



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON  
L-TRIPTÓFANO Y DE LA INHIBICIÓN DE SU  
METABOLISMO A TRAVÉS DE  
1-METIL-L-TRIPTÓFANO EN RATONES BALB/C  
INFECTADOS CON *Leishmania mexicana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

TORRES MARTINEZ LISSET GUADALUPE

Directora de tesis:

DRA. INGEBOURG BECKER FAUSER

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. Mx., 2022





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales






Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE  
Directora General  
Dirección General de Administración Escolar  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Análisis de la suplementación con L-triptófano y de la inhibición de su metabolismo a través de 1-metil-L-triptófano en ratones BALB/c infectados con Leishmania mexicana**

realizado por **Lisset Guadalupe Torres Martínez** con número de cuenta **313214567** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietaria Dra. Paula Licon Limón   
Propietario Dr. Ismael Mancilla Herrera   
Propietaria Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser   
Tutora  
Suplente Dra. Marisol de la Fuente Granada   
Suplente Dr. José Sotero Delgado Domínguez 

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 13 DE SEPTIEMBRE DE 2021**

**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

*Dedicatoria ...*

*A mi madre,  
A mi abuelita,  
La vida me premió con grandes mujeres*

*A todas las mujeres que estuvieron conmigo  
en el proceso de mi formación.  
¡Nunca más una ciencia sin nosotras!*

*“Estoy hecha de mujeres que un día son fuego arrasador abriendo senderos y al otro  
lluvia que propicia vida, estoy hecha de todas, sus historias se entretajan formando  
parte de la mía que es un hilo de la suya. Estoy hecha de mujeres hechas de otras  
mujeres, mi cuerpo y mi mente son cartografía de mis ancestas”.*

*- Julia Celeste  
San Quitín, Baja California*

---

# Agradecimientos

---

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, y en especial a mis profesores de Facultad de Ciencias, por todo el conocimiento brindado en mi desarrollo académico y personal.

Al proyecto CONACyT: Ciencias de frontera 6682 y al Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, DGAPA-UNAM (PAPIIT IG201221) por el financiamiento de este proyecto.

A mi tutora, la Dra. Ingeborg Becker por su apoyo y asesoría en este proyecto.

Al Dr. Jaime Zamora Chimal por toda su dedicación en mi formación profesional, por la dirección y asesoría que le aportó a este trabajo, por su apoyo técnico en la citometría de flujo y, sobre todo, por su instrucción de mi crecimiento en la ciencia.

Al Dr. José Sotero Delgado Domínguez, por su apoyo y enseñanza en el manejo de animales de laboratorio.

A la M. en C. Rocely Buenaventura Cervantes Sarabia, por su apoyo en el cultivo de parásitos.

A la M. en C. Adriana Ruiz Remigio, por su apoyo y asesoría en la enseñanza de técnicas de inmunodetección.

A la M. en C. Anayántzin Paulina Heredia Antúnez, por su apoyo y enseñanza del cuidado y la facilitación de los animales de laboratorio usados en el presente estudio.

A mi comité sinodal, gracias infinitas por sus comentarios, observaciones y su tiempo, sus aportaciones fueron muy importantes en mi trabajo.

A la neurocientífica Alexandra Asanovna Elbakyan, por proveer un sitio de acceso gratuito a trabajos de investigación que hizo posible enriquecer mi investigación.

A todos los animales de experimentación utilizados en este proyecto.

## Agradecimientos a título personal

De manera personal me gustaría agradecer a mis dos madres: María de los Ángeles, por inspirarme cada día a ser una gran mujer y por todo el amor que me das. Y a Graciela Ruiz, por todos los cuidados, consejos y desvelos que me han ayudado a crecer. Gracias a ambas por apoyarme a cumplir mis metas, por creer en mí y festejar mis logros.

A mis hermanos y hermana, por la paciencia que tuvieron durante mi formación, por los consejos y los buenos momentos brindados.

A mis primas Vianey Martínez y Karla Martínez, por motivarme a crecer, por todas las locuras que hemos pasado juntas y escucharme siempre que lo he necesitado.

A mi mejor amiga Luz Sandoval, por todo el apoyo que me das, por ser una de mis inspiraciones para crecer, por los desvelos, pláticas y recuerdos que tenemos juntas. Gracias por brindarme la amistad más bonita y sincera.

A mis amigxs: Horacio Alvarado (gracias por ser tan auténtico); Lizeth Alvarado; Eduardo Zambrano; Angel Rubio; Iván Pereznegrón y Daniel Martínez, por todas las risas, experiencias, consejos y locuras vividas que siempre me han dejado una enseñanza.

A todos mis compañeros del laboratorio de inmunoparasitología, por siempre brindarme una sonrisa o algún consejo.

A mi compañero y amigo Adolfo Cruz, gracias por las risas y consejos en la última etapa de la elaboración de este proyecto.

A la M. en C. Cristina Cañeda, por su excelente enseñanza

Al Dr. José Sotero Delgado, por las charlas, consejos y enseñanzas.

Especialmente quiero agradecer al Dr. Jaime Zamora Chimal, agradezco que seas mi gran referente científico, aquella persona a la que admiro y le debo tanto de mi formación como futura científica. Gracias por la dedicación y paciencia que me brindaste durante todo mi crecimiento, por todos los consejos y por nunca dejarme retroceder. ¡Gracias por siempre dar lo mejor de ti!

---

# Resumen

---

El catabolismo extrahepático del L-triptófano (Trp) es regulado por la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) para producir quinureninas (Kyn). Las Kyn inducen diferenciación de células T reguladoras y supresión de células inflamatorias, lo cual puede inhibir mecanismos microbicidas. *Leishmania* induce la expresión de IDO como un mecanismo de supervivencia dentro de su célula hospedera. Asimismo, la inhibición de IDO mediante 1-L-metil-Trp (L-1-MT) ha sido probada como tratamiento en enfermedades causadas por parásitos intracelulares, ya que inhibe los efectos inmunosupresores de la enzima. En este trabajo se analizó el efecto de la suplementación con Trp en el desarrollo de la infección por *L. mexicana* y si la inhibición de su catabolismo por L-1-MT funcionaba como tratamiento contra el parásito. Para analizar el efecto del Trp en el desarrollo de la enfermedad, se infectaron ratones BALB/c con promastigotes en la almohadilla plantar y se suplementaron con 1.224-19.585 mM de Trp por 43 días. Para analizar el efecto de L-1-MT, se administró el inhibidor (2 mg/mL) por 10 días. Posteriormente, se cuantificó la producción de citocinas: IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10, en células de ganglio drenante. En ambos experimentos, se cuantificó el tamaño de la lesión y la carga parasitaria. Los resultados mostraron que la suplementación con Trp aumentó la inflamación y la carga parasitaria, mientras que L-1-MT no produjo cambios. Además, la administración de Trp + L-1-MT aumentó la carga parasitaria y la producción de citocinas, con predominancia de IL-10. En conclusión, el Trp promueve el crecimiento del parásito, mientras que la administración de L-1-MT no contribuye con resolución de la infección.

---

# Abstract

---

L-tryptophan (Trp) is an immunomodulator metabolized by Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), an extrahepatic enzyme that generates kynurenines (Kyn). Kyn induces differentiation of regulatory T cells and the suppression of inflammatory cells which could inhibit microbicidal mechanisms. *Leishmania* induces IDO activity as a mechanism of self-survival within its host cell. Furthermore, IDO inhibition through L-methyl-Trp (L-1-MT) has been used against intracellular parasitic diseases because L-1-MT inhibits immunosuppressive effects of IDO. This work analyzed the effect of Trp supplementation in *L. mexicana* infection and Trp catabolism inhibition through L-1-MT as a treatment against the parasite. BALB/c mice were infected with  $1 \times 10^6$  parasites and were supplemented with 1.224-19.585 mM of Trp for 43 days. For the analysis of IDO inhibition in infected mice, L-1-MT was dispensed for ten days after 26 days of infection. Thereafter, the production of anti and proinflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10) by cells from the draining lymph node were measured. In both experiments, the lesion sizes and number of parasites within lesions were analyzed. The results showed that Trp supplementation enhanced footpad swelling, as well as parasite loads, whereas L-1-MT supplementation did not induce changes in disease evolution. When the supplementation with Trp + L-1-MT was used, an increased parasite burden and increased anti and proinflammatory cytokine production were evidenced, most importantly of IL-10. In conclusion, Trp supplementation exacerbates *L. mexicana* infection, and IDO inhibition through L-1-MT does not resolve the infection.



---

# Índice general

---

<b>Agradecimientos</b>	II
<b>Resumen</b>	IV
<b>Abstract</b>	V
<b>Índice de abreviaturas</b>	IX
<b>1. Introducción</b>	1
1.1. Leishmaniasis . . . . .	1
1.2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> . . . . .	2
1.3. La respuesta inmune en la leishmaniasis . . . . .	5
1.3.1. Respuesta inmune innata . . . . .	5
1.3.2. Respuesta inmune adaptativa . . . . .	6
1.4. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por <i>Leishmania</i> . . . . .	8
1.5. Metabolismo del L-triptófano . . . . .	10
1.5.1. Metabolismo del L-triptófano en <i>Leishmania</i> . . . . .	10
1.5.2. Metabolismo del L-triptófano en mamíferos . . . . .	11
1.5.3. Vía de las quinureninas . . . . .	11
1.6. Expresión de IDO . . . . .	14
1.7. Las quinureninas y su interacción con el sistema inmune . . . . .	15
1.8. 1-Metiltriptófano: un inhibidor competitivo de IDO . . . . .	18
<b>2. Justificación</b>	20

<b>3. Hipótesis</b>	<b>21</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>22</b>
4.1. Objetivo general . . . . .	22
4.1.1. Objetivos particulares . . . . .	22
<b>5. Animales de experimentación</b>	<b>23</b>
<b>6. Materiales y métodos</b>	<b>24</b>
<b>7. Resultados</b>	<b>30</b>
<b>8. Discusión</b>	<b>38</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>45</b>
<b>10. Perspectivas</b>	<b>46</b>
<b>11. Anexos</b>	<b>63</b>
11.1. Materiales y métodos . . . . .	63
11.2. Figuras . . . . .	64

---

# Índice de figuras

---

1.1. Cuadros clínicos de la leishmaniasis . . . . .	2
1.2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> . . . . .	4
1.3. Dicotomía de la respuesta Th1 y Th2 en la infección por <i>L. major</i> en el modelo murino . . . . .	7
1.4. Estructura química del L-Triptófano y su anillo indol . . . . .	11
1.5. Metabolismo del L-triptófano mediante la vía de las quinureninas . . . . .	13
1.6. Mecanismos reguladores del agotamiento del L-Trp sobre la respuesta inmune inflamatoria . . . . .	17
1.7. Estructura química de los estereoisómeros del 1-Metil-triptófano . . . . .	18
7.1. Efecto del Trp en la sobrevivencia de <i>L. mexicana</i> . . . . .	31
7.2. Progresión de la infección en ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> suplementados con Trp . . . . .	33
7.3. Progresión de la infección en ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> suplementados con L-1-MT, Trp o Trp + L-1-MT . . . . .	35
7.4. Producción de citocinas en el nódulo linfático poplíteo de ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> y tratados con L-1-MT, Trp o Trp + L-1-MT . . . . .	37
8.1. Modelo teórico del papel del Trp y de la inhibición de su metabolismo a través de L-1-MT durante la infección por <i>L. mexicana</i> . . . . .	44
11.1. Viabilidad de macrófagos murinos derivados de medula ósea estimulados con Trp . . . . .	65

11.2. Porcentaje del peso de ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> y	
suplementados con Trp. . . . .	66
11.3. Peso de ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> y suplementados	
con L-1-MT, Trp o Trp + L-1-MT . . . . .	67

---

# Índice alfabético

---

- 3-HAAO:** 3-Hidroxiantranílico 3,4 dioxigenasa, [12](#)
- 3-HAA:** Ácido 3-Hidroxiantranílico, [12](#), [15](#)
- 3-HK:** 3-Hidroxiquinurenina, [12](#), [19](#)
- AA:** Ácido Antranílico, [12](#)
- ACMSD:** 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdehído descarboxilasa, [12](#)
- ACMS:** 2-Amino 3-Carboximuconato 6-Semialdehído, [12](#)
- AMS:** 2-aminomuconato-6-semialdehído, [12](#)
- AhR:** Receptor de Hidrocarburo de Arilo, [14](#), [15](#), [19](#)
- Ap-1:** Proteína Activadora 1, [9](#)
- CD28:** Clúster de Diferenciación 28, [14](#)
- CD:** Células Dendríticas, [5](#)
- CR1:** Receptor del Complemento 1, [9](#)
- CR3:** receptor del complemento 3, [9](#)
- CTLA-4:** Antígeno 4 Asociado a Linfocito T Citotóxico, [14](#)
- D-1-MT:** 1-Metil-D-Triptófano, [18](#), [19](#)
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico, [5](#)
- GAS:** Secuencias Activadas Gamma, [14](#)
- GCN2:** Cinasa de Control General No Represiva 2, [15](#)
- GP63:** Glicoproteína de 63 KDa, [2](#), [8](#), [9](#)
- GPI:** Glicosilfosfatidilinositol, [5](#)
- IDO:** Indolamina 2,3-dioxigenasa, [11](#), [14](#), [15](#), [18](#), [19](#), [34](#), [36](#), [38](#), [40](#), [42](#)
- IFN- $\gamma$ :** Interferón Gamma, [5](#)-[8](#), [14](#), [19](#), [21](#), [22](#), [29](#), [36](#), [41](#)-[43](#)
- IL-10:** Interleucina 10, [6](#), [8](#), [15](#), [18](#), [29](#), [36](#), [41](#), [42](#), [45](#)
- IL-12:** Interleucina 12, [6](#), [19](#)
- IL-13:** Interleucina 13, [7](#), [42](#)
- IL-17:** Interleucina 17, [42](#)
- IL-2:** Interleucina 2, [29](#), [36](#), [41](#), [43](#)
- IL-4:** Interleucina 4, [6](#), [29](#), [36](#), [41](#), [43](#)
- IL-5:** Interleucina 5, [29](#), [36](#), [41](#)
- ISGs:** Genes Estimulados por Interferón, [14](#)
- ISRE:** Elementos Reguladores Estimulados por Interferón, [14](#)

- ISR:** Repuesta de Estrés Integrada, [15](#)
- JAK:** Janus Cinasa, [14](#)
- KAT:** Quinurenina Aminotransferasa, [12](#)
- KA:** Ácido Quinurénico, [12](#), [15](#)
- KMO:** Quinurenina 3-Monoxigenasa, [12](#)
- KP:** Vía de las Quinureninas, [11](#)
- KYNU-A:** Kinureninasa A, [12](#)
- KYNU-B:** Kinureninasa B, [12](#)
- Kyn:** Quinureninas, [14](#), [15](#), [19](#), [38](#)
- L-1-MT:** 1-Metil-L-Triptófano, [18](#), [20](#), [22](#), [28](#), [29](#), [34](#), [36](#), [38](#), [40](#), [45](#)
- L-Kyn:** L-Quinurenina, [12](#), [15](#)
- L-MT:** 1-Metil-Triptófano, [18](#)
- LAT1:** Transportador de L-aminoácidos 1, [15](#)
- LCD:** Leishmaniasis Cutánea Difusa, [1](#)
- LCL:** Leishmaniasis Cutánea Localizada, [1](#), [8](#)
- LC:** Leishmaniasis Cutánea, [1](#), [2](#), [6](#)
- LMC:** Leishmaniasis Mucocutánea, [1](#)
- LPG:** Lipofosfoglicano, [2](#), [3](#), [6](#), [8](#), [9](#)
- LPS:** Lipopolisacárido, [14](#)
- LV:** Leishmaniasis Visceral, [1](#)
- MAC:** Complejo de Ataque a Membrana, [9](#)
- MHC-II:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad II, [9](#)
- MHC-I:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad I, [9](#)
- NAD<sup>+</sup>:** Dinucleótido de Adenina de Nicotinamida, [12](#)
- NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato, [9](#)
- NETs:** Trampas Extracelulares de Neutrófilos, [5](#)
- NF- $\kappa$ B:** Factor de Transcripción Nuclear Kappa Beta, [9](#), [14](#)
- NFK:** N-formilquinurenina, [12](#)
- NK:** Asesinas Naturales, [5](#), [6](#)
- NOX2:** NADPH Oxidasa 2, [5](#)
- NO:** Óxido Nítrico, [5](#), [6](#), [9](#)
- PAMP:** Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, [6](#)
- PA:** Ácido Picolínico, [12](#)
- PD1:** Proteína de Muerte Celular Programada 1, [14](#)
- PDL-1:** Ligando 1 de Muerte Programada, [14](#)
- PP2C:** Proteína Fosfatasa 2C, [9](#)
- PRR:** Receptor de Reconocimiento de Patrones, [6](#)
- QA:** Ácido Quinolínico, [12](#), [15](#), [16](#)
- RIA:** Respuesta Inmune Adaptativa, [5](#), [6](#)
- RII:** Respuesta Inmune Innata, [5](#)
- RNS:** Especies Reactivas de Nitrógeno, [5](#), [6](#), [8](#), [9](#)
- ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno, [5](#), [6](#), [9](#)
- SNARE:** Receptores de Proteínas Solubles de Fijación a Membrana, [9](#)

- STAT:** Transductor de Señales y Activador de la transcripción, [14](#)
- TAT:** Tirosina Aminotransferasa, [10](#)
- TDO:** Triptófano 2,3-dioxigenasa, [11](#)
- TGF- $\beta$ :** Factor de Crecimiento Transformante Beta, [6](#), [15](#)
- TLR-2:** Receptor 2 Tipo Toll, [6](#)
- TLR:** Receptores Tipo Toll, [5](#), [6](#)
- TNF:** Factor de Necrosis Tumoral, [5-7](#), [19](#)
- Th1:** Linfocitos Cooperadores tipo 1, [6](#), [16](#)
- Th2:** Linfocitos Cooperadores tipo 2, [6](#), [16](#)
- Tregs:** Linfocitos T reguladores, [15](#), [42](#), [45](#)
- Trp:** L-Triptófano, [9-11](#), [15](#), [18-22](#), [26](#), [27](#), [30](#), [32](#), [34](#), [36](#), [38](#), [39](#)
- eIF2 $\alpha$ :** Factor de Iniciación de la Traducción Eucariota, [15](#)
- iNOS:** Óxido Nítrico Sintasa Inducible, [5](#), [9](#)
- mRNA:** Ácido Ribonucleico mensajero, [15](#)
- tRNA:** Ácido Ribonucleico de transferencia, [15](#)

# Introducción

---

## 1.1. Leishmaniasis

Las leishmaniasis comprenden un amplio espectro de enfermedades tropicales desatendidas causadas por la infección intracelular de protozoarios del género *Leishmania* [1]. En América estas enfermedades son transmitidas a mamíferos, como el humano, por la mordedura de un vector del género *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) [2].

La severidad de las manifestaciones clínicas de las leishmaniasis depende de la especie del agente causal y las características del hospedero. La forma más grave desarrolla manifestaciones viscerales (LV), letales en el 100 % de los casos si no se recibe tratamiento, pues afecta órganos internos como hígado y bazo (Fig. 1.1 A). También hay lesiones mucocutáneas (LMC) caracterizadas por la invasión y destrucción de la mucosa nasofaríngea (Fig. 1.1 B); hasta las lesiones cutáneas (LC) autocurables, pero desfigurantes y estigmatizantes, caracterizadas por la presencia de úlceras o nódulos en la piel y que se presentan en dos formas clínicas con características inmunológicas opuestas: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) (Fig. 1.1 C) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) (Fig. 1.1 D) [1, 3].





Figura 1.1: **Cuadros clínicos de la leishmaniasis.** A) Leishmaniasis visceral. *Fotografía recuperada de JML Costa, WHO [7].* B) Leishmaniasis mucocutánea. *Fotografía recuperada de Velez et al. (2013) [8].* C) Leishmaniasis cutánea localizada. *Fotografía recuperada de C. Black, WHO [9].* D) Leishmaniasis cutánea difusa. *Fotografía recuperada de Mokni (2016) [10].*

En México existe evidencia de la coexistencia de múltiples especies de *Leishmania* [4], por lo que en el país se pueden encontrar las tres formas clínicas [4, 5]; sin embargo la LC tiene la mayor prevalencia y *L. mexicana* es la principal especie responsable de las infecciones con 2131 casos presentados entre 2017 y 2019 [6].

## 1.2. Ciclo de vida de *Leishmania*

La infección por *Leishmania* comienza con la mordedura de un díptero hembra que durante su alimentación inyecta promastigotes metacíclicos en la dermis del mamífero [11, 12]. Posteriormente, las sustancias de la saliva del insecto inducen una rápida infiltración de neutrófilos y el reclutamiento de fagocitos. Los parásitos son reconocidos por fagocitos, principalmente macrófagos, mediante sus moléculas de superficie como lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína de 63 kDa (GP63), tras lo cual son internalizados mediante fagocitosis [12, 3].

Dentro de la célula, los promastigotes se mantienen en la vacuola parasitófora y se transforman en amastigotes los cuales se replican en este organelo. Después de una intensa multiplicación, la membrana del macrófago se lisa liberando a los amastigotes

en el tejido con la capacidad de invadir nuevas células o con la probabilidad de ser ingeridos por un nuevo díptero [12].

En el díptero, la sangre con macrófagos infectados o con amastigotes libres es digerida en el intestino medio abdominal y ahí los amastigotes se transforman en su forma replicativa llamada promastigotes procíclicos. Posteriormente, los parásitos son liberados en el epitelio del intestino medio, se replican y se unen a las microvellosidades del epitelio [12, 11]. Los parásitos comienzan a producir un gel y a transformarse a su estadio infectivo: promastigote metacíclico. Luego, con cambios en la composición de LPG y con la secreción del gel, los parásitos se liberan del epitelio hacia regiones anteriores del sistema digestivo para finalmente provocar daño al sistema que facilita: su regurgitación durante la alimentación del insecto, la llegada a la región anterior y la infección a un nuevo hospedero mamífero, cerrando así el ciclo de vida (Fig.1.2) [3, 12].

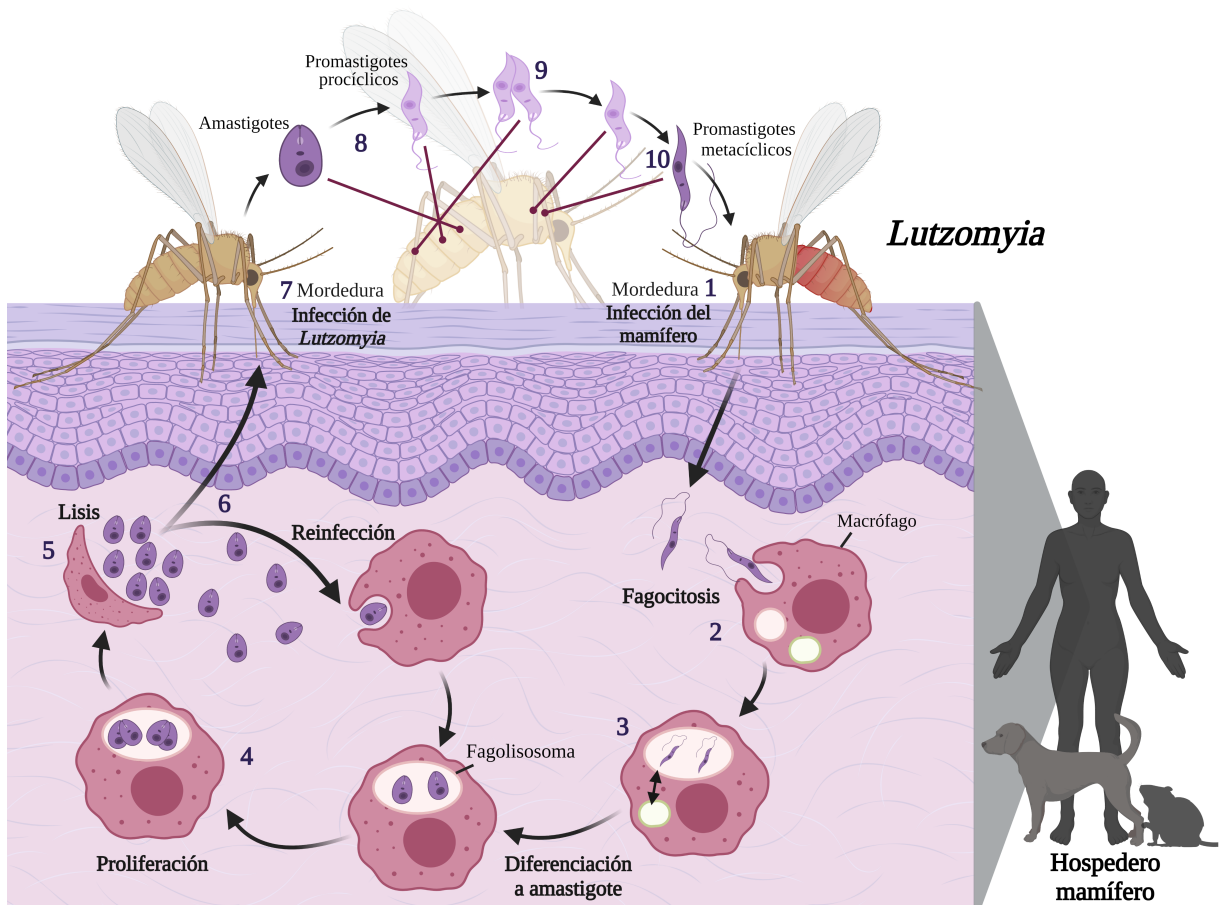


Figura 1.2: Ciclo de vida de *Leishmania*. 1) Infección del hospedero mamífero. 2) Fagocitosis del parásito. 3) Formación de la vacuola parasitófora y diferenciación a amastigotes. 4) Proliferación del parásito. 5) Liberación de los amastigotes. 6) Reinfección de células sanas o infección del díptero. 7) El díptero se alimenta del hospedero mamífero e ingiere amastigotes. 8) Diferenciación a promastigotes procíclicos en el intestino del vector. 9) Proliferación de promastigotes procíclicos. 10) Diferenciación a promastigotes metacíclicos. [12, 11]. Elaboración propia.

## 1.3. La respuesta inmune en la leishmaniasis

### 1.3.1. Respuesta inmune innata

El éxito de la defensa contra *Leishmania* requiere de un papel crítico de ambas respuestas inmunológicas: la respuesta inmune innata (RII) y la respuesta inmune adaptativa (RIA) [13]. Con la detección de promastigotes en la dermis, el sistema de complemento, uno de los componentes que actúa en la fase temprana de la infección, se activa y promueve la fagocitosis por opsonización y la lisis de *Leishmania* mediante el complejo de ataque a membrana (MAC) que conduce a la eliminación eficaz de más del 90 % de los parásitos inoculados [14, 15]. Sin embargo, el pequeño porcentaje de parásitos viables es capaz de permanecer y desarrollar la infección [15].

La rápida infiltración y reclutamiento al sitio de infección de fagocitos, como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (CD) [16, 15], induce la fagocitosis mediada por los receptores tipo Toll (TLR) que reconocen al patógeno a través de sus moléculas de superficie como LPG, GP63 y glicosilfosfatidilinositol (GPI) [16, 17]. La internalización del parásito le confiere protección a los efectos líticos del complemento, lo que favorece su establecimiento, proliferación y diferenciación hacia amastigote [14, 12].

Las células infectadas activan a las células naturales asesinas (NK), a través de la producción de interleucina 12 (IL-12) [16, 14], para inducir la producción de citocinas proinflamatorias como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF) [16, 14]. Estas citocinas actúan sinérgicamente para activar los mecanismos leishmanicidas de las células infectadas: la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el superóxido ( $O_2^-$ ) mediado por la NADPH oxidasa 2 (NOX2), y especies reactivas de nitrógeno (RNS), como óxido nítrico (NO) mediado por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [16, 14, 18].

Los neutrófilos representan un arma de doble filo en la infección [18]. Por un lado, producen trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), redes compuestas de DNA asociadas a proteínas antimicrobianas como elastasas, histonas y gránulos tóxicos

[14] que eliminan al parásito. Mientras que la captación de neutrófilos apoptóticos, por células fagocíticas, provoca la secreción de citocinas antiinflamatorias, como IL-10 y TGF- $\beta$ , que generan un ambiente idóneo para la supervivencia de *Leishmania* al inhibir algunos mecanismos microbicidas, en las células infectadas, y la activación de la respuesta inmune celular [16, 18].

### 1.3.2. Respuesta inmune adaptativa

La RIA, caracterizada por la presencia de células B y T, es crucial en la determinación del curso de la infección por *Leishmania* y las manifestaciones clínicas de la enfermedad [15], aunque su papel protector depende del estado inmune del hospedero y de la cepa o especie del parásito [16]. La infección de células fagocíticas, la presentación antigénica y el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), promueven el desarrollo de la RIA y la producción de citocinas [14, 15].

Los PAMPs, como LPG, son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) [14], de los cuales los TLRs son de los más estudiados durante la infección, debido a que están involucrados en la coordinación de la respuesta inmune contra el parásito [15]. El TLR-2 juega un papel protector al reconocer LPG y mejorar la producción de IL-12, TNF, ROS, NO y la activación de células NK, además de conducir a las células T CD4+ hacia un perfil Th1 necesario para la eliminación del patógeno [15].

En la LC se ha observado que las células T CD4+ son importantes para la protección contra *Leishmania*. De acuerdo con el ambiente de citocinas en el sitio de infección, estas células pueden diferenciarse hacia diferentes subgrupos, pero los más estudiados son los linfocitos cooperadores tipo 1 (Th1) y tipo 2 (Th2), cuyo papel en la evolución de la enfermedad ha sido definido en el modelo murino C57BL/6 y BALB/c, respectivamente, durante la infección por *L. major* [16].

La respuesta Th1, activada por IL-12, es caracterizada por la producción de IFN- $\gamma$  y TNF que inducen la alta producción de ROS y RNS en el macrófago infectado, promoviendo la resistencia contra el parásito (Fig. 1.3). Mientras que la respuesta Th2, activada por IL-4, está caracterizada por la producción de citocinas como IL-4

e IL-13 que inducen el metabolismo de la L-arginasa con producción de poliaminas, lo que favorece la replicación del parásito (Fig. 1.3) [16, 19, 20]. No obstante, en la infección por *L. mexicana* el modelo murino C57BL/6 no resuelve la infección, pero sus lesiones son menos graves que las presentes en el modelo murino BALB/c [21].

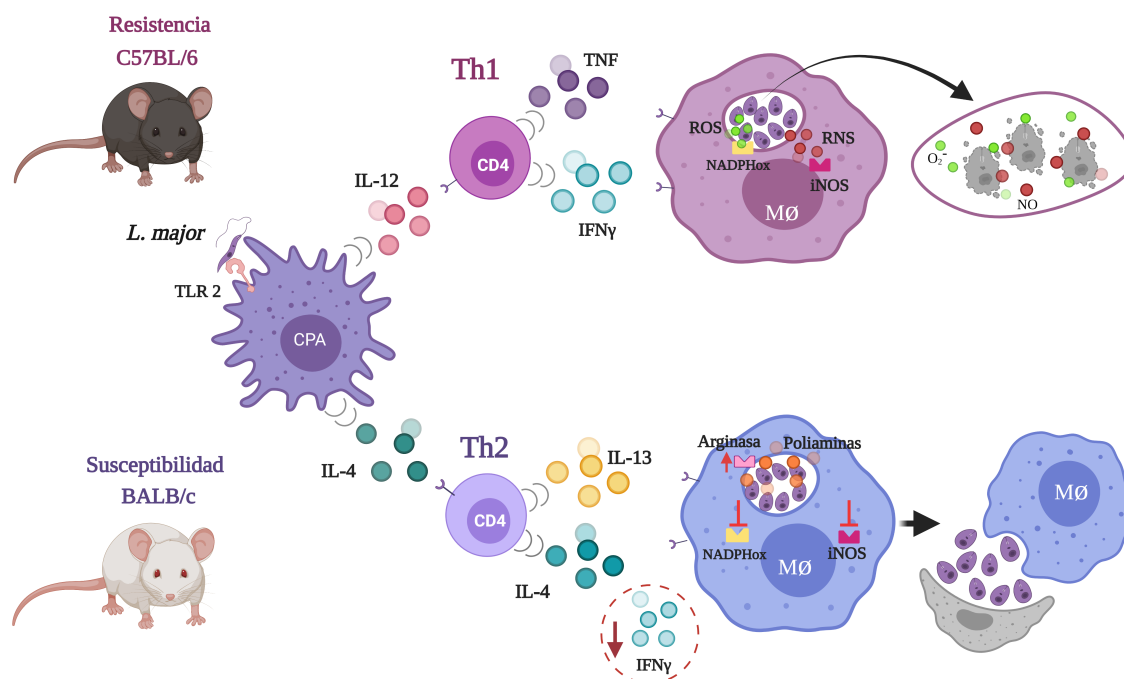


Figura 1.3: **Dicotomía de la respuesta Th1 y Th2 en la infección por *L. major* en el modelo murino.** El reconocimiento de LPG por TLR-2 estimula la producción de citocinas y la diferenciación de células T CD4+. De manera que, la producción de IL-12 por la célula infectada conduce a la diferenciación celular de linfocitos T CD4+ tipo Th1, respuesta característica del modelo murino C57BL/6 durante la infección por *L. major*, en donde se promueve la producción de IFN- $\gamma$  y TNF, que conducen a la producción de ROS mediante la NOX2 y RNS a través de la iNOS para eliminar al parásito. Mientras que la producción de IL-4 conduce a la diferenciación de células T CD4+ tipo Th2, característica del modelo murino BALB/c, misma que induce la secreción de poliaminas a través de la L-arginasa, lo que disminuye los niveles de IFN- $\gamma$  y favorece la replicación del parásito. [16, 19, 20]. Elaboración propia.

La actividad de los linfocitos T CD8+, o citotóxicos, es mediada por la producción de moléculas citolíticas como perforinas y granzimas que activan la muerte celular por apoptosis en los macrófagos infectados, además son una fuente de producción de IFN- $\gamma$  y TNF; sin embargo, el papel de estas células en el curso de la infección es controversial [16], ya que se ha reportado en algunos modelos que la toxicidad mata

a la célula infectada liberando al parásito sin inducir su muerte lo que conduce a una inflamación severa [18], además se han observado células T CD8<sup>+</sup> productoras de citocinas reguladoras [22].

El papel protector de las células T CD8<sup>+</sup> se ha observado en pacientes con LCL infectados con *L. mexicana*, en donde las células CD8<sup>+</sup> eliminan a la célula infectada a través de la actividad citolítica y la activación de mecanismos leishmanicidas mediados por la producción de IFN- $\gamma$  [23]. Contrariamente, en pacientes con LCL infectados con *L. guyanensis* se ha observado que las células T CD8<sup>+</sup> producen IL-10 que inhibe la producción de RNS y con ello la eliminación del parásito [22]. Aún queda mucho por estudiar, pues la exacerbación de su papel citotóxico podría ocasionar problemas severos en la piel [24].

De la misma manera, existe un papel controversial de las células B en la leishmaniasis. Durante el curso de la infección por *L. amazonensis* en ratones deficientes de células B, se observó una reducción en la producción de IFN- $\gamma$  e IL-10, disminución de necrosis tisular, menor tamaño de las lesiones y un inicio tardío del desarrollo de la enfermedad [25]. Mientras que otros estudios afirman que la gravedad de la enfermedad se debe al papel de las células B como reguladoras y a su producción de IL-10 [26]; sin embargo, también se ha observado que la ausencia de células B conduce a una disminución del reclutamiento y activación de células T CD4<sup>+</sup> necesarias para la eliminación del parásito [25]. Por lo que es claro que se necesita seguir investigando el papel de estas células en la enfermedad.

## 1.4. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *Leishmania*

La evasión del sistema inmune, como la regulación de los mecanismos microbicidas o la modulación de la producción de citocinas [13], se debe principalmente a la interacción de los componentes del sistema inmune con los factores de virulencia presentes en la superficie del parásito, como LPG y GP63, los cuales son expresados

y modificados a lo largo del ciclo de vida [27].

Al entrar al hospedero, los parásitos necesitan escapar de la actividad citolítica del sistema de complemento, por lo que LPG interfiere con la cascada de activación y con la inserción del MAC al fosforilar los componentes C3, C5 y C9 [2, 28]. Simultáneamente, GP63 transforma la proteína C3b del complemento a su forma inactiva iC3b, que evita la formación del MAC, pero permite que el parásito sea opsonizado mediante los receptores del complemento 1 (CR1) y 3 (CR3), que a su vez evita la activación de la producción de ROS y RNS dentro del fagocito [27].

En el fagocito, el parásito es capaz de escapar del ambiente ácido y la acción microbicida de RNS y ROS gracias a la actividad de LPG y GP63 [2]. LPG inhibe la fusión del fagosoma con los lisosomas y endosomas [27, 15], mientras que GP63 inhibe la expresión de iNOs; inactiva los factores de transcripción proinflamatorios Ap-1 y NF- $\kappa$ B y promueve la escisión de los receptores de proteínas solubles de fijación a membrana (SNARE), que inhiben la fusión o translocación de vesículas, por lo que el complejo NADPH oxidasa no es capaz de ensamblarse. Además, con la escisión de las proteínas SNARE, las moléculas de MHC-II no pueden trasladarse a la membrana del fagocito por lo que la presentación antigénica y la activación de células T se ven interrumpidas [27, 2].

Otro mecanismo de evasión del sistema inmune se lleva a cabo a través de la secreción de exosomas que son liberados por los macrófagos infectados. En la infección por *L. mexicana*, estas vesículas contienen factores de virulencia del parásito como GP63 y la proteína fosfatasa 2C (PP2C) [29, 30]. Soto-Serna *et al.* (2020), observaron que en macrófagos infectados con *L. mexicana* y estimulados con exosomas, provenientes de amastigotes de cultivo axénico, hay una reducción en la expresión de MHC-I, disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86 y una reducción de la producción de NO, lo que favorece la supervivencia del parásito en su célula hospedera [29].

La supervivencia de *Leishmania* también requiere de minerales y aminoácidos. Se sabe que el protozooario puede sintetizar algunos aminoácidos *de novo*, pero es auxótrofo para muchos otros como el L-triptófano (Trp) [31], lo cual sugiere que la



restricción del aminoácido podría contribuir con la eliminación del patógeno. Además, el Trp puede regular negativamente la respuesta inmune a través de la generación de metabolitos inmunosupresores, de manera que se ha visto que *Leishmania* se ve beneficiada por esta actividad inmunosupresora para persistir en su hospedero [32].

