



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“SECRECIÓN DE LA PROTEÍNA
TIROSINA FOSFATASA POR PROMASTIGOTES
DE *Leishmania mexicana*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

HÉCTOR DANIEL PARDAVÉ ALEJANDRE

TUTOR

DRA. MARIA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA



MÉXICO, D. F.

JUNIO DE 2008



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, en el Hospital General de México, bajo la asesoría de la Dra. María Magdalena Aguirre García.

DEDICATORIAS

A DIOS

- 🕉️ Por regalarme el don de existir y la experiencia de vivir.
- 🕉️ Por la familia que me diste.
- 🕉️ Por todo el amor y esperanza que generas en mi día con día.
- 🕉️ Por todo lo que me has dado en mi vida, sea bueno o malo.
- 🕉️ Por darme la oportunidad de llegar este día tan especial para mí y para mis seres queridos.

A MIS PADRES

Tete y Héctor

- 🕉️ Por todo el esfuerzo que han realizado para verme convertido en un hombre de bien y de provecho.
- 🕉️ Por todo el amor, valores, consejos y ejemplo que han inculcado en mí a lo largo de toda mi vida.
- 🕉️ Por todo el apoyo brindado durante toda mi vida académica para llegar a ser un profesionalista.
- 🕉️ Por enseñarme que la vida es dura, que uno cosecha lo que siembra, y que no existe el éxito sino se es disciplinado, constante, responsable, honesto y parándose temprano para ir a trabajar.
- 🕉️ Por ser lo mas importante en mi vida y yo ser una parte importante en la suya.
- 🕉️ Por todo eso y muchas cosas más... gracias por ser mis padres, los amo con toda mi existencia.

A MIS HERMANOS

Karla e Ivan

- 🕉️ Por todos lo momentos buenos y malos que hemos compartido durante nuestras vidas.
- 🕉️ Por que han colaborado en mi formación como persona y profesionalista con sus consejos y críticas.
- 🕉️ Por ser parte importante en mi vida ya que estaremos vinculados por siempre.
- 🕉️ Por todo su amor hacia mí, el cual es igualmente correspondido.
- 🕉️ Por todo lo que nos queda por vivir juntos, aunque nuestros padres ya no estén...gracias por ser mis hermanos, los amo con toda mi existencia.

A MI ABUELA

Conchita

- ④ Por la promesa que te hice de que me verías Titulado.
- ④ Por todo tu amor, consejos, y palabras de aliento para lograr mis metas.
- ④ Por ser para mí una segunda madre desde pequeño, y cuidar de mi hasta la fecha.
- ④ Por tu fuerza y coraje para seguir adelante en esta vida, ya quisiera yo llegar a tu edad, por todo eso y mucho más... gracias Abue, por estar ahí toda mi vida.

A MI AMOR

Valeria

- ④ Por haberme cruzado en tu vida desde hace casi 6 años.
- ④ Por toda la paciencia que me has tenido durante todo este tiempo.
- ④ Por todo tu apoyo y comprensión en los días difíciles y por estar a mi lado para sortearlos juntos.
- ④ Por todo el amor que nos tenemos y que sigue creciendo dentro de nosotros.
- ④ Por ayudarme a ser mejor persona con tus consejos y criticas.
- ④ Por todo lo que significas en mi vida y yo en la tuya...te necesito Valeria, porque te amo con toda mi existencia.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Ciencias, por brindarme la oportunidad de ser Universitario, egresado y haber recibido mi educación profesional de esta máxima casa de estudios de la cual me siento muy orgulloso.
- A DGAPA con número de programa en Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN221606 y a CONACYT con número de registro 45052-M por el apoyo económico para la realización de esta Tesis y la beca PAPIIT IN210602.
- A la Dra. María Magdalena Aguirre García por permitirme trabajar en su equipo, brindarme proyecto de tesis, por su asesoría en la parte experimental, escrita, por su interés en mi Titulación y por todo el apoyo brindado desde el inicio.
- A la Dra. Ingeborg D. Becker Fauser, por permitirme realizar mi tesis de licenciatura en las instalaciones de su laboratorio y por la revisión de esta Tesis.
- A la M. en C. Alma Reyna Escalona Montaña por su valiosa e importante participación en la realización y finalización de esta tesis, por todo el aporte de conocimientos teóricos y prácticos, por toda la paciencia que me tuvo y tiempo que invirtió en mí para que lograra mi objetivo. ¡gracias Alma!
- A la Dra. Patricia Tato y el Dr. Manuel Gutiérrez de Facultad de Medicina, que tan amablemente aceptaron ser mis sinodales aportando su experiencia, conocimientos y tiempo en la revisión de esta tesis.
- A la M. en C. Cristina Cañeda; por el tiempo que dedicó en la revisión de esta tesis y por su gran ayuda en la aplicación de las pruebas estadísticas en los resultados.
- Al M. en C. Joselín Hernández, por su apoyo en los ensayos de Citometría de Flujo.
- A Marco Elías Gudiño Zayas por la asesoría y apoyo en la digitalización de las imágenes y tesis.
- A los integrantes del laboratorio de Inmunoparasitología que de alguna u otra manera aportaron su tiempo y conocimientos en la realización de esta tesis: Dra. Laila Gutiérrez, Dra. Miriam Berzunza, M. en C. Rocely Cervantes, M. en C. Abril Navarrete, M. en C. José Sotero, Bióloga Edith Fernández, Bióloga Jenny Gómez.
- A mis demás compañeros del laboratorio que me apoyaron anímicamente y me aconsejaron en el mejoramiento de esta tesis: P. de Biólogo Juan Espejel, M. en C. Araceli Rojas, Bióloga Vanessa Becerril, Bióloga Berenice Martínez, Bióloga Nancy Robles y P. de Q.F.B. Germán Sánchez.
- A cada uno de mis catedráticos, que me formaron desde el inicio de la carrera hasta hoy.
- A la Biología, una ciencia tan maravillosa como exquisita, “si naciera de nuevo, te volvería a estudiar”.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice General.....	I
Índice de Figuras.....	III
Índice de Tablas.....	IV
Abreviaturas.....	V
Resumen.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Epidemiología de la Leishmaniasis	1
1.2. Agente Etiológico.....	6
1.2.1. Clasificación Taxonómica.....	6
1.2.2. Morfología.....	7
1.2.2.1. Promastigotes.....	7
1.2.2.2. Amastigotes.....	9
1.2.3. Ciclo de vida	11
1.3. El Vector.....	13
1.3.1. El Reservorio.....	14
1.3.2. Transmisión.....	15
1.4. Formas Clínicas de la Leishmaniasis cutánea.....	17
1.4.1. Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL).....	17
1.4.2. Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)	19
1.5. Moléculas presentes en promastigotes de <i>Leishmania</i>.....	21
1.5.1. Lipofosfoglicano.....	22
1.5.2. Glicoproteína gp63.....	22
1.5.3. Fosfatasas ácidas.....	23
1.5.4. Vías de secreción en promastigotes de <i>Leishmania</i>	24
1.5.5. Productos de excreción/secreción en <i>Leishmania</i>	28
1.6. Fosfatasas ácidas secretadas por <i>Leishmania</i>	30
1.7. Fosforilación y desfosforilación.....	32

1.8. Proteínas tirosina fosfatasas	34
1. 9. Inhibidores de PTPasas.....	36
1.9.1. Vanadato.....	36
1.9.2. Pervanadato.....	37
1.10. Participación de las PTPasas en microorganismos patógenos	39
1.11. PTPasas caracterizadas en <i>Leishmania</i>	40
2. JUSTIFICACIÓN.....	42
3. HIPÓTESIS.....	44
4. OBJETIVOS.....	44
4.1. Objetivo General.....	44
4.2. Objetivos Particulares.....	44
5. METODOLOGÍA.....	46
5.1. Cultivo de parásitos.....	46
5.2. Colecta de parásitos.....	46
5.3. Obtención de la PTPasa secretada por promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	48
5.4. Método de viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> por citometría de flujo.....	51
5.5. Determinación de la actividad de fosfatasa ácida.....	52
5.6. Determinación de la actividad de proteína tirosina fosfatasa.....	52
5.7. Determinación del pH óptimo.....	53
5.8. Identificación de la PTPasa de secreción, por ensayos de Western-blot, utilizando un anticuerpo monoclonal α -PTPasa 1B de placenta humana y un anticuerpo α -Try AcP 115 de <i>Trypanosoma brucei</i>	54
5. 9. Efecto de algunos agentes químicos en la actividad de fosfatasa ácida.....	54
5. 10. Análisis estadístico.....	55
6. RESULTADOS.....	56
6.1. Secreción de la PTPasa por promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	55
6.1.1. Tiempo óptimo de crecimiento de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> para la secreción de la fosfatasa.....	56
6.1.2. Viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> por citometría de flujo.....	58
6.2. Caracterización de la PTPasa de secreción de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	59
6.2.1. Determinación del pH óptimo.....	59

6.2.2. Análisis electroforético de las proteínas de secreción de <i>Leishmania mexicana</i>	61
6.3. Inmunodetección de la PTPasa de secreción de <i>Leishmania mexicana</i> por ensayos de Western-Blot con un anticuerpo monoclonal anti - PTPasa 1B de placenta humana y un anticuerpo policlonal α -Try AcP 115 de <i>Trypanosoma brucei</i>	62
6.4. Efecto de inhibidores específicos de PTPasas.....	64
7. DISCUSIÓN.....	67
8. CONCLUSION.....	75
9. PERSPECTIVAS.....	75
10. BIBLIOGRAFÍA.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de leishmaniasis en el mundo	3
Figura 2. Mapa de leishmaniasis en México	5
Figura 3. Promastigotes	8
Figura 4. Macrófago infectado con amastigotes	10
Figura 5. Ciclo de vida de Leishmania spp	12
Figura 6. <i>Lutzomyia</i> en el momento de la picadura	14
Figura 7. Lesión de LCL	18
Figura 8. Paciente con leishmaniasis cutánea difusa	20
Figura 9. Reacción de catálisis por fosfatasas	23
Figura 10. Representación