuhn RE. *Trypanosoma cruzi* affects nitric oxide production by murine peritoneal macrophages. *Journal of Parasitology*. 1994;80:432-437

[37] De Muylder G, Daulouède S, Lecordier L, Uzureau P, Morias Y, Van DenAbbeele J, et al. A *Trypanosoma brucei* kinesin heavy chain promotes parasite growth by triggering host arginase activity. *PLoS Pathogens*. 2013;9:e1003731. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003731

[38] Hai Y, Kerkhoven EJ, Barrett MP, Christianson DW. Crystal structure of an arginase-like protein from *Trypanosoma brucei* that evolved

without a binuclear manganese cluster. *Biochemistry*. 2015;54:458-471. DOI: 10.1021/bi501366a

[39] Namangala B, De Baetselier P, Noël W, Brys L, Beschin A. Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomiasis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001;69:387-396. DOI: 10.1189/jlb.69.3.387

[40] Gobert AP, Daulouède S, Lepoivre M, Boucher JL, Bouteille B, Buguet A, et al. L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infection and Immunity*. 2000;68:4653-4657. DOI: 10.1128/IAI.68.8.4653-4657.2000

[41] Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher FG, et al. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005;77:321-327. DOI: 10.1189/jlb.0304212

[42] Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual Reviews Microbiology*. 1992;46:695-729. DOI: 10.1146/annurev.mi.46.100192.003403

[43] Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Ngouama D, Ghorashian S, Arnold U, et al. Nifurtimoxeflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: A multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet*. 2009;374:56-64. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61117-X