## 1.5. Metabolismo del L-triptófano

### 1.5.1. Metabolismo del L-triptófano en *Leishmania*

*Leishmania* es capaz de oxidar diversos sustratos, como aminoácidos y ácidos grasos, durante todo su ciclo de vida. En el intestino del díptero, el parásito obtiene sus nutrientes esencialmente de proteínas y aminoácidos que provienen de la sangre [33]. Además, se sabe que para compensar la escasez de energía y nutrientes, los parásitos poseen vías catabólicas que les permiten utilizar aminoácidos como combustible [34, 33].

El catabolismo de aminoácidos es crucial en los tripanosomátidos y tiene lugar en dos pasos: el paso inicial implica una reacción reversible conocida como transaminación, en la cual se transfiere el grupo amino de un aminoácido aromático a un cetoácido, este último al adquirir el grupo amino se convierte en su respectivo aminoácido. En el segundo paso, el aminoácido desaminado es reducido por la enzima deshidrogenasa y finalmente es excretado [34]. Las enzimas implicadas en el intercambio y eliminación del nitrógeno amínico son las aminotransferasas y han sido reportadas en amastigotes y promastigotes de *L. mexicana* [33]. El Trp es un aminoácido, aromático (Fig. 1.4), esencial para el crecimiento de promastigotes de *Leishmania* que sirve como fuente de energía de carbono [33]. La tirosina aminotransferasa (TAT), la aminotransferasa de amplia especificidad y la L-2-hidroxiácido deshidrogenasa aromática, son algunas de las enzimas que utilizan al Trp como sustrato para producir lactatos aromáticos en *L. mexicana* [34, 35, 36]. Conforme a lo documentado, la TAT, es una proteína que juega un papel crucial en la supervivencia y patogenicidad de *L. donovani*, además, también es capaz de transaminar a 2-ceto-3-metil-valerato para producir el aminoá-

cido valina, el cual se ha visto que es requerido para la supervivencia de *L. tarentolae* en el ciclo dimórfico [34].

### 1.5.2. Metabolismo del L-triptófano en mamíferos

El Trp (Fig. 1.4), uno de los nueve aminoácidos esenciales en mamíferos, es precursor de la síntesis de serotonina, quinureninas, triptamina y proteínas [37]. Una pequeña fracción de ~5-10 %, es usada en la síntesis de proteínas y la producción de neurotransmisores, mientras que el ~95 % de Trp libre es sustrato en la vía de las quinureninas (Fig. 1.5) (KP) [38].

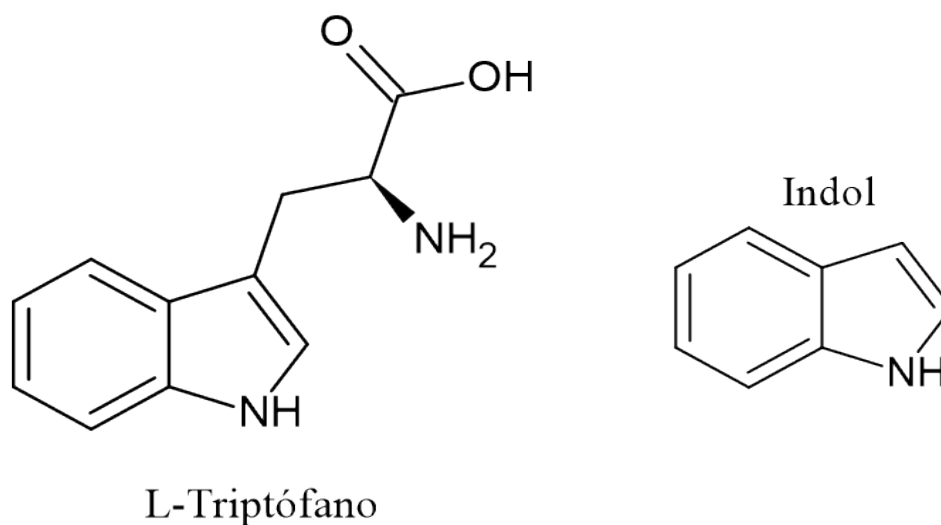


Figura 1.4: Estructura química del L-Triptófano y su anillo indol

La KP existe principalmente en el hígado, donde se degrada un 90 % de Trp en condiciones fisiológicas regulares por la enzima triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), mientras que el 10 % restante se degrada vía extrahepática por la actividad de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) [39], expresada en células del sistema inmune, como células presentadoras de antígeno, principalmente en macrófagos y dendríticas [39, 40].

### 1.5.3. Vía de las quinureninas

El metabolismo del Trp inicia con la oxidación del anillo indol (Véase en Fig. 1.4) mediado por IDO. En este primer paso se requiere de la reducción del grupo hemo co-

mo ión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) hacia ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) para facilitar la unión de su sustrato Trp y el cosustrato  $\text{O}_2$  al sitio activo de la enzima y producir N-formilquinurenina (NFK) [39, 41]. Posteriormente, con ayuda de la enzima NFK formamidasa se transforma a L-quinurenina (L-Kyn) (Fig. 1.5) [39, 42].

La L-Kyn puede dar paso a otras quinureninas mediante la acción de tres importantes enzimas como kinureninasa A (KYNU-A), que genera ácido antranílico (AA); quinurenina aminotransferasa (KAT), que produce ácido quinurénico (KA), un metabolito con actividad inmunomoduladora y neuroprotectora [39, 43]; y quinurenina 3-monoxigenasa (KMO) que genera un metabolito supresor del sistema inmune y generador de radicales libres: 3-hidroxiquinurenina (3-HK) (Fig. 1.5) [42, 44, 45].

La 3-HK es metabolizada por la kinureninasa B (KYNU-B) y genera ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAA), otro productor de radicales libres e inmunosupresor [42, 44, 45]. 3-HAA es metabolizado a partir de 3-hidroxi-antranílico 3,4-dioxigenasa (3-HAAO) a 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdehído (ACMS), que posteriormente, por una reacción no enzimática, produce el compuesto inmunosupresor y neurotóxico ácido quinolínico (QA) precursor de  $\text{NAD}^+$  [42, 46]. ACMS a través de 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdehído descarboxilasa (ACMSD) produce 2-aminomuconato-6-semialdehído (AMS) que produce ácido picolínico (PA) (Fig. 1.5), un agente con propiedades antimicrobianas debido a que mejora las funciones microbicidas del macrófago [42, 47].

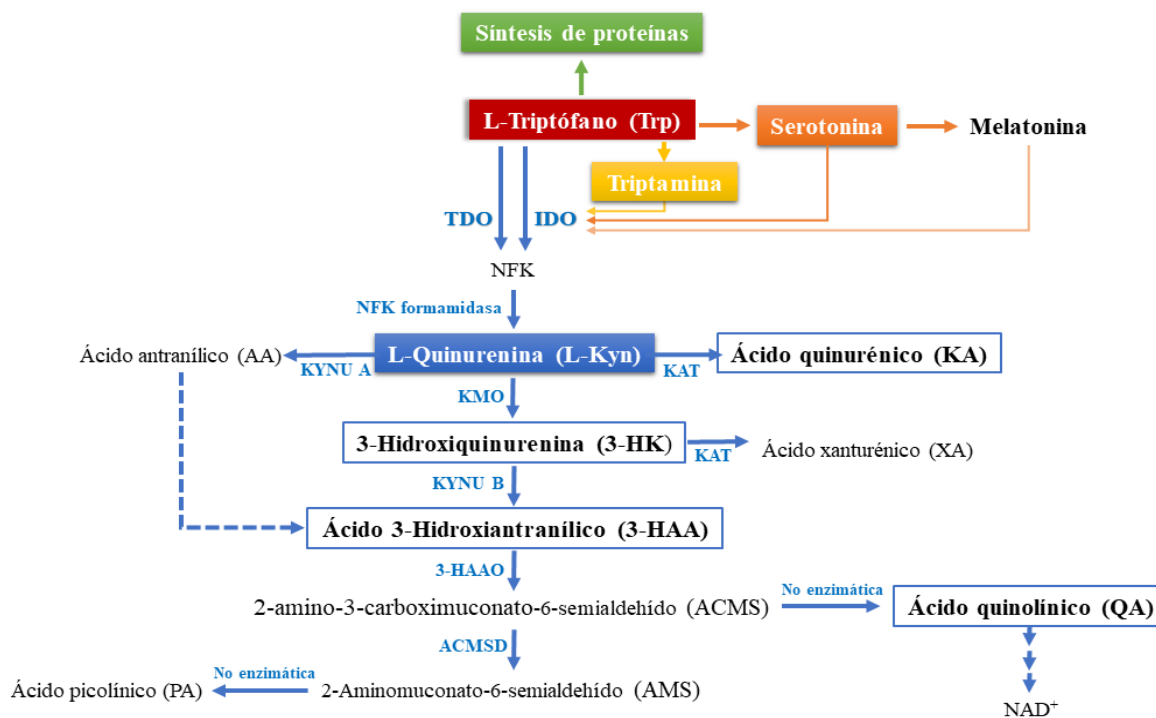


Figura 1.5: **Metabolismo del L-triptófano mediante la vía de las quinurenas.** El Trp es esencial para la biosíntesis de proteínas y precursor de serotonina, melatonina, triptamina y quinurenas. La vía de las quinurenas se inicia con la enzima TDO e IDO, mientras la TDO muestra una alta especificidad por el L-Trp, la IDO es capaz de degradar el anillo indol de varios sustratos como L-Trp, serotonina, triptamina y melatonina, lo cual produce compuestos como L-Kyn, KA, 3-HK, 3-HAA, QA, que en conjunto se conocen como quinurenas [39, 43]. Elaboración propia.

## 1.6. Expresión de IDO

El gen de IDO (*ido1*) pertenece a un grupo de genes estimulados por interferón (ISGs), que posee sitios de unión a factores de transcripción: las secuencias activadas gamma (GAS) y dos secuencias conocidas como elementos reguladores estimulados por interferón (ISRE) [48]. La expresión de IDO es inducida principalmente por IFN- $\gamma$  a través de la vía JAK/STAT1 $\alpha$  y los factores reguladores de interferón 1 y 8 [49, 50].

Se han descrito otros mecanismos de inducción de la expresión de IDO como la activación de la vía de NF- $\kappa\beta$  por LPS [51, 52]; la activación del factor de transcripción receptor de hidrocarburo de Arilo (AhR) por Kyn [53]; la unión de moléculas de la familia B7 con CTLA-4 [54]; la interacción de PD1 con PDL-1 [55]; y la unión de CD28 con moléculas de la familia B7 [56].

Ante una infección intracelular, las células del sistema inmune se activan y liberan una gran cantidad de componentes inflamatorios como IFN- $\gamma$ , TNF e IL-1 para la activación de mecanismos microbicidas [57]. En los últimos años, diversos estudios han confirmado que los patógenos intracelulares se ven beneficiados de esta respuesta inflamatoria para evadir estos mecanismos a través de la inducción de la expresión de IDO [32]. De acuerdo con la literatura, algunas especies de *Leishmania* podrían inducir la expresión de la enzima a través de distintas vías, por ejemplo, durante la infección con *Leishmania* se induce la interacción de CTLA-4 con B7 [58]. Asimismo, durante la infección por *L. major* en células dendríticas humanas se activan los factores de transcripción IFR-1, IFR-8 y STAT1 $\alpha$  [59]. También, se ha observado que el protozoo estimula la producción de TNF en macrófagos infectados y esta citocina es capaz de inducir la expresión de IDO a través de la vía no canónica de NF- $\kappa\beta$  [60, 61].

## 1.7. Las quinureninas y su interacción con el sistema inmune

LaIDO puede inducir la supresión de los linfocitos T por distintos mecanismos, uno de ellos es a través del agotamiento del Trp, el cual es necesario para el crecimiento celular y su ausencia puede inducir muerte celular por autofagia o apoptosis (Fig. 1.6) [62]. Las células T requieren de ciclos celulares sucesivos para adquirir sus funciones efectoras [63], se ha comprobado que en los linfocitos T activados la deficiencia de Trp induce el arresto del ciclo celular en la transición de la fase G1/S [64], dicho arresto puede revertirse si se reestablece la disponibilidad del aminoácido (Fig. 1.6) [65].

La ausencia de Trp induce la activación de la enzima cinasa de control general no represiva 2 (GCN2), una proteína que funciona como sensor de nutrientes [62]. Esta enzima desencadena una respuesta de estrés integrada (ISR), donde moléculas de tRNA sin carga de Trp se acumulan y se unen al dominio His-RS de GCN2, desencadenando la inhibición del factor de iniciación de la traducción eucariota (eIF2 $\alpha$ ) mediante su fosforilación, lo cual conduce a la reducción de la traducción del mRNA y la síntesis de proteínas, comprometiendo el ciclo celular y finalmente induciendo apoptosis o autofagia [62, 66]. Adicionalmente se ha reportado que la activación de GCN2 induce la producción de TGF- $\beta$  e IL-10, sugiriendo su participación en la inducción de células T reguladoras (Tregs) (Fig. 1.6) [67].

Las Kyn 3-HAA, KA y L-Kyn son agonistas del AhR [68], un factor de transcripción citoplasmático que promueve la secreción de más Kyn y TGF- $\beta$  en células dendríticas [69, 53, 70]. En linfocitos T se ha reportado que las Kyn ingresan al citoplasma a través del transportador de aminoácidos SLC7A5 (LAT1) [71, 70] en donde activan al AhR, induciendo la diferenciación de los linfocitos T naïve hacia células Tregs (Fig. 1.6) [53].

Las Kyn además de inducir el cambio fenotípico hacia Tregs, también pueden ejercer otros efectos supresores sobre el sistema inmune. Se sabe que QA junto con 3-HAA inducen apoptosis en las células T del Timo y selectivamente en las células

Th1, mediante la activación de la caspasa 8 y la liberación del citocromo c por la mitocondria (Fig. 1.6), sugiriendo que las Kyn QA y 3-HAA cambian el equilibrio Th1/Th2 a favor de Th2 [44].

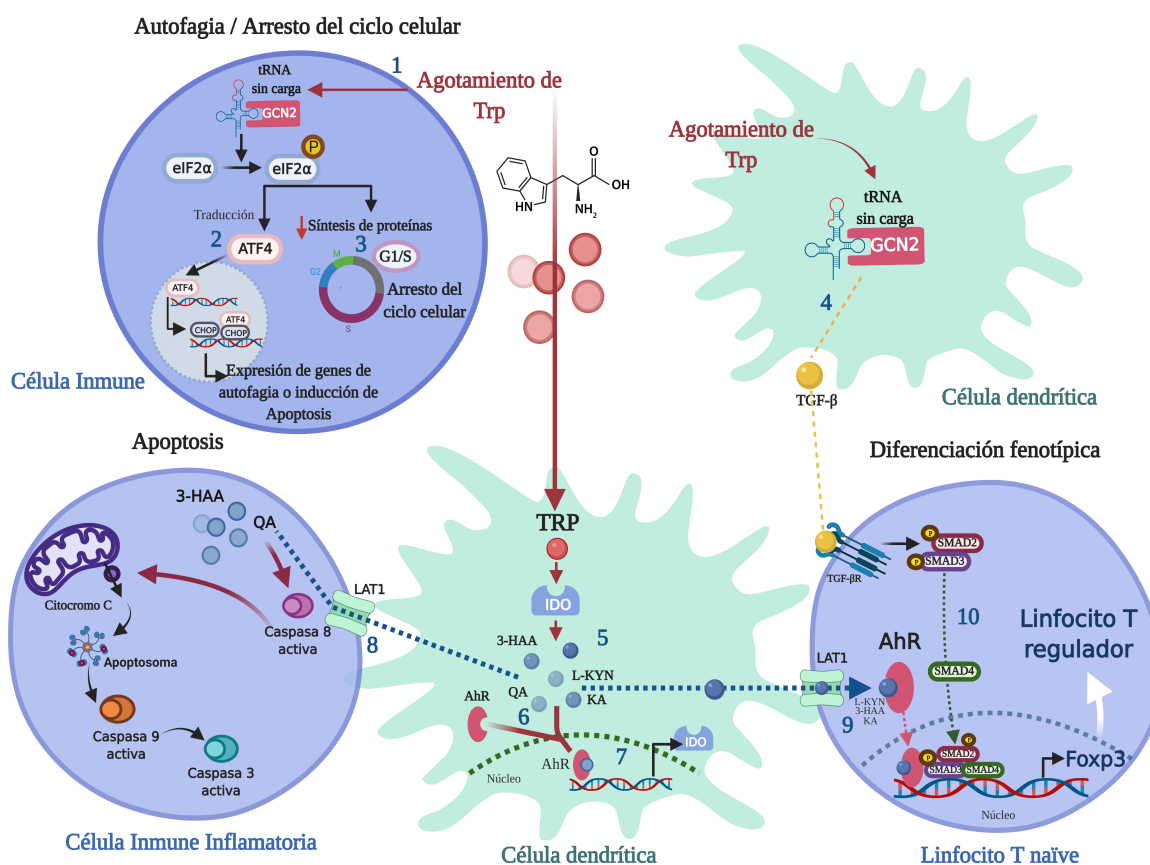


Figura 1.6: **Mecanismos reguladores del agotamiento del L-Trp sobre las células inmunes.** El catabolismo de Trp por IDO conduce al agotamiento del aminoácido, **1)** este agotamiento activa el sensor GCN2, desencadenando una ISR, lo cual provoca la fosforilación de eIF2- $\alpha$  y **2)** la traducción del factor de transcripción ATF4, que a su vez induce la transcripción del gen del factor de transcripción CHOP. CHOP y el heterodímero CHOP/ATF4 inducen la expresión de genes relacionados con la autofagia y apoptosis [72, 73]. **3)** Otro efecto de la ISR es la reducción de la traducción del mRNA y la síntesis de proteínas, lo que conduce al arresto del ciclo celular en la transición de la fase G1/S [64]. **4)** La activación de GCN2 también incrementa la producción de TGF- $\beta$  [67]. **5)** Producción de Kyn a través del catabolismo del L-Trp mediante IDO. **6)** Las Kn se unen a AhR induciendo su translocación nuclear. **7)** AhR induce la expresión del gen de IDO. **8)** Las Kyn como 3-HAA y QA ingresan al citoplasma celular a través de LAT1 [71], induciendo la activación de caspasa 8 relacionada con la liberación del citocromo C. Esto facilita el ensamblaje del apoptosoma y la activación de las caspasas 9 y 3 [44, 74]. **9)** Las Kyn ingresan a las células T naíve para unirse a AhR y junto con TGF- $\beta$  inducen la diferenciación de células Tregs por la transcripción de Foxp3. [75]. **10)** TGF- $\beta$  induce la fosforilación de SMAD2 y SMAD3 que forman un complejo trimérico con SMAD4, el cual se transloca al núcleo para inducir la expresión de Foxp3 [76, 77]. Elaboración propia.



## 1.8. 1-Metiltriptófano: un inhibidor competitivo de IDO

El 1-Metil-triptófano (1-MT), análogo del Trp, es un inhibidor competitivo de IDO [78] de baja toxicidad, buena absorción intestinal y baja unión a las proteínas plasmáticas [79]. Este inhibidor ha sido probado como tratamiento contra infecciones por protozoarios como *L. major* [32], *Plasmodium* [80] y *Toxoplasma gondii* [81]. Existen dos estereoisómeros de 1-MT: 1-Metil-L-triptófano (L-1-MT) y 1-Metil-D-Triptófano (D-1-MT) (Fig. 1.7), ambos estudiados de manera independiente o en conjunto en ensayos *in vivo* e *in vitro* [79], aunque algunos estudios afirman que el estereoisómero L-1-MT es capaz de inhibir la actividad de IDO con mayor eficiencia que D-1-MT [82].

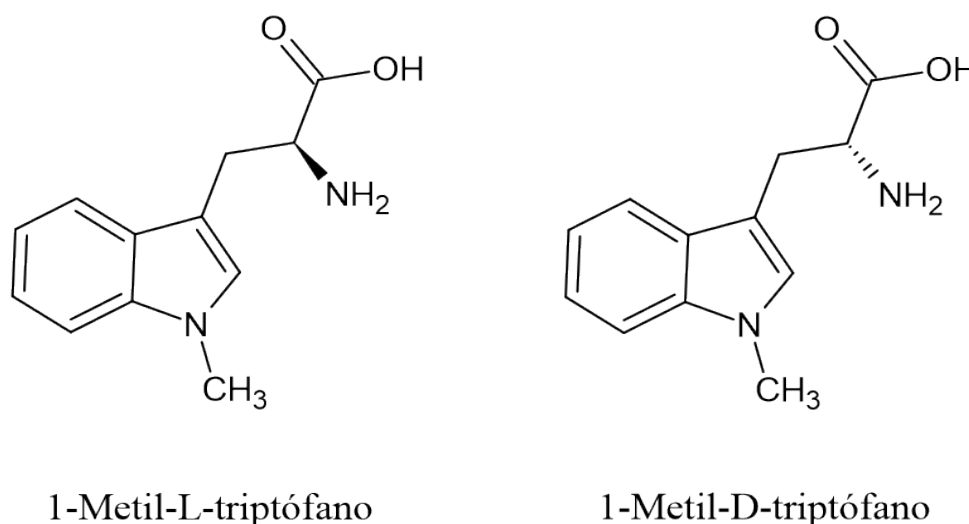


Figura 1.7: Estructura química de los estereoisómeros del 1-Metil-triptófano

Divanovic *et al.* (2012) demostraron que ambos estereoisómeros, D-1-MT y L-1-MT, son capaces de disminuir el tamaño de las lesiones generadas por la infección de *L. major* en ratones C57BL/6 [83]. Otros estudios mostraron que durante la infección con *L. major* en ratones IDO-KO o tratados con D-1-MT, hay una reducción de la inflamación local de las lesiones de los ratones, una disminución del 60% de la carga parasitaria y de la producción de IL-10. Sin embargo, no se observó un aumento en

la producción de IFN- $\gamma$ , necesario para resolver la infección [32].

En contraste con lo anterior, en otros tripanosomátidos, como *Trypanosoma cruzi*, se observó que la administración de D-1-MT aumentaba significativamente la replicación de parásitos intracelulares y disminuía significativamente la producción de IL-12 y TNF. Sin embargo, cuando el inhibidor D-1-MT se administraba junto con la quinurenina 3-HK, un importante generador de radicales libres altamente tóxicos para *T. cruzi*, la replicación parasitaria reducía significativamente y se restablecía la producción de IL-12 [84].

Adicionalmente, se ha registrado que el tratamiento con L-1-MT inhibe la captación de Trp a través de la inhibición de un transportador altamente específico, que capta al aminoácido en concentraciones nanomolares y es inducido por IFN- $\gamma$  y la interacción de Kyn con AhR [85, 86]. Lo anterior indicaría que la administración de L-1-MT, además de inhibir la actividad deIDO, también estaría limitando la disponibilidad de Trp para el parásito.

# Justificación

---

Los antecedentes indican que *Leishmania* requiere del Trp para sobrevivir y crecer en su hospedero al mismo tiempo que el parásito induce la expresión deIDO en su célula hospedera estimulando su actividad inmunosupresora [32, 58]. Del mismo modo, se ha demostrado que el L-1-MT es un fármaco potencial para el tratamiento de la leishmaniasis en la infección con *L. major* [32]. Sin embargo, no hay registros en la literatura sobre el efecto que pueda presentar la administración de Trp y de L-1-MT en la infección con *L. mexicana*, principal agente causal de la leishmaniasis cutánea en México. Por tanto, en este trabajo se propone analizar el efecto de la suplementación con Trp en el desarrollo de la infección por *L. mexicana* y llevar a cabo la inhibición del metabolismo del Trp con L-1-MT con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas.

# Hipótesis

---

La suplementación con L-triptófano exacerba la infección por *Leishmania mexicana* disminuyendo la producción de citocinas inflamatorias TNF e IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c infectados. Asimismo, el tratamiento con 1-metil-L-Triptófano aumenta la producción de TNF e IFN- $\gamma$ , disminuyendo la carga parasitaria.

# Objetivos

---

### 4.1. Objetivo general

Analizar el efecto de la suplementación con L-triptófano en el desarrollo de la infección por *Leishmania mexicana* y si la inhibición de su catabolismo contribuye a la resolución de la enfermedad.

#### 4.1.1. Objetivos particulares

1. Analizar la sobrevivencia de *L. mexicana* en macrófagos infectados suplementados con distintas concentraciones de L-triptófano *in vitro*.
2. Analizar el desarrollo de las lesiones y la carga parasitaria de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* suplementados con L-triptófano.
3. Analizar el desarrollo de las lesiones y la carga parasitaria de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* tratados con L-1-MT y Trp.
4. Analizar la producción de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias: IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10, producidas por células del ganglio linfático de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* tratados con L-1-MT, Trp y Trp+L-1-MT.

---

# Animales de experimentación

---

Se trabajó con hembras *Mus musculus* de la cepa BALB/c de 8-10 semanas, proporcionados por el bioterio de la Unidad de Investigación de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM. Fueron manejados siguiendo los lineamientos establecidos para los animales de laboratorio de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999 y bajo la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la UNAM, con número de registro 063-2020/022-CIC-2020.

# Materiales y métodos

---

### Aislamiento de *Leishmania mexicana*

Se utilizaron parásitos de *L. mexicana* de la cepa MHOM/MX/2011 Lacandona, aislados de una paciente mexicana diagnosticada con LCL, luego de que viajó a la selva Lacandona en Chiapas. La paciente presentaba una úlcera en la piel, de la cual se aislaron amastigotes que, posteriormente, se mantuvieron en la almohadilla plantar de ratones BALB/c. Para el aislamiento de los parásitos, los ratones fueron anestesiados por la inhalación con Isoflurano (Sofloran <sup>®</sup>) y eutanasiados por dislocación cervical. Luego, los amastigotes fueron aspirados con jeringa de insulina de calibre 31 G con PBS y antibiótico al 1 %, 100 U/mL de penicilina G y 100 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

La virulencia del patógeno se mantuvo inoculando de  $5 - 10 \times 10^5$  amastigotes en la almohadilla plantar de ratones BALB/c. Luego, los parásitos fueron aislados de las lesiones y se mantuvieron en botellas de  $25 \text{ cm}^2$ , a  $33^\circ\text{C}$ , con 10 mL de medio Grace's Insect (Sigma-Aldrich). El medio Grace's Insect fue suplementado al 20 % de SFB (GIBCO by Life Technologies) inactivado por calor, a  $56^\circ\text{C}$ , por 30 minutos; con antibiótico al 1 %, 100 U/mL penicilina G y 100 mg/mL estreptomicina; 2 mM L-glutamina y 0.35 g/L de bicarbonato de sodio. El medio fue ajustado a pH 5.5. Para mantener el cultivo de parásitos, se transfirieron  $5 \times 10^5$  amastigotes a botellas de 25

$cm^2$  con medio de cultivo fresco cada 3-4 días (pase de parásitos) durante la fase logarítmica del crecimiento, con un máximo de cinco pases por aislado. Posteriormente, los amastigotes se inocularon nuevamente en la almohadilla plantar de ratones.

### **Cultivo axénico de promastigotes de *L. mexicana***

Los amastigotes, provenientes del aspirado de la almohadilla plantar de ratones BALB/c, fueron cultivados y diferenciados a promastigotes, a 26°C, en botellas de 25  $cm^2$  con 10 mL de medio M199 (GIBCO by Life Technologies, Inc. Grand Island, NY). El medio M199 fue suplementado al 10 % de SFB inactivado por calor con antibiótico al 1 %, 100 U/mL de penicilina G y 100 mg/mL de estreptomina, y fue ajustado a pH 7.4. Los promastigotes metacíclicos fueron cosechados en la fase estacionaria de su crecimiento (día 5) [87].

### **Diferenciación de macrófagos murinos de médula ósea**

Los macrófagos fueron diferenciados a partir de células de médula ósea de ratones BALB/c. Los ratones fueron anestesiados por la inhalación de Isoflurano, eutanasiados por dislocación cervical y se bañaron en etanol al 70 % para desinfectarlos. Con ayuda de material de disección estéril, se retiró la piel y el músculo de las extremidades posteriores (fémur y tibia), posteriormente, se retiró el resto de tejido utilizando gasas estériles, cuidando de no fisurar ninguno de los huesos. El fémur y la tibia se colocaron en etanol al 70 % durante 3 minutos para su desinfección, luego, se colocaron en PBS con antibiótico al 2 %, 100 U/mL de penicilina G y 100 mg/mL de estreptomina. En campana de flujo laminar, se cortó la epífisis de cada hueso, después, con jeringa de 10 mL, aguja de calibre 25 G, se inyectaron de 3-5 mL de PBS para coleccionar la médula ósea en tubos cónicos estériles de 15 mL. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos, a 20°C, y se resuspendieron en medio RPMI-1640 (GIBCO by Life Technologies). Las células se contaron con cámara de Neubauer y se utilizó azul de tripán para excluir las células muertas (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

Para la diferenciación a macrófagos, se sembraron  $2 \times 10^6$  de células de médula ósea



en cajas de Petri bacteriológicas de 100 mm (Corning, Life Sciences, NY, USA) con 10 mL de medio RPMI-1640 durante 7 días, a 37°C, con 5 % de  $CO_2$ . El medio RPMI-1640 fue suplementado con SFB inactivado por calor al 20 %; factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) de la línea celular L929 al 20 % y contenía antibiótico al 1 %, 100 U/mL de penicilina G y 100 mg/mL de estreptomina [88]. Luego, se retiró el medio de cultivo y los macrófagos adherentes fueron desprendidos, mediante la acción mecánica del pipeteo, con PBS frío y se colectaron en un tubo cónico de 15 mL, el cual se mantuvo en una cama de hielo. Después, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos a 4°C y se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con SFB inactivado por calor al 10 %.

### **Ensayo de sobrevivencia de *L. mexicana* en macrófagos murinos infectados y suplementados con distintas concentraciones de Trp *in vitro***

En una placa de cultivo celular de 96 pozos (Corning, Life Sciences, NY, USA), se sembraron  $2.5 \times 10^5$  macrófagos murinos, por condición, en medio RPMI-1640 en un volumen final del 200  $\mu$ L y se incubaron a 37°C durante 24 h. El medio fue suplementado al 10 % con SFB inactivado por calor y antibiótico al 1 %, 100 U/mL de penicilina G y 100 mg/mL de estreptomina. Posteriormente, las células se infectaron con promastigotes de *L. mexicana* en un radio de infección 1:10 (célula/parásitos). Para sincronizar la infección, y poner en contacto células con los parásitos, la placa se centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos y se dejó reposar durante 2 h a 26°C. Después, se retiró el sobrenadante; los pozos se lavaron con PBS, con el fin de eliminar los parásitos no fagocitados; se agregó medio RPMI-1640 en un volumen final de 200  $\mu$ L y se dejaron incubando a 37°C con 5 % de  $CO_2$  durante toda la noche. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y las células se estimularon con L-Trp (Sigma-Aldrich) a una concentración de 25 nM, 100 nM, 150 nM, 250 nM, 1  $\mu$ M o 100  $\mu$ M, resuspendido en medio RPMI-1640 en un volumen final de 200  $\mu$ L. Adicionalmente, se consideraron macrófagos sin estímulo de Trp. Las células se incubaron a 37°C con 5 % de  $CO_2$  en presencia de los estímulos durante 24h, se desechó el sobrenadante y se lavaron los pozos con PBS. Luego, se agregó medio M199 suplementado

al 10 % con SFB inactivado por calor y antibiótico al 1 %, 100 U/mL de penicilina G y 100 mg/mL de estreptomycin y se incubaron a 26°C durante 72 h para provocar la liberación de los parásitos. Los parásitos liberados al medio de cultivo fueron fijados con glutaraldehído al 0.1 % y se contaron utilizando cámara de Neubauer.

### **Infección de ratones BALB/c con promastigotes de *L. mexicana***

A partir del cultivo axénico, los parásitos se cosecharon en la fase estacionaria; se centrifugaron a 3500 rpm por 15 minutos; se lavaron dos veces con PBS y se ajustaron a  $1 \times 10^6$  promastigotes por cada 10  $\mu\text{L}$  de PBS mediante conteo en cámara de Neubauer. La infección con *L. mexicana* se llevó a cabo inoculando  $1 \times 10^6$  promastigotes, resuspendidos en 10  $\mu\text{L}$  de PBS, con jeringa de insulina de calibre 31 G en la dermis de la almohadilla plantar de ratones BALB/c, previamente desinfectada con etanol al 70 %. La progresión de la infección fue evaluada a través del aumento del tamaño de almohadilla plantar, la cual se midió de una a dos veces por semana con vernier digital (resolución:  $\pm 0.01$  mm) (Thomas scientific).

### **Suplementación con Trp en el transcurso de la infección por *L. mexicana***

Los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* fueron suplementados con Trp a una concentración de 1.224 mM, 2.448 mM, 4.896 mM, 9.792 mM o 19.585 mM. El Trp fue diluido en agua potable estéril y administrado *ad libitum*, con un cambio de agua cada tercer día desde el inicio de la infección durante 43 días. Adicionalmente, se contempló un grupo control sin tratamiento. Todos los ratones fueron pesados una vez a la semana durante el experimento y se midió el consumo de agua para asegurar que su estado nutricional no resultara afectado por la administración del aminoácido.

### **Administración de L-1-MT, L-Trp y Trp + L-1-MT en el transcurso de la infección *in vivo* por *L. mexicana***

Los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* fueron suplementados con: L-1-MT a una concentración de 2 mg/mL (Sigma-Aldrich); L-Trp a una concentración

de 19.585 mM; o Trp + L-1-MT a una concentración de 19.585 mM y 2 mg/mL, respectivamente.

El inhibidor L-1-MT fue diluido en 10 mL de solución de NAOH al 0.1 N, luego, se ajustó a pH 7.4, como lo indica Murakami *et al.*, (2012) [81], y se aforó a 100 mL con agua potable estéril. El vehículo (Veh) consistió en 10 mL de solución de NAOH al 0.1 N, que se ajustó a pH 7.4 y se aforó a 100 mL con agua potable estéril.

Los tratamientos se administraron *ad libitum* durante 10 días, iniciando en el día 26 de la infección. Adicionalmente, se consideró un grupo que no recibió tratamiento y un grupo que recibió el Veh. Todos los ratones fueron pesados una vez a la semana durante el experimento.

### **Cuantificación de la carga parasitaria en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y tratados con Trp y L-1-MT**

Al finalizar los experimentos de la suplementación con Trp y L-1-MT, los ratones fueron eutanasiados en cámara de  $CO_2$  y se bañaron en etanol al 70 % para su desinfección. Luego, se cortaron las almohadillas infectadas y se colocaron en etanol al 70 % durante 2 minutos, posteriormente, se colocaron en agua estéril desionizada y se dejaron secar. Las almohadillas se colocaron en tubos cónicos de 50 mL con 3 mL de PBS y antibiótico al 2 %, 100 U/mL de penicilina G y 100 mg/mL de estreptomina. Las almohadillas se maceraron con 4 mL de PBS en malla de alambre de poro de 100  $\mu\text{m}$  y émbolos metálicos, siguiendo los métodos propuestos por Lezama-Dávila *et al.* (1992) [89]. Las muestras fueron colectadas en tubos cónicos de 15 mL y posteriormente se aforaron a un volumen final de 8 mL con PBS. Posteriormente, se agregó paraformaldeído al 1 % a todas las muestras y se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min a 10°C, se les retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 10 mL PBS. A las 24 h, los amastigotes obtenidos se disgregaron pasando la muestra por jeringa de insulina siete veces y se realizó un conteo con cámara de Neubauer.

### Cuantificación de citocinas producidas en el tratamiento con L-1-MT, Trp o Trp + L-1MT

Con ayuda de material de disección, y en condiciones de esterilidad, se aisló el ganglio poplíteo más cercano a la infección de los ratones suplementados con L-1-MT, Trp (19.585 mM), Trp + L-1-MT y los controles. Los ganglios se mantuvieron en PBS, en cama de hielo, con antibiótico al 1%, 100 U/mL de penicilina G y 100 mg/mL de estreptomina. Los nódulos se maceraron con 1 mL de PBS en malla de poro de 100  $\mu\text{m}$  y émbolos metálicos estériles. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm por 15 min a 20°C, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo celular RPMI-1640. Después, en una placa de cultivo de 96 pozos se sembraron  $1 \times 10^6$  células por muestra y se estimularon con antígeno total de *L. mexicana* a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para inducir la presentación antigénica a los linfocitos T. El antígeno total de *L. mexicana* fue obtenido mediante tres ciclos de congelación a -70°C y 10 min de sonicación entre cada uno de ellos. Las muestras se incubaron por 7 días a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Luego del tiempo transcurrido, la placa se centrifugó a 3500 rpm por 15 min a 20°C, el sobrenadante se cosechó y se mantuvo en una cama de hielo para la cuantificación de citocinas: IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10, usando el panel LEGENDplex™ MU Th1 / Th2 (8 plex) con FP V03 (BioLegend, USA). Los datos fueron cuantificados por citometría de flujo FACSCanto II (BD, Becton Dickson, San José, CA, USA) y analizados con el software de análisis de datos LEGENDplex™ V8.0 ([www.biolegend.com/legendplex](http://www.biolegend.com/legendplex)) (BioLegend, USA).

### Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney para la comparación de los grupos experimentales contra el grupo control. Todo el análisis estadístico y las figuras se realizaron en el software GraphPad Prism 6 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA), considerando un valor significativo cuando  $p \leq 0.05$ .

# Resultados

---

### **Ensayo de sobrevivencia de *L. mexicana* en macrófagos murinos infectados suplementados con distintas concentraciones de Trp *in vitro***

La suplementación *in vitro* con diferentes concentraciones de Trp a macrófagos infectados con *L. mexicana*, no indujo cambios significativos en la sobrevivencia del parásito, con respecto al grupo sin tratamiento. Sin embargo, se pudo observar una tendencia: una mayor liberación de promastigotes en las condiciones con mayor concentración de Trp (Fig. 7.1). Cabe mencionar que las concentraciones empleadas no presentan un efecto tóxico para las células hospederas (Anexo, Fig. 11.1)

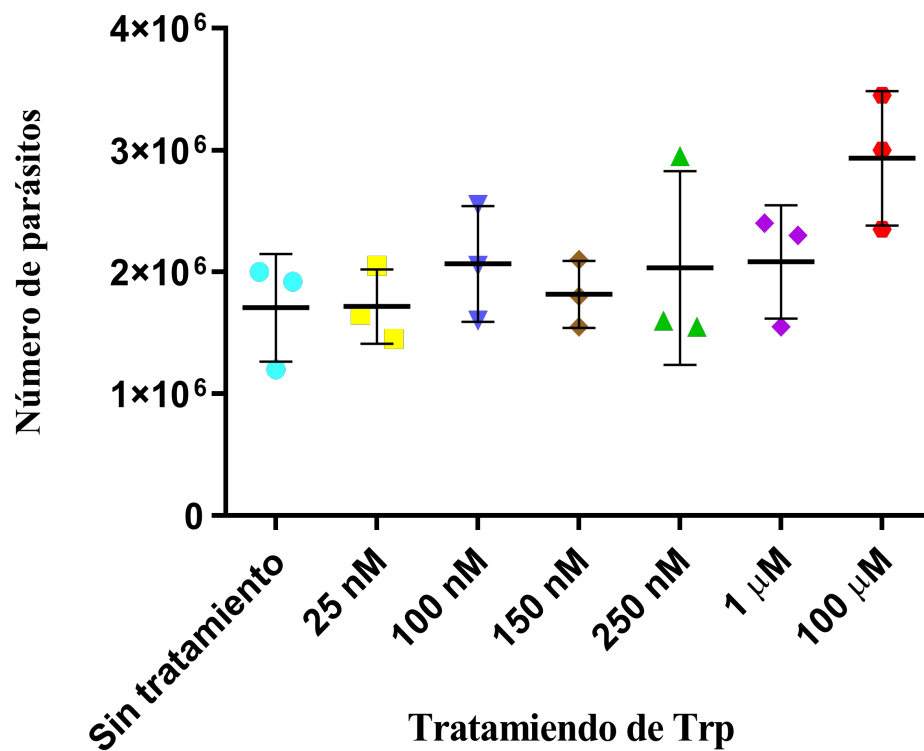


Figura 7.1: Efecto del Trp en la sobrevida de *L. mexicana*. Ensayo de sobrevida del parásito en macrófagos suplementados con diferentes concentraciones de Trp durante 24 h. La línea horizontal representa la media del número de parásitos liberados  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes ( $n=3$ ).

### Efecto de la suplementación con Trp en el transcurso de la infección por *L. mexicana*

La suplementación con triptófano en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* mostró que el aminoácido tiene un papel importante en la exacerbación de la infección. A partir del día nueve del experimento se comenzó a observar un aumento significativo, con respecto al grupo sin tratamiento ( $p \leq 0.05$ ), en el tamaño de la lesión de ratones suplementados con 2.448, 4.896, 9.792 y 19.585 mM de Trp. Al final del experimento, todos los ratones suplementados con Trp presentaron un aumento en el tamaño de la lesión, con respecto al grupo sin tratamiento, en un efecto dosis dependiente. Los ratones suplementados con 9.792 y 19.585 mM de Trp, presentaron las lesiones más exacerbadas con un aumento significativo, con respecto al grupo sin tratamiento ( $p \leq 0.05$ ), del 33.54 y 28.95 %, respectivamente (Fig. 7.2A). Además, estas lesiones se percibieron con mayor enrojecimiento y con principios de ulceración (Imágenes no mostradas).

En cuanto a la carga parasitaria por lesión, la suplementación con 2.448, 4.896, 9.792 y 19.585 mM de Trp presentaron un aumento significativo de parásitos, con respecto al grupo sin tratamiento ( $p \leq 0.05$ ). La suplementación con 2.448 mM de Trp mostró un 111.13 % de aumento significativo de la carga parasitaria, mientras que la dosis más alta de 19.585 mM mostró un aumento significativo del 233.4 %, ambos con respecto al grupo sin tratamiento (Fig. 7.2B).

No se observaron descompensaciones significativas en el peso de los ratones durante la suplementación con Trp, lo que sugiere que el tratamiento no interfiere con el estado nutricional de los animales (Anexo, Fig. 11.2).

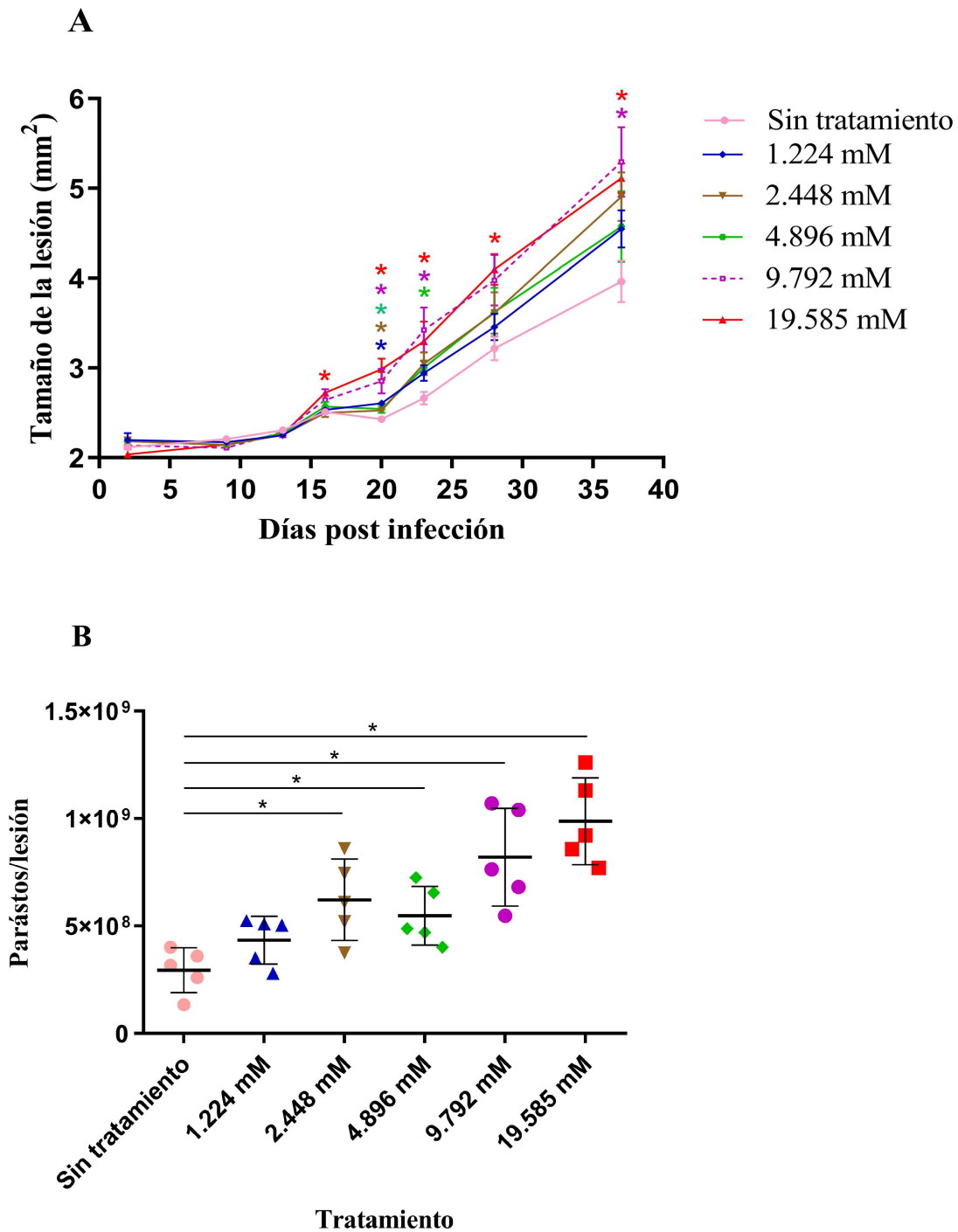


Figura 7.2: Progresión de la infección en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* suplementados con Trp. **A)** Medición del cojinete plantar de ratones infectados con *L. mexicana* suplementados con 1.224 mM, 2.448 mM, 4.896 mM, 9.792 mM o 19.585 mM de Trp por 43 días. Los puntos representan la media del tamaño de la lesión  $\pm$  la desviación estándar de 5 ratones infectados. **B)** Carga parasitaria total por lesión, al final del experimento. La línea horizontal representa la media del número de parásitos por lesión  $\pm$  la desviación estándar de 5 ratones infectados. Los asteriscos representan la diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) de cada condición con respecto al grupo sin tratamiento.



**Efecto de la inhibición del metabolismo del Trp mediante L-1-MT en el transcurso de la infección por *L. mexicana***

El tratamiento con el inhibidor de IDO no mostró un efecto significativo en la infección con *L. mexicana*; sin embargo, tiende a disminuir un 7.65 % del tamaño de la lesión y un 37.94 % de la carga parasitaria, con respecto al grupo sin tratamiento. Adicionalmente se consideró un grupo que fue suplementado con 19.585 mM de Trp. Los resultados mostraron un aumento del 8.93 % en el tamaño de las lesiones y un aumento del 36.71 % de la carga parasitaria por lesión, ambos no significativos con respecto al grupo sin tratamiento (Fig. 7.3).

Por otro lado, para conocer el papel Trp en el restablecimiento de la respuesta inmune en la inhibición de IDO, se consideró administrar Trp + L-1-MT; no obstante, se observó que el tratamiento tiende a exacerbar la infección, pues hubo un aumento no significativo del 8.67 % en el tamaño de la lesión y un 144.8 % de aumento significativo en la carga parasitaria, ambos datos con respecto al grupo sin tratamiento ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 7.3).

No se observaron descompensaciones significativas en el peso de los ratones durante el tratamiento con L-1-MT, Trp o Trp + L-1-MT, lo que sugiere que el tratamiento no interfiere con el estado nutricional de los animales (Anexo, Fig. 11.3).

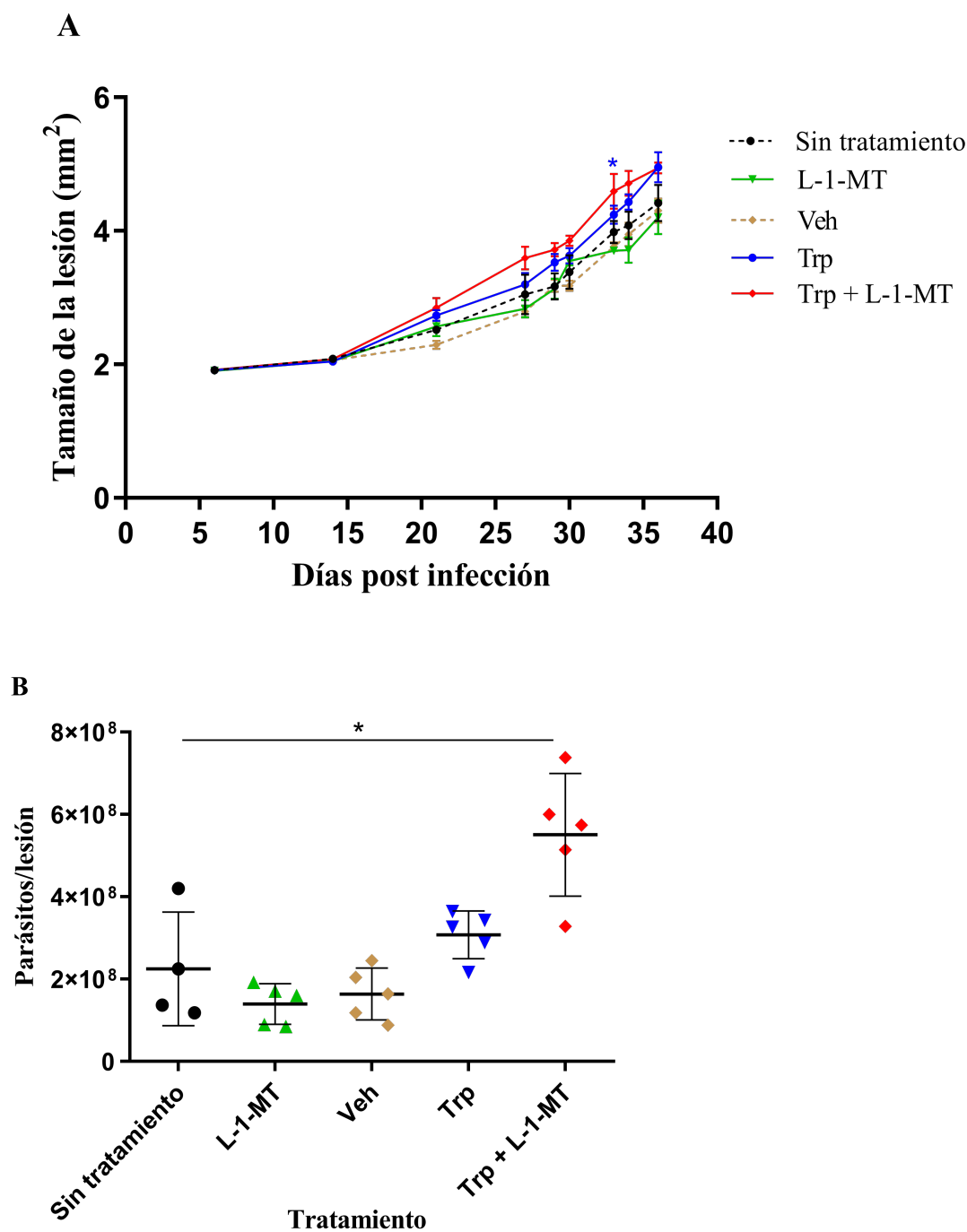


Figura 7.3: Progresión de la infección en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* suplementados con L-1-MT, Trp o Trp + L-1-MT. **A)** Medición del cojinete plantar de ratones infectados con *L. mexicana* suplementados con L-1-MT (2 mg/mL), Trp (19.585 mM) o Trp + L-1-MT (2 mg/mL y 19.585 mM, respectivamente), a partir del día 26 de la infección durante 10 días. Los puntos representan la media del tamaño de la lesión  $\pm$  la desviación estándar de 5 ratones infectados. **B)** Carga parasitaria total en el tejido infectado de ratones BALB/c. La línea horizontal representa la media del número de parásitos por lesión  $\pm$  la desviación estándar de 5 ratones infectados. Los asteriscos representan la diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) de cada condición con respecto al grupo sin tratamiento.

**Citocinas inflamatorias y antiinflamatorias producidas por ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y tratados con L-1-MT, Trp o Trp + L-1-MT**

Para evaluar el efecto de la inhibición de IDO en la producción de citocinas anti y proinflamatorias, se cuantificaron los niveles de citocinas en el nódulo linfático más cercano a la infección: IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10. De acuerdo con los resultados, la inhibición de IDO por L-1-MT no tiene un efecto sobre la producción de citocinas. Asimismo, el grupo suplementado con Trp no mostró diferencias significativas con respecto al grupo sin tratamiento ( $p \leq 0.05$ ). Mientras que el tratamiento con Trp + L-1-MT mejoró significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la producción de IFN- $\gamma$ , 34 veces más; TNF, 4 veces más; IL-2, 6 veces más; IL-4, 5 veces más; IL-5, 12 veces más; e IL-10, 3.5 veces más, todas con respecto al grupo sin tratamiento ( $n=5$ ). Los resultados demuestran que la citocina más predominante en el tratamiento con Trp + L-1-MT fue la IL-10, debido a que se observó la producción más alta de esta citocina (4.22 ng/mL) con respecto a las concentraciones basales presentes en ratones sanos y con respecto al resto de las citocinas cuyas concentraciones estuvieron por debajo de 1.5 ng/mL (Fig. 7.4).

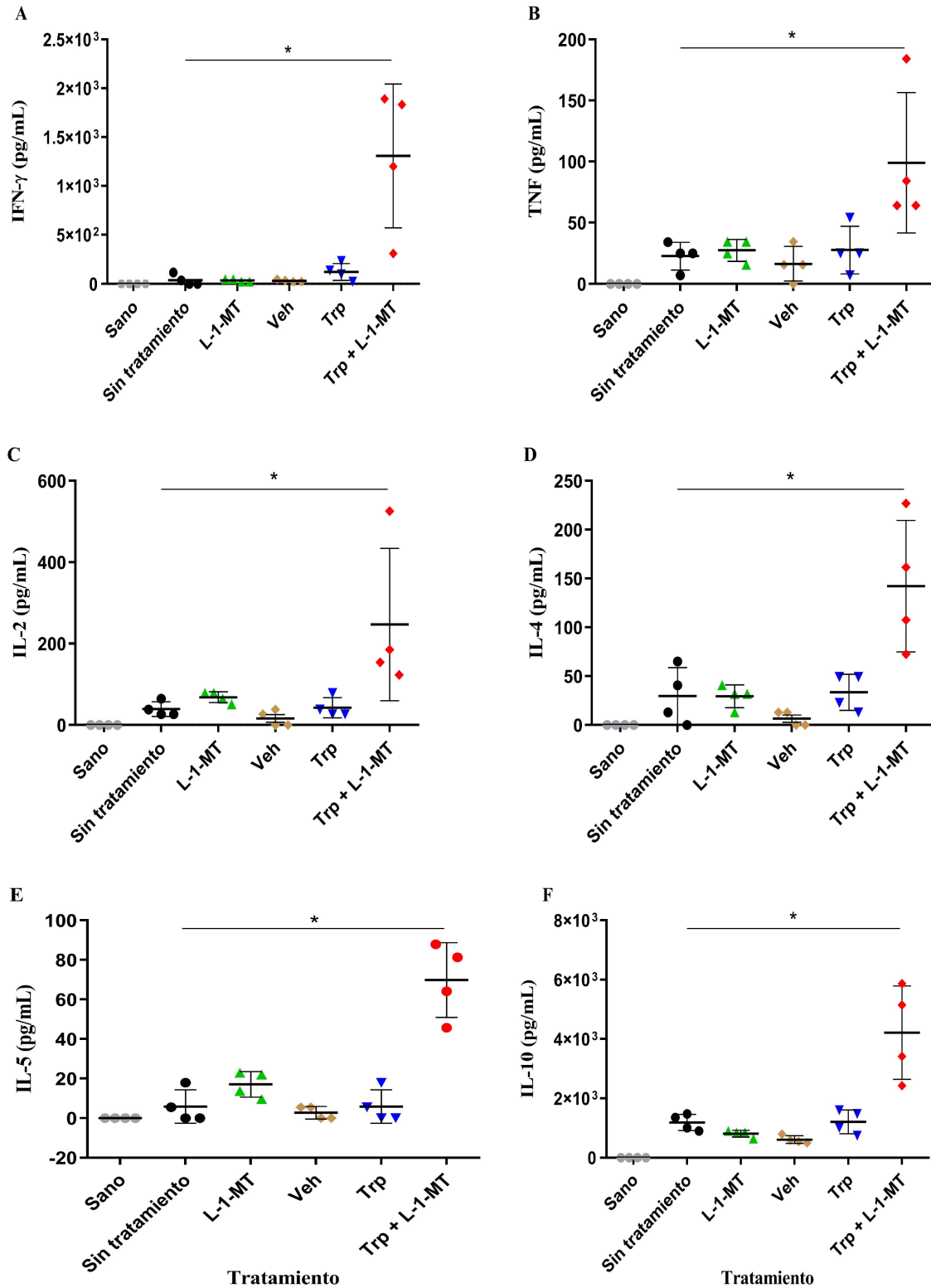


Figura 7.4: Producción de citocinas en el nódulo linfático poplíteo de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y tratados con L-1-MT, Trp o Trp + L-1-MT. Se cuantificaron los niveles de: A. IFN- $\gamma$ , B. TNF, C. IL-2, D. IL-4, E. IL-5 e F. IL-10. La línea horizontal representa la media de las concentraciones de citocinas de cuatro experimentos independientes. Los asteriscos representan la diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) de cada condición con respecto al grupo sin tratamiento

# Discusión

---

El Trp es un aminoácido esencial para el crecimiento y proliferación de las células del sistema inmune y parásitos como *Leishmania* [62, 31], por lo tanto, la deficiencia de este aminoácido puede conducir a la muerte de las células del sistema inmune y la eliminación de patógenos [44, 62, 83]. LaIDO es una enzima que degrada y agota al Trp a nivel local y sistémico como un efecto antimicrobiano [83, 70, 90]; sin embargo, el catabolismo del Trp a través de IDO también es capaz de inducir el estado tolerogénico mediante la formación de Kyn [44, 70]. Por lo que, en este trabajo se propuso analizar el efecto de la suplementación con Trp en el desarrollo de la infección por *L. mexicana* y si la inhibición de su catabolismo por L-1-MT contribuía a la resolución de la enfermedad.

Durante todo su ciclo de vida, *Leishmania* es capaz de oxidar aminoácidos con anillo indol como el Trp, debido a que su catabolismo es necesario para una serie de funciones celulares vitales como la síntesis de proteínas; la osmorregulación; la producción de energía y la biosíntesis de poliaminas, necesarias para el control redox del microambiente dentro de la célula hospedera [33]. De acuerdo con los resultados, la suplementación con Trp tiende a aumentar la sobrevivencia de *L. mexicana* en su célula hospedera en condiciones *in vitro*. Esto podría deberse a que una de las vías de la degradación del Trp en el parásito puede producir metabolitos con efecto antioxidante

[35, 91].

Westrop *et al.* (2015), observaron que *L. mexicana* transforma al Trp a indol-3-lactato, como principal producto final del catabolismo del aminoácido. La vía del indol-3-lactato genera  $NAD^+$ , un metabolito capaz de reducir la producción de ROS en macrófagos que podría funcionar como un medio para mantener la homeostasis redox en la célula hospedera [35, 91]. Además, se ha reportado que *L. major*, *L. donovani* y *L. mexicana*, difieren en el consumo de Trp y en la producción de metabolitos como el indol-3-lactato, lo que sugiere que el parásito cataboliza al Trp por diferentes vías metabólicas y con propósitos metabólicos particulares de cada especie [33]. En otros tripanosomátidos, como *T. cruzi*, también se ha observado que los productos de la oxidación de aminoácidos aromáticos se relacionan con la patogenicidad de los protozoarios y con la reoxidación de NADH [92].

En relación con lo anterior, se sugiere que durante la suplementación *in vitro* con Trp, el amastigote intracelular podría metabolizar al aminoácido para contrarrestar los mecanismos microbicidas, al mismo tiempo que agota el Trp local que compromete la viabilidad de su célula hospedera. Tomando en cuenta lo anterior, también se puede sugerir que el consumo de Trp por el parásito podría conducir a la supresión de la respuesta inmune, ya que la ausencia de este aminoácido induce el arresto del ciclo celular, la autofagia o apoptosis de células inmunes [62, 66]. Sin embargo, para probar esta idea se necesitaría analizar la suplementación con Trp durante la infección por *L. mexicana* en presencia de otros componentes inmunológicos.

Con el fin de demostrar que los amastigotes podían inducir la supresión de la respuesta inmunológica mediante el agotamiento del Trp, se infectaron ratones BALB/c con *L. mexicana* y se suplementaron con Trp. Los resultados muestran que la suplementación con Trp exagera la inflamación y la carga parasitaria en un efecto dosis dependiente, lo cual sugiere que *L. mexicana* se favorece de la producción del efecto inmunosupresor, provocado por el agotamiento del Trp, que le permite sobrevivir en su hospedero. Como se mencionó anteriormente, *L. mexicana* podría estar consumiendo el Trp del medio para limitar a su célula hospedera del aminoácido, o bien, para transformarlo en metabolitos que le permitan sobrevivir a los efectos microbicidas

[35].

Otra vía del catabolismo del Trp, por la cual se podría beneficiar el parásito, es a través de la degradación del aminoácido por la enzima IDO, misma que se ha relacionado con la exacerbación de infecciones por protozoarios como *Leishmania*, *Plasmodium* y *Giardia* [32, 93, 94]. En las infecciones con *L. major*, *L. donovani* y *L. guyanensis*, se ha demostrado que el parásito es capaz de inducir la expresión de IDO para favorecerse de sus actividades inmunosupresoras y persistir en su hospedero [32, 58, 95]. Asimismo, en el modelo murino se ha observado que la actividad de IDO en la infección por *L. major* disminuyó la proliferación de las células T CD4+ y T CD8+ [32]. Mientras que en la infección por *L. guyanensis* los niveles de mRNA de IDO se correlacionaron con los niveles de mRNA de Foxp3 [95]. Los datos anteriores podrían estar relacionados con la degradación del Trp por IDO que podría haber promovido la supresión de la respuesta inmune y la exacerbación de la infección.

Tomando en cuenta todo lo anterior, se condujo a probar la administración de L-1-MT como inhibidor de IDO. Los resultados de la evaluación del efecto de la suplementación del inhibidor en el transcurso de la infección por *L. mexicana* demostraron aparentemente que el L-1-MT no es relevante en la resolución de la enfermedad, pues la inhibición de IDO no mostró tener un efecto significativo en la disminución del tamaño de las lesiones y la carga parasitaria en ratones infectados. Adicionalmente, el tratamiento de la inhibición de IDO no logra incrementar la producción de citocinas inflamatorias que se esperaría para resolver la infección.

Un punto por considerar es que para que un inhibidor de IDO sea potente, este debe alcanzar niveles similares o superiores al Trp en el tejido de interés, por lo tanto, una falta de la inhibición eficaz de L-1-MT podría deberse a que la concentración del inhibidor fuera demasiado baja para inhibir la actividad de IDO *in vivo* [96]. También podría sugerirse que L-1-MT solo logró inhibir un pequeño porcentaje de la actividad de la enzima, que explicaría la reducción no significativa de la carga parasitaria y el tamaño de las lesiones.

Por otro lado, en este trabajo el inhibidor fue administrado al modelo murino susceptible (BALB/c) reportado para la infección por *L. mexicana* [20]. Acorde a la

literatura, el modelo murino BALB/c al no poder montar una respuesta Th1 protectora contra *Leishmania*, experimenta lesiones mayores, la diseminación del parásito y una alta producción de IL-4 e IL-10 inducida por la infección, lo que finalmente conduce a la muerte de los ratones [97, 98]. Tomando en cuenta que el destino natural del modelo murino no es resolver la infección debido a la escasa producción de citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ , posiblemente la administración de L-1-MT no contribuye a mejorar la respuesta inmune en los niveles necesarios para lograr la resolución de la infección.

Ahora bien, en la infección por *L. major*, Divanovic *et al.* (2012) observaron que la administración de L-1-MT reduce el tamaño de la lesión en ratones C57BL/6 [83]; sin embargo, es importante recordar que las respuestas inmunes curativas contra *L. major* dependen de una respuesta inmune inflamatoria Th1 y se sabe que los ratones C57BL/6 son capaces de desarrollar este tipo de respuesta [97]. De manera que, se esperaría que este modelo murino resolviera la infección aun en la ausencia del inhibidor. Por lo que se propone que el papel de L-1-MT en el transcurso de la infección por *L. mexicana* podría estar sujeto a las características inmunológicas del hospedero.

Como se mencionó anteriormente, la administración de L-1-MT no fue capaz de incrementar la producción de citocinas inflamatorias, que podrían reflejar la inhibición del efecto supresor de IDO. Por otro lado, se demostró que la suplementación de Trp + L-1-MT aumenta la producción de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10 en las células del ganglio drenante. Lo anterior podría sugerir que luego de una administración extra de Trp, los niveles del aminoácido son suficientes para ser consumidos tanto por el parásito como por las células del sistema inmune, por tanto, observamos una alta producción de citocinas, pero a su vez una exacerbación de la infección. Por lo que estos datos en conjunto podrían explicar porque la administración del inhibidor no es suficiente para aumentar la actividad inflamatoria necesaria para la eliminación del patógeno, ya que se necesita de mayores niveles de Trp disponible para una adecuada actividad de las células inmunes.

En este trabajo se demostró que la infección por *L. mexicana* induce la producción



de IL-10 en las células de ganglio de ratones BALB/c. Del mismo modo, se ha documentado que la infección por *Leishmania* en humanos y ratones es capaz de inducir la producción de IL-10 [99]. Además, las formas no curativas de las leishmaniasis en humanos se asocian con la alta producción de IL-10 y la ausencia de esta citocina conduce a la resolución de la infección en el modelo murino [100]. De acuerdo con los resultados de este trabajo, el tratamiento con Trp + L-1-MT indujo la producción de IL-10 a una concentración de 4.22 ng/mL, una concentración elevada respecto a lo observado en ratones sanos y 3.5 veces más que lo observado en el grupo sin tratamiento. Por lo que, lo anterior podría explicar la severidad de la infección en el grupo tratado con Trp + L-1-MT.

Los resultados de la administración de Trp + L-1-MT también mostraron un aumento significativo de IFN- $\gamma$ , el cual alcanzó niveles de 1.31 ng/mL, 34 veces más que el grupo sin tratamiento. Debido a que la producción de IFN- $\gamma$  es crucial en la activación de los mecanismos microbicidas en la célula hospedera [18, 14, 16], con esta elevada producción se esperaba una reducción de la carga parasitaria; sin embargo, se ha documentado que un ambiente altamente inflamatorio, y en ausencia de Tregs, se impulsa a las células Th1 a producir IL-10 para minimizar el daño tisular ocasionado por la inflamación exacerbada [100]. Además, se sabe que la interacción de las células Th1 productoras de IL-10 con las células Th2 contribuyen con la exacerbación de la infección [100].

De acuerdo con lo reportado, en ratones BALB/c infectados con *L. (Viannia) panamensis* la inhibición de IDO por D-1-MT provocó un aumento de 100 veces la carga parasitaria con lesiones significativamente más grandes respecto al grupo sin tratamiento, debido a la disminución de la producción de Tregs, además de observarse un aumento en la producción de citocinas: IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-13 e IL-17 [101].

Poco se sabe del papel de las Tregs en la infección por *L. mexicana*; no obstante, en la infección por *L. amazonensis* se ha documentado que después de la transferencia de Tregs a ratones C57BL/6, estos mostraron una progresión tardía de la enfermedad, desarrollando lesiones significativamente más pequeñas con menos parásitos, con respecto al grupo sin tratamiento. Además, la transferencia de Tregs indujo la reducción

de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-2 [102].

Aunque en este trabajo no se realizaron ensayos de tipificación celular, se sugiere que durante el tratamiento con Trp + L-1-MT, la administración de L-1-MT podría inducir la disminución de Tregs, mientras que la suplementación con Trp estaría mejorando la actividad productora de citocinas inflamatorias, por lo cual, las células podrían adquirir un fenotipo regulador para evitar el daño tisular que ocasionaría la inflamación exacerbada.

En este estudio se demostró la importancia de la suplementación del Trp en el crecimiento y buen funcionamiento de las células del sistema inmune y el parásito. Sin embargo, los experimentos de la administración de L-1-MT no permitieron dilucidar el papel de L-1-MT durante la infección por *L. mexicana*, por lo que se sugiere reevaluar el papel de la inhibición de IDO tomando en cuenta las perspectivas del trabajo.

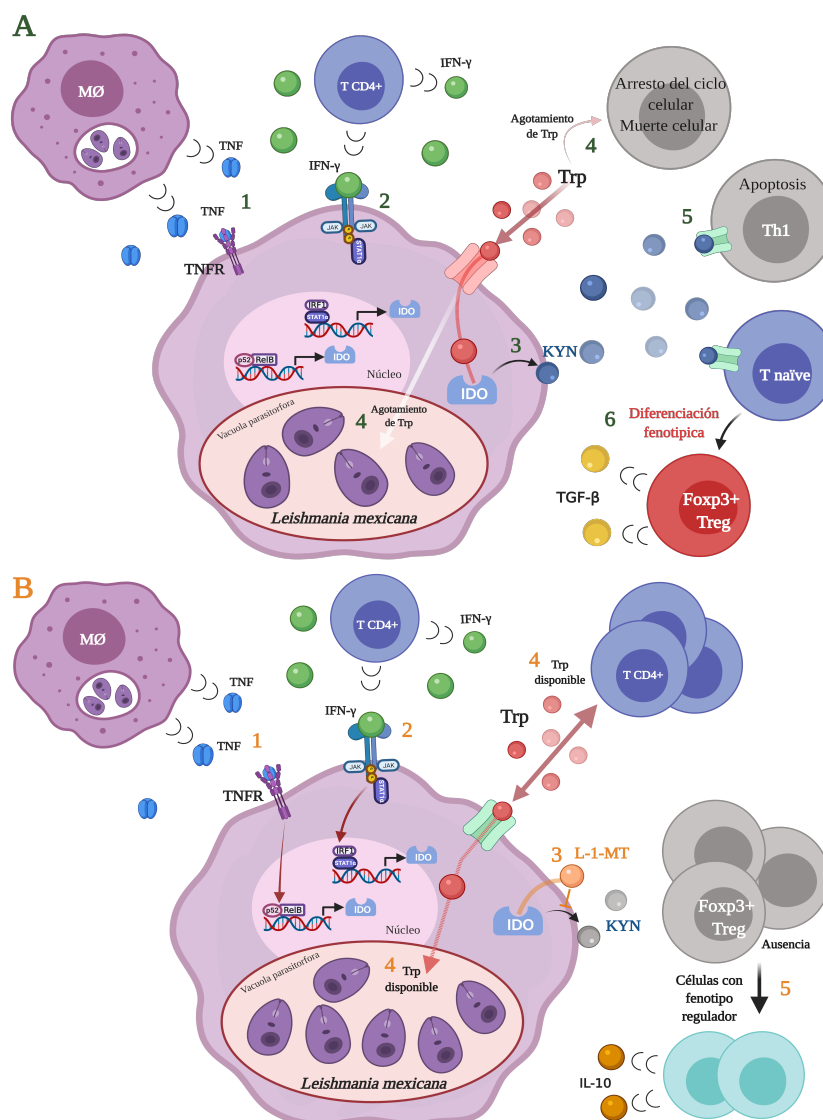


Figura 8.1: Modelo teórico del papel del Trp y de la inhibición de su metabolismo a través de L-1-MT durante la infección por *L. mexicana*. **A)** El papel del Trp durante la infección de *L. mexicana*. 1) *Leishmania* estimula la producción de TNF en su célula hospedera, lo cual induce la expresión de IDO [60, 61]. 2) La producción de IFN- $\gamma$  necesaria para la eliminación del parásito induce la expresión de IDO [57, 49, 50]. 3) Con la alta expresión de IDO, el Trp del medio es consumido para la producción de Kyn [39, 40]. 4) El Trp deja de estar disponible para las células del sistema inmune y para el crecimiento de *L. mexicana* [62]. 5) Las Kyn inducen la muerte celular de células inflamatorias al mismo tiempo que [44] 6) inducen el cambio fenotípico de células T naives hacia Tregs [53]. **B)** Papel del L-1-MT y del Trp durante la infección por *L. mexicana*. 1) Producción de TNF por células infectadas, lo cual induce la expresión de IDO [60, 61]. 2) Producción de IFN- $\gamma$  induce la expresión de IDO [57, 49, 50]. 3) Inhibición de IDO mediante L-1-MT. 4) Con la inhibición de IDO, el Trp del medio queda disponible para las células del sistema inmune y para *L. mexicana*, lo que favorece su proliferación. 5) La ausencia de células Tregs podría estar induciendo el cambio fenotípico de células inflamatorias hacia un fenotipo regulador caracterizado por la alta producción de IL-10 [100]. Elaboración propia.

# Conclusiones

---

En este trabajo se concluyó que la suplementación con Trp exacerba la infección por *L. mexicana*, posiblemente debido a que la suplementación favorece el crecimiento del parásito, al mismo tiempo que se ve beneficiado de la actividad inmunosupresora del catabolismo del aminoácido. Asimismo, la suplementación con Trp no induce cambios en el aumento de la producción de citocinas inflamatorias como TNF e IFN- $\gamma$ . La administración de L-1-MT no contribuyó a resolver la infección ni aumenta la producción de citocinas inflamatorias como TNF e IFN- $\gamma$ . Mientras que la suplementación de Trp + L-1-MT si logra incrementar la producción de citocinas anti y proinflamatorias, pero exacerba la infección. Aunque en este trabajo no se realizaron ensayos de tipificación de células inmunes, podría ser que la inhibición de IDO más la suplementación con Trp conduzca a la reducción de Tregs y con ello al aumento significativo de IL-10 producido por células Th1 bajo un fenotipo regulador. Estos resultados resaltan la importancia del estudio del papel del catabolismo del Trp y el posible papel de las Tregs en la infección por *L. mexicana* y su contemplación para el diseño de una alternativa terapéutica contra la leishmaniasis.

# Perspectivas

---

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten un acercamiento inicial del papel del Trp en la infección por *L. mexicana*. Asimismo, también resalta la importancia de seguir evaluando el papel de IDO durante el desarrollo de la enfermedad. Por tanto, se propone:

1. Cuantificar la expresión de IDO en el sitio de infección.
2. Analizar la actividad de IDO durante la infección de *L. mexicana* a través de la cuantificación de la relación de los niveles Kyn/Trp en el suero de ratones infectados mediante HPLC.
3. Considerar un control positivo de la inhibición de la enzima, por ejemplo, ratones KO deficientes de IDO.
4. Evaluar el papel de IDO en la infección por *L. mexicana* en el modelo murino C57BL/6.
5. Cuantificar y tipificar las células T CD4+, T CD8+ y Tregs en ratones suplementados con Trp; L-1-MT y Trp + L-1-MT.

Además, se propone continuar investigando el efecto del 1-MT durante la infección por *L. mexicana* tomando en cuenta las siguientes propuestas:

1. Tiempo de administración. Se propone prolongar el tiempo de consumo del inhibidor.
2. Modificar la dosis. Se propone aumentar la concentración del inhibidor considerando no exceder la administración de 10 mg por día.
3. Evaluar el papel de L-1-MT en el modelo C57BL/6. Analizar el efecto de la administración del inhibidor en un modelo murino C57BL/6 con el fin de evaluar si la inhibición de la actividad inmunosupresora de IDO contribuye con la respuesta inflamatoria que es capaz de montar el modelo de manera regular.
4. Combinar la administración de los estereoisómeros de 1-MT.
5. Modificar el inhibidor. Considerar otro inhibidor análogo de Trp que no tenga un efecto tóxico sobre las células hospederas.

---

# Bibliografía

---

- [1] F. Afrin and H. Hemeg, *Leishmaniasis as re-emerging diseases*, ch. Leishmaniasis: An emerging clinical syndrome. IntechOpen, 2018.
- [2] F. Conceição-Silva and F. N. Morgado, “*Leishmania* spp-host interaction: There is always an onset, but is there an end?,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 9, p. 330, 2019.
- [3] I. Becker, N. Salaiza, M. Aguirre, L. Gutiérrez, and J. Hernández, *Parasitología médica*, ch. Leishmaniosis, p. 329. México.: M. H. Interamericana, 2a ed., 2008.
- [4] M. Hernández-Rivera, O. Hernández-Montes, A. Chiñas-Pérez, J. Batiza-Avelar, G. Sánchez-Tejeda, C. Wong-Ramírez, and A. Monroy-Ostria, “Study of cutaneous leishmaniasis in the state of Campeche (Yucatan Peninsula), Mexico, over a period of two years,” *Salud Pública México*, vol. 57, pp. 58 – 65, 02 2015.
- [5] J. A. Pastor-Santiago, S. Chávez-López, C. Guzmán-Bracho, A. Flisser, and A. Olivo-Díaz, “American visceral leishmaniasis in Chiapas, Mexico,” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 86, no. 22232459, pp. 108–114, 2012.
- [6] M. A. Rodríguez-Serrato, M. C. Salinas-Carmona, and A. Y. Limón-Flores, “Immune response to *Leishmania mexicana* : the host-parasite relationship,” *Pathogens Disease*, vol. 78, no. 8, 2020.
- [7] O. P. de la salud, “Leishmaniasis visceral.” [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6420:](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420)

- [2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=es](#), 2012. Recuperado el 2021-07-13.
- [8] F. Velez, J. A. Velez, and I. D. Vlez, “Reconstrucción quirúrgica tras destrucción nasal por *Leishmania panamensis*,” *Cirugía Plástica Ibero-latinoamericana*, vol. 3939, no. 1, pp. 73–8073 – 80, 2013.
- [9] WHO, “Leishmaniasis.” <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, 2014. Recuperado el 2020-02-05.
- [10] M. Mokni, “Leishmaniosis cutáneas,” *EMC - Dermatología*, vol. 50, no. 3, pp. 1–12, 2016.
- [11] J. Sunter and K. Gull, “Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding,” *Open biology*, vol. 7, no. 9, p. 170165, 2017.
- [12] D. E. Teixeira, M. Benchimol, J. C. F. Rodrigues, P. H. Crepaldi, P. F. P. Pimenta, and W. de Souza, “The cell biology of *Leishmania*: How to teach using animations,” *PloS Pathogens*, vol. 9, p. e1003594, Oct. 2013.
- [13] G. Gupta, S. Oghumu, and A. R. Satoskar, “Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis,” *Advances in applied microbiology*, vol. 82, pp. 155–184, 2013.
- [14] M. Rossi and N. Fasel, “How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!,” *International immunology*, vol. 3, no. 3, pp. 103–111, 2018.
- [15] E. K. Elmahallawy, A. A. M. Alkhaldi, and A. A. Saleh, “Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 139, p. 111671, 2021.
- [16] T. Dubie and Y. Mohammed, “Review on the role of host immune response in protection and immunopathogenesis during cutaneous leishmaniasis infection,” *Journal of Immunology Research*, vol. 2020, p. 2496713, 2020.



- [17] P. P. Carneiro, A. S. Dórea, W. N. Oliveira, L. H. Guimarães, C. Brodskyn, E. M. Carvalho, and O. Bacellar, “Blockade of tlr2 and tlr4 attenuates inflammatory response and parasite load in cutaneous leishmaniasis,” *Frontiers in Immunology*, vol. 12, 2021.
- [18] P. Scott and F. O. Novais, “Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 16, no. 9, pp. 581–592, 2016.
- [19] J. I. Aoki, S. M. Muxel, R. A. Zampieri, K. E. Müller, A. H. Nerland, and L. M. Floeter-Winter, “Differential immune response modulation in early *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c and C57BL/6 macrophages based on transcriptome profiles,” *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 19841, 2019.
- [20] F. Tacchini-Cottier, T. Weinkopff, and P. Launois, “Does T helper differentiation correlate with resistance or susceptibility to infection with *L. major*? some insights from the murine model,” *Frontiers in Immunology*, vol. 3, pp. 32–32, 2012.
- [21] A. T. Fabiola, D. Laman Jon, V. M. Marjan, A. Luciano, M. Eric, and Y. Carlier, “Endogenous Interleukin-12 is critical for controlling the late but not the early stage of *Leishmania mexicana* infection in C57BL/6 mice,” *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 9, pp. 5075–5080, 2002.
- [22] E. Bourreau, C. Ronet, P. Couppié, D. Sainte-Marie, F. Tacchini-Cottier, and P. Launois, “IL-10 producing CD8+ T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*,” *Microbes and Infection*, vol. 9, no. 8, pp. 1034–1041, 2007.
- [23] J. Hernández-Ruiz, N. Salaiza-Suazo, G. Carrada, S. Escoto, A. Ruiz-Remigio, Y. Rosenstein, A. Zentella, and I. Becker, “CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, *in vitro*, by TLR-2 agonists,” *PLoS neglected tropical diseases*, vol. 4, no. 11, pp. e871–e871, 2010.

- [24] F. O. Novais, A. C. Wong, D. O. Villareal, D. P. Beiting, and P. Scott, “CD8+ T cells lack local signals to produce IFN- $\gamma$  in the skin during *Leishmania* infection,” *The Journal of Immunology*, vol. 200, p. 1737, Mar. 2018.
- [25] N. Wanasen, L. Xin, and L. Soong, “Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection,” *International journal for parasitology*, vol. 38, no. 17959178, pp. 417–429, 2008.
- [26] L. Firmino-Cruz, D. Decote-Ricardo, D. C. d. O. Gomes, A. Morrot, C. G. Freire-de Lima, and H. L. de Matos Guedes, “How to b(e)-1 important cell during *Leishmania* infection,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 9, p. 424, 2020.
- [27] E. Bifeld and J. Clos, “The genetics of *Leishmania* virulence,” *Medical Microbiology and Immunology*, vol. 204, no. 6, pp. 619–634, 2015.
- [28] T. Hermoso, Z. Fishelson, S. I. Becker, K. Hirschberg, and C. L. Jaffe, “Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system,” *The EMBO journal*, vol. 10, pp. 4061–4067, Dec. 1991.
- [29] L. E. Soto-Serna, M. Diupotex, J. Zamora-Chimal, A. Ruiz-Remigio, J. Delgado-Domínguez, R. B. Cervantes-Sarabia, A. Méndez-Bernal, A. R. Escalona-Montaño, M. M. Aguirre-García, and I. Becker, “*Leishmania mexicana*: Novel insights of immune modulation through amastigote exosomes,” *Journal of Immunology Research*, vol. 2020, p. 8894549, 2020.
- [30] M. M. Aguirre-Garcia, A. R. Escalona-Montaño, A. A. Wilkins-Rodríguez, and L. Gutiérrez-Kobeh, *Leishmaniases as re-emerging diseases*, ch. Immune evasion strategies. IntechOpen, 2018.
- [31] L.-F. Lye, S. O. Kang, J. D. Nosanchuk, A. Casadevall, and S. M. Beverley, “Phenylalanine hydroxylase (PAH) from the lower eukaryote *Leishmania major*,” *Molecular and biochemical parasitology*, vol. 175, no. 1, pp. 58–67, 2011.

- [32] L. H. C. Makala, B. Baban, H. Lemos, A. R. El-Awady, P. R. Chandler, D.-Y. Hou, D. H. Munn, and A. L. Mellor, “*Leishmania major* attenuates host immunity by stimulating local indoleamine 2,3-dioxygenase expression,” *The Journal of infectious diseases*, vol. 203, no. 5, pp. 715–725, 2011.
- [33] C. Nowicki and J. J. Cazzulo, “Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids,” *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, vol. 151, no. 3, pp. 381–390, 2008.
- [34] S. Sasidharan and P. Saudagar, “Concerted motion of structure and active site charge is required for tyrosine aminotransferase activity in *Leishmania* parasite,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 232, p. 118133, 2020.
- [35] G. D. Westrop, R. A. M. Williams, L. Wang, T. Zhang, D. G. Watson, A. M. Silva, and G. H. Coombs, “Metabolomic analyses of *Leishmania* reveal multiple species differences and large differences in amino acid metabolism,” *PLoS ONE*, vol. 10, no. 9, p. e0136891, 2015.
- [36] J. Vernal, J. J. Cazzulo, and C. Nowicki, “Isolation and partial characterization of a broad specificity aminotransferase from *Leishmania mexicana* promastigotes,” *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 96, no. 1, pp. 83–92, 1998.
- [37] D. M. Richard, M. A. Dawes, C. W. Mathias, A. Acheson, N. Hill-Kapturczak, and D. M. Dougherty, “L-tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications,” *International Journal of Tryptophan Research*, vol. 2, 2009.
- [38] M. Platten, E. A. A. Nollen, U. F. Röhrig, F. Fallarino, and C. A. Opitz, “Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 18, no. 5, pp. 379–401, 2019.

- [39] A. A.-B. Badawy, “Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects,” *International Journal of Tryptophan Research*, vol. 10, pp. 1178646917691938–1178646917691938, 2017.
- [40] D. H. Munn, M. D. Sharma, D. Hou, B. Baban, J. R. Lee, S. J. Antonia, J. L. Messina, P. Chandler, P. A. Koni, and A. L. Mellor, “Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no. 2, pp. 280–290, 2004.
- [41] W. Qiongxin, L. Danxia, S. Ping, and Z. Ming-Hui, “Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation, and immune activation,” *Frontiers in Bioscience-Landmark*, vol. 20, no. 7, pp. 1116–1143, 2015.
- [42] F. A. Boros and L. Vécsei, “Immunomodulatory effects of genetic alterations affecting the kynurenine pathway,” *Frontiers in immunology*, vol. 10, pp. 2570–2570, 2019.
- [43] I. Cervenka, L. Z. Agudelo, and J. L. Ruas, “Kynurenines: Tryptophan’s metabolites in exercise, inflammation, and mental health,” *Science*, vol. 357, no. 6349, p. eaaf9794, 2017.
- [44] F. Fallarino, U. Grohmann, C. Vacca, R. Bianchi, C. Orabona, A. Spreca, M. C. Fioretti, and P. Puccetti, “T cell apoptosis by tryptophan catabolism,” *Cell Death & Differentiation*, vol. 9, no. 10, pp. 1069–1077, 2002.
- [45] L. E. Goldstein, M. C. Leopold, X. Huang, C. S. Atwood, A. J. Saunders, M. Hartshorn, J. T. Lim, K. Y. Faget, J. A. Muffat, R. C. Scarpa, L. T. Chylack, E. F. Bowden, R. E. Tanzi, and A. I. Bush, “3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote  $\alpha$ -crystallin cross-linking by metal ion reduction,” *Biochemistry*, vol. 39, no. 24, pp. 7266–7275, 2000.
- [46] S. P. Jones, N. F. Franco, B. Varney, G. Sundaram, D. A. Brown, J. de Bie, C. K. Lim, G. J. Guillemin, and B. J. Brew, “Expression of the kynurenine pathway in

- human peripheral blood mononuclear cells: implications for inflammatory and neurodegenerative disease,” *PloS One*, vol. 10, no. 6, pp. e0131389–e0131389, 2015.
- [47] R. S. Grant, S. E. Coggan, and G. A. Smythe, “The physiological action of picolinic acid in the human brain,” *International Journal of Tryptophan Research*, vol. 2, pp. 71–79, 2009.
- [48] M. X. Du, W. D. Sotero-Esteva, and M. W. Taylor, “Analysis of transcription factors regulating induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by IFN- $\gamma$ ,” *Journal of Interferon & Cytokine Research*, vol. 20, no. 2, pp. 133–142, 2000.
- [49] F. Castro, A. P. Cardoso, R. M. Gonçalves, K. Serre, and M. J. Oliveira, “Interferon- $\gamma$  at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion,” *Frontiers in immunology*, vol. 9, pp. 847–847, 2018.
- [50] H. Fujigaki, K. Saito, S. Fujigaki, M. Takemura, K. Sudo, H. Ishiguro, and M. Seishima, “The Signal Transducer and Activator of Transcription 1 $\alpha$  and Interferon Regulatory Factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ b pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines,” *Journal of Biochemistry*, vol. 139, no. 4, pp. 655–662, 2006.
- [51] E. Bahraoui, M. Serrero, and R. Planès, “HIV-1 Tat - TLR4/MD2 interaction drives the expression of IDO-1 in monocytes derived dendritic cells through NF- $\kappa$ B dependent pathway,” *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, p. 8177, 2020.
- [52] J. Yu, Y. Wang, F. Yan, P. Zhang, H. Li, H. Zhao, C. Yan, F. Yan, and X. Ren, “Noncanonical NF- $\kappa$ B activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in myeloid-derived suppressor cells in breast cancer,” *Journal of Immunology*, vol. 193, no. 5, pp. 2574–2586, 2014.

- [53] J. D. Mezrich, J. H. Fechner, X. Zhang, B. P. Johnson, W. J. Burlingham, and C. A. Bradfield, "An interaction between kynurenine and the Aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells," *Journal of Immunology*, vol. 185, no. 6, pp. 3190–3198, 2010.
- [54] U. Grohmann, C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M. L. Belladonna, R. Bianchi, M. C. Fioretti, and P. Puccetti, "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism *in vivo*," *Nature Immunology*, vol. 3, no. 11, pp. 1097–1101, 2002.
- [55] B. Baban, P. R. Chandler, r. Johnson, Burles A, L. Huang, M. Li, M. L. Sharpe, L. M. Francisco, A. H. Sharpe, B. R. Blazar, D. H. Munn, and A. L. Mellor, "Physiologic control of IDO competence in splenic dendritic cells," *Journal of Immunology*, vol. 187, no. 5, pp. 2329–2335, 2011.
- [56] J. R. Nair, L. M. Carlson, C. Koorella, C. H. Rozanski, G. E. Byrne, P. L. Bergsagel, J. Shaughnessy, John P, L. H. Boise, A. Chanan-Khan, and K. P. Lee, "CD28 expressed on malignant plasma cells induces a prosurvival and immunosuppressive microenvironment," *Journal of Immunology*, vol. 187, no. 3, pp. 1243–1253, 2011.
- [57] A. Thakur, H. Mikkelsen, and G. Jungersen, "Intracellular pathogens: Host immunity and microbial persistence strategies," *Journal of immunology research*, vol. 2019, pp. 1356540–1356540, Apr. 2019.
- [58] M. J. Donovan, V. Tripathi, M. A. Favila, N. S. Geraci, M. C. Lange, W. Ballhorn, and M. A. McDowell, "Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induced by *Leishmania* infection of human dendritic cells," *Parasite Immunology*, vol. 34, no. 10, pp. 464–472, 2012.
- [59] A. Jayakumar, M. J. Donovan, V. Tripathi, M. Ramalho-Ortigao, and M. A. McDowell, "Leishmania major infection activates nf-kappab and interferon regulatory factors 1 and 8 in human dendritic cells," *Infection and immunity*, vol. 76, pp. 2138–2148, May 2008.

- [60] M. F. Lopes, A. C. Costa-da Silva, and G. A. DosReis, “Innate immunity to infection: Within phagocytes,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2014, p. 754965, 2014.
- [61] S. W. Tas, M. J. Vervoordeldonk, N. Hajji, J. H. N. Schuitemaker, K. F. van der Sluijs, M. J. May, S. Ghosh, M. L. Kapsenberg, P. P. Tak, and E. C. de Jong, “Noncanonical  $\text{nf-}\kappa\text{b}$  signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (ido) induction and immune regulation,” *Blood*, vol. 110, pp. 1540–1549, Sept. 2007.
- [62] D. H. Munn, M. D. Sharma, B. Baban, H. P. Harding, Y. Zhang, D. Ron, and A. L. Mellor, “GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to Indoleamine 2,3-dioxygenase,” *Immunity*, vol. 22, no. 5, pp. 633–642, 2005.
- [63] J. J. Bird, D. R. Brown, A. C. Mullen, N. H. Moskowitz, M. A. Mahowald, J. R. Sider, T. F. Gajewski, C.-R. Wang, and S. L. Reiner, “Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle,” *Immunity*, vol. 9, pp. 229–237, Aug. 1998.
- [64] D. Lee, D. Hokinson, S. Park, R. Elvira, F. Kusuma, J.-M. Lee, M. Yun, S.-G. Lee, and J. Han, “Er stress induces cell cycle arrest at the g2/m phase through eif2 $\alpha$  phosphorylation and gadd45 $\alpha$ ,” *International journal of molecular sciences*, vol. 20, p. 6309, Dec. 2019.
- [65] D. H. Munn, E. Shafizadeh, J. T. Attwood, I. Bondarev, A. Pashine, and A. L. Mellor, “Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 189, no. 9, pp. 1363–1372, 1999.
- [66] X. Xia, L. Lei, W. Qin, L. Wang, G. Zhang, and J. Hu, “GCN2 controls the cellular checkpoint: potential target for regulating inflammation,” *Cell Death Discovery*, vol. 4, no. 1, p. 20, 2018.

- [67] B. Ravishankar, H. Liu, R. Shinde, K. Chaudhary, W. Xiao, J. Bradley, M. Koritzinsky, M. P. Madaio, and T. L. McGaha, “The amino acid sensor GCN2 inhibits inflammatory responses to apoptotic cells promoting tolerance and suppressing systemic autoimmunity,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 34, p. 10774, 2015.
- [68] A. L. Mellor, H. Lemos, and L. Huang, “Indoleamine 2,3-dioxygenase and tolerance: Where are we now?,” *Frontiers in Immunology*, vol. 8, pp. 1360–1360, 2017.
- [69] A. Bessede, M. Gargaro, M. T. Pallotta, D. Matino, G. Servillo, C. Brunacci, S. Bicciato, E. M. C. Mazza, A. Macchiarulo, C. Vacca, R. Iannitti, L. Tissi, C. Volpi, M. L. Belladonna, C. Orabona, R. Bianchi, T. V. Lanz, M. Platten, M. A. Della Fazia, D. Piobbico, T. Zelante, H. Funakoshi, T. Nakamura, D. Gilot, M. S. Denison, G. J. Guillemin, J. B. DuHadaway, G. C. Prendergast, R. Metz, M. Geffard, L. Boon, M. Pirro, A. Iorio, B. Veyret, L. Romani, U. Grohmann, F. Fallarino, and P. Puccetti, “Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway,” *Nature*, vol. 511, no. 7508, pp. 184–190, 2014.
- [70] F. J. H. Sorgdrager, P. J. W. Naudé, I. P. Kema, E. A. Nollen, and P. P. D. Deyn, “Tryptophan metabolism in inflammaging: from biomarker to therapeutic target,” *Frontiers in Immunology*, vol. 10, pp. 2565–2565, 2019.
- [71] L. V. Sinclair, D. Neyens, G. Ramsay, P. M. Taylor, and D. A. Cantrell, “Single cell analysis of kynurenine and system L amino acid transport in T cells,” *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, p. 1981, 2018.
- [72] J. Jiang, S. Srivastava, G. Seim, N. N. Pavlova, B. King, L. Zou, C. Zhang, M. Zhong, H. Feng, R. Kapur, R. C. Wek, J. Fan, and J. Zhang, “Promoter demethylation of the asparagine synthetase gene is required for atf4-dependent adaptation to asparagine depletion,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 294, pp. 18674–18684, Dec. 2019.



- [73] H. Hu, M. Tian, C. Ding, and S. Yu, “The c/ebp homologous protein (chop) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, 2019.
- [74] J. L. Fox and M. MacFarlane, “Targeting cell death signalling in cancer: minimising ‘collateral damage’,” *British Journal of Cancer*, vol. 115, no. 1, pp. 5–11, 2016.
- [75] F. J. Quintana, A. S. Basso, A. H. Iglesias, T. Korn, M. F. Farez, E. Bettelli, M. Caccamo, M. Oukka, and H. L. Weiner, “Control of Treg and Th17 cell differentiation by the Aryl hydrocarbon Receptor,” *Nature*, vol. 453, no. 7191, pp. 65–71, 2008.
- [76] I. Fabregat and D. Caballero-Díaz, “Transforming growth factor- $\beta$ -induced cell plasticity in liver fibrosis and hepatocarcinogenesis,” *Frontiers in Oncology*, vol. 8, 2018.
- [77] O. Bereshchenko, M. Coppo, S. Bruscoli, M. Biagioli, M. Cimino, T. Frammartino, D. Sorcini, A. Venanzi, M. Di Sante, and C. Riccardi, “Gilz promotes production of peripherally induced treg cells and mediates the crosstalk between glucocorticoids and tgf- $\beta$  signaling,” *Cell Reports*, vol. 7, no. 2, pp. 464–475, 2014.
- [78] S. G. Cady and M. Sono, “1-methyl-dl-tryptophan,  $\beta$ -(3-benzofuranyl)-dl-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and  $\beta$ -[3-benzo(b)thienyl]-dl-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 291, no. 2, pp. 326–333, 1991.
- [79] E. Wirthgen, A. K. Leonard, C. Scharf, and G. Domanska, “The immunomodulator 1-methyltryptophan drives tryptophan catabolism toward the kynurenic acid branch,” *Frontiers in immunology*, vol. 11, pp. 313–313, 2020.

- [80] K. Tetsutani, H. T. O., M. Torii, H. Hisaeda, and K. Himeno, "Malaria parasite induces tryptophan-related immune suppression in mice," *Parasitology*, vol. 134, no. 7, pp. 923–930, 2007.
- [81] Y. Murakami, M. Hoshi, A. Hara, M. Takemura, Y. Arioka, Y. Yamamoto, H. Matsunami, T. Funato, M. Seishima, and K. Saito, "Inhibition of increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity attenuates *Toxoplasma gondii* replication in the lung during acute infection," *Cytokine*, vol. 59, no. 2, pp. 245–251, 2012.
- [82] D.-Y. Hou, A. J. Muller, M. D. Sharma, J. DuHadaway, T. Banerjee, M. Johnson, A. L. Mellor, G. C. Prendergast, and D. H. Munn, "Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses," *Cancer Research*, vol. 67, no. 2, p. 792, 2007.
- [83] S. Divanovic, N. M. Sawtell, A. Trompette, J. I. Warning, A. Dias, A. M. Cooper, G. S. Yap, M. Arditi, K. Shimada, J. B. Duhadaway, G. C. Prendergast, R. J. Basaraba, A. L. Mellor, D. H. Munn, J. Aliberti, and C. L. Karp, "Opposing biological functions of tryptophan catabolizing enzymes during intracellular infection," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 205, no. 1, pp. 152–161, 2012.
- [84] C. P. Knubel, F. F. Martínez, R. E. Fretes, C. Díaz Lujan, M. G. Theumer, L. Cervi, and C. C. Motrán, "Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*," *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, vol. 24, pp. 2689–701, 2010.
- [85] Y. D. Bhutia, E. Babu, and V. Ganapathy, "Interferon- $\gamma$  induces a tryptophan-selective amino acid transporter in human colonic epithelial cells and mouse dendritic cells," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1848, no. 2, pp. 453–462, 2015.

- [86] R. L. Seymour, V. Ganapathy, A. L. Mellor, and D. H. Munn, "A high-affinity, tryptophan-selective amino acid transport system in human macrophages," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 80, no. 6, pp. 1320–1327, 2006.
- [87] P. A. Bates, "Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture," *Parasitology*, vol. 108, no. 1, pp. 1–9, 1994.
- [88] M. D. Englen, Y. E. Valdez, N. M. Lehnert, and B. E. Lehnert, "Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine 1929 cells," *Journal of Immunological Methods*, vol. 184, no. 2, pp. 281–283, 1995.
- [89] C. M. Lezama-Davila, D. M. Williams, G. Gallagher, and J. Alexander, "Cytokine control of *Leishmania* infection in the BALB/c mouse: enhancement and inhibition of parasite growth by local administration of IL-2 or IL-4 is species and time dependent," *Parasite Immunology*, vol. 14, pp. 37–48, Jan. 1992.
- [90] M. T. Nelp, P. A. Kates, J. T. Hunt, J. A. Newitt, A. Balog, D. Maley, X. Zhu, L. Abell, A. Allentoff, R. Borzilleri, H. A. Lewis, Z. Lin, S. P. Seitz, C. Yan, and J. T. Groves, "Immune-modulating enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is effectively inhibited by targeting its apo-form," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 115, no. 13, p. 3249, 2018.
- [91] D. Pajuelo, N. Gonzalez-Juarbe, and M. Niederweis, "Nad hydrolysis by the tuberculosis necrotizing toxin induces lethal oxidative stress in macrophages," *Cellular Microbiology*, vol. 22, no. 1, p. e13115, 2019.
- [92] M. Montemartini, J. Santomé, J. J. Cazzulo, and C. Nowicki, "Production of aromatic  $\alpha$ -hydroxyacids by epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*, and its possible role in NADH reoxidation," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 118, no. 1-2, pp. 89–92, 1994.
- [93] R. O. Dos Santos, R. M. Gonçalves-Lopes, N. F. Lima, K. K. G. Scopel, M. U. Ferreira, and P. Lalwani, "Kynurenine elevation correlates with T regulatory

- cells increase in acute *Plasmodium vivax* infection: A pilot study,” *Parasite Immunology*, vol. 42, no. 3, p. e12689, 2020.
- [94] L. A. Bartelt, D. T. Bolick, J. Mayneris-Perxachs, G. L. Kolling, G. L. Medlock, E. I. Zaenker, J. Donowitz, R. V. Thomas-Beckett, A. Rogala, I. M. Carroll, S. M. Singer, J. Papin, J. R. Swann, and R. L. Guerrant, “Cross-modulation of pathogen-specific pathways enhances malnutrition during enteric co-infection with *Giardia lamblia* and enteroaggregative *Escherichia coli*,” *PLoS pathogens*, vol. 13, no. 7, pp. e1006471–e1006471, 2017.
- [95] E. Bourreau, C. Ronet, E. Darcissac, M. C. Lise, D. Sainte Marie, E. Clity, F. Tacchini-Cottier, P. Couppie, and P. Launois, “Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*,” *Infection and immunity*, vol. 77, no. 4, pp. 1465–1474, 2009.
- [96] J. Günther, J. Däbritz, and E. Wirthgen, “Limitations and off-target effects of tryptophan-related ido inhibitors in cancer treatment,” *Frontiers in Immunology*, vol. 10, pp. 1801–1801, 2019.
- [97] A. P. Nigg, S. Zahn, D. Rückerl, C. Hölscher, T. Yoshimoto, J. M. Ehrchen, F. Wölbing, M. C. Udey, and E. von Stebut, “Dendritic cell-derived il-12p40 homodimer contributes to susceptibility in cutaneous leishmaniasis in balb/c mice,” *The Journal of Immunology*, vol. 178, p. 7251, June 2007.
- [98] T. Kamala and N. K. Nanda, “Protective response to leishmania major in balb/c mice requires antigen processing in the absence of dm,” *The Journal of Immunology*, vol. 182, pp. 4882–4890, Apr. 2009.
- [99] H. W. Murray, C. M. Lu, S. Mauze, S. Freeman, A. L. Moreira, G. Kaplan, and R. L. Coffman, “Interleukin-10 (il-10) in experimental visceral leishmaniasis and il-10 receptor blockade as immunotherapy,” *Infection and Immunity*, vol. 70, pp. 6284–6293, Nov. 2002.

- [100] C. F. Anderson, M. Oukka, V. J. Kuchroo, and D. Sacks, “CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis,” *The Journal of experimental medicine*, vol. 204, no. 2, pp. 285–297, 2007.
- [101] A. Ehrlich, T. M. Castilho, K. Goldsmith-Pestana, W.-J. Chae, A. L. M. Bothwell, T. Sparwasser, and D. McMahon-Pratt, “The immunotherapeutic role of regulatory T cells in *Leishmania (Viannia) panamensis* infection,” *Journal of Immunology*, vol. 193, no. 6, pp. 2961–2970, 2014.
- [102] J. Ji, J. Masterson, J. Sun, and L. Soong, “CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection,” *Journal of Immunology*, vol. 174, no. 11, pp. 7147–7153, 2005.

# Anexos

---

### 11.1. Materiales y métodos

#### **Determinación del efecto de la suplementación del Trp sobre la viabilidad de macrófagos murinos derivados de médula ósea**

En una placa de 96 pozos se incubaron  $2.5 \times 10^5$  macrófagos murinos derivados de médula ósea con las siguientes concentraciones de Trp: 25 nM, 100 nM, 150 nM, 250 nM, 1  $\mu$ M y 100  $\mu$ M en medio RPMI-1640 suplementado al 10 % de SFB inactivado por calor y antibiótico al 1 %, 100 U/mL penicilina G y 100 mg/mL estreptomicina, a 37°C y con 5 % de CO<sub>2</sub>, durante toda la noche. Como control negativo se añadieron células sin estimular. Como control positivo se consideraron células tratadas con Perm/Wash 1x. La viabilidad de los macrófagos postratamiento se evaluó tiñendo las células con DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 3.6 mM como marcador de viabilidad. Los datos fueron cuantificados por citometría de flujo FACSCanto II (BD, Becton Dickson, San José, CA, USA). Se utilizó el programa FlowJo™ (Treestar, Ashland, OR, USA) para el análisis de los datos.

## 11.2. Figuras

### Efecto de la suplementación del Trp sobre la viabilidad de macrófagos murinos derivados de médula ósea

La suplementación con Trp en macrófagos murinos derivados de médula ósea no mostró ningún efecto negativo en la viabilidad de estas células. Por el contrario, el porcentaje de células viables se mantuvo por arriba del 99% en cada una de las condiciones. Estos datos indican que el estímulo con Trp en las concentraciones de 25 nM, 100 nM, 150 nM, 250 nM, 1  $\mu$ M y 100  $\mu$ M no son tóxicas para la célula hospedera de *L. mexicana* (Fig. 11.1).

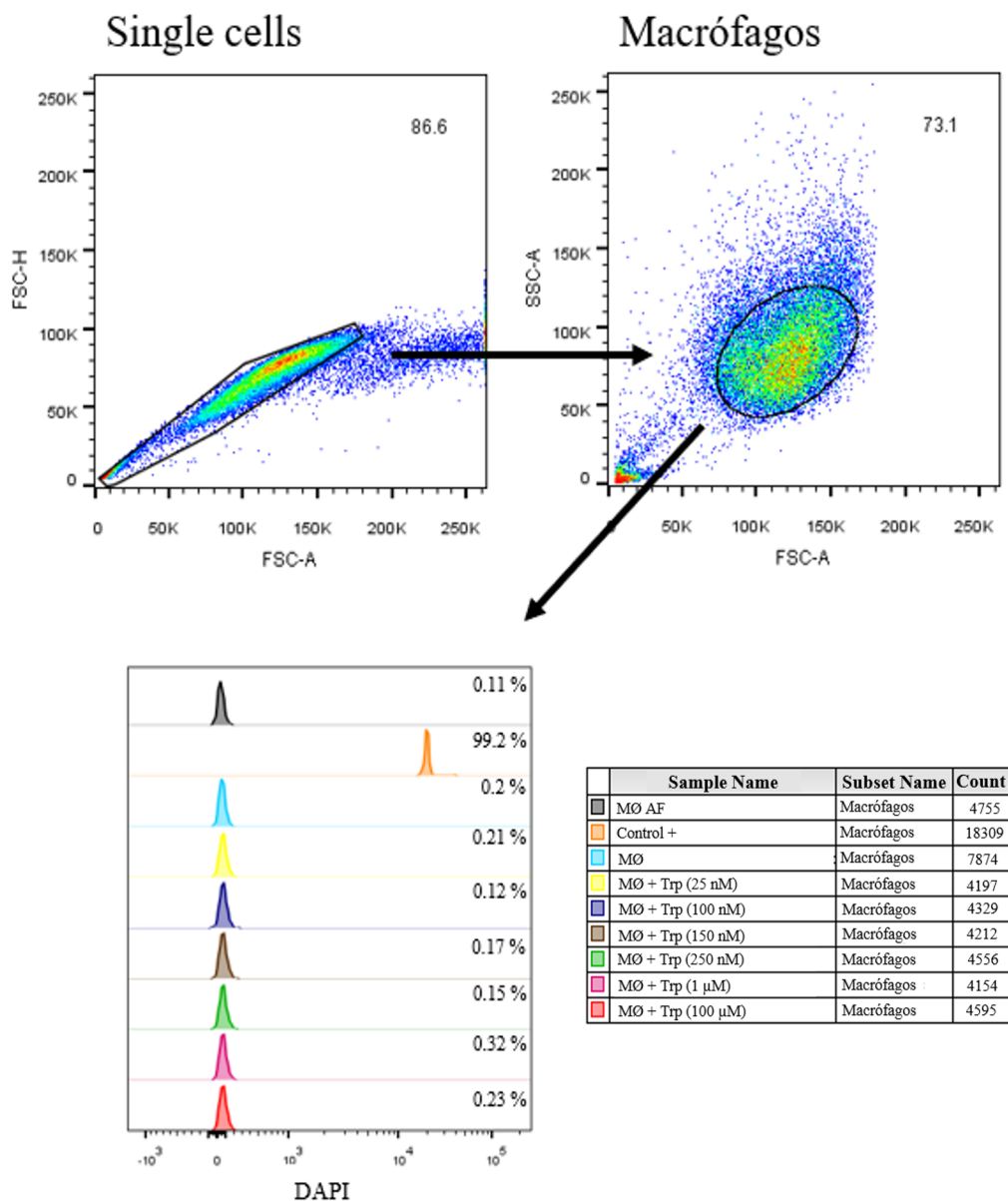


Figura 11.1: **Viabilidad de macrófagos murinos derivados de medula ósea estimulados con Trp** La viabilidad de los macrófagos murinos fue evaluada a través del marcador DAPI luego de ser estimulados con 25 nM, 100 nM, 150 nM, 250 nM, 1  $\mu$ M y 100  $\mu$ M de Trp durante toda la noche. El porcentaje de células muertas está indicado en cada una de las condiciones.



### Peso de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y suplementados con Trp.

Para asegurar que la suplementación con Trp no afectaba el estado nutricional de los ratones, se pesaron durante todo el experimento. Los datos indican que los ratones no presentaron ninguna descompensación de su peso (Fig. 11.2).

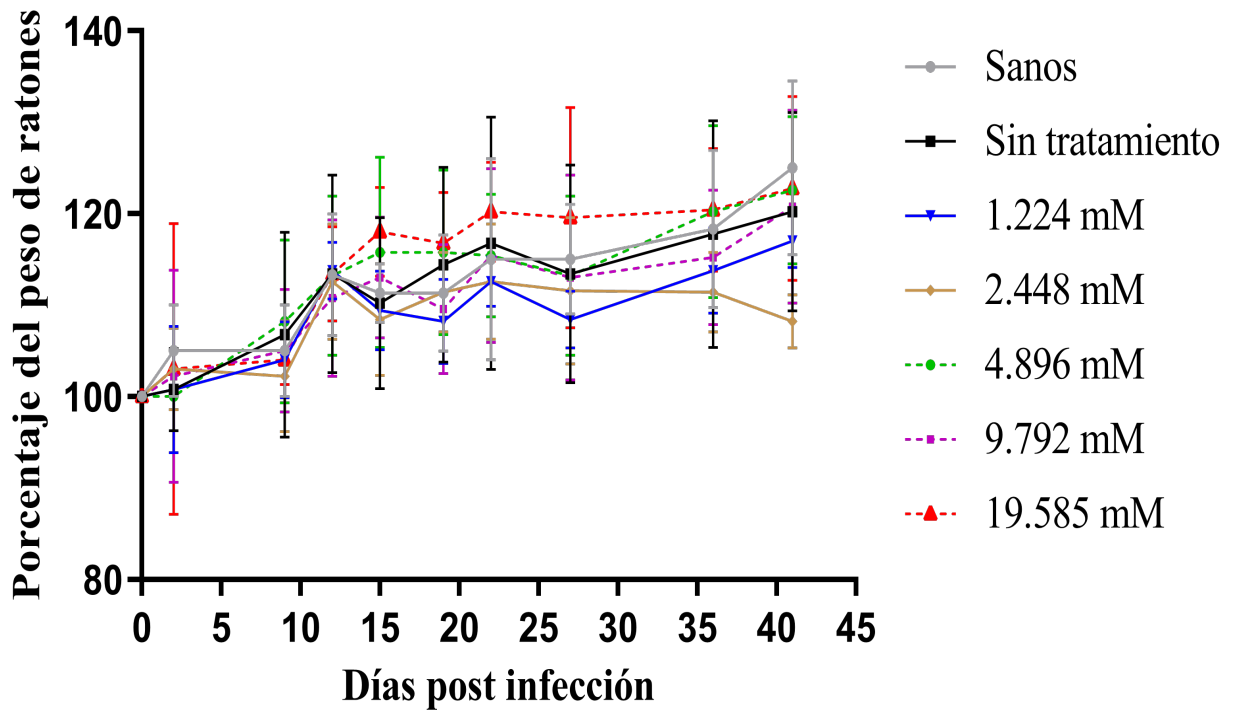


Figura 11.2: Peso de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y suplementados con Trp. No se observa alguna pérdida significativa del peso de los ratones, dentro de cada grupo, durante el tratamiento con Trp.

Porcentaje del peso de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y suplementados con L-1-MT, Trp o Trp + L-1-MT

Los ratones infectados con *L. mexicana* y suplementados con L-1-MT, Trp o Trp + L-1-MT no presentaron ninguna descompensación de su peso (Fig. 11.3).

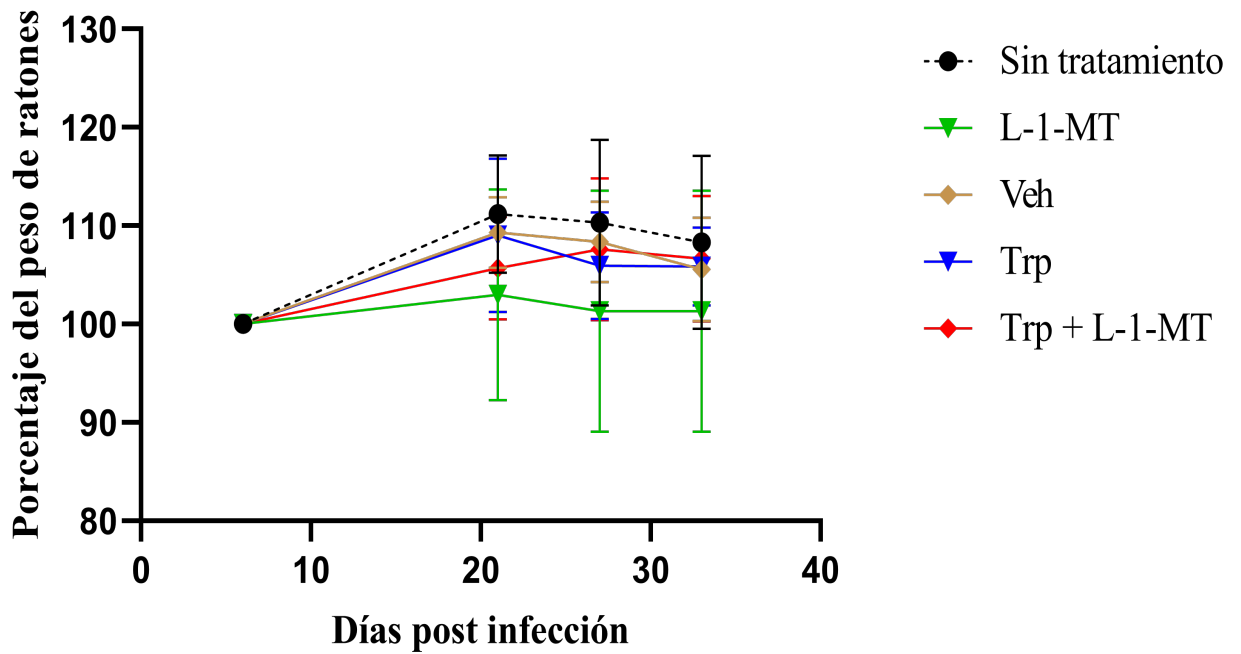


Figura 11.3: Peso de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y suplementados con L-1-MT, Trp o Trp + L-1-MT. No se observa alguna pérdida significativa del peso de los ratones, dentro de cada grupo, durante el tratamiento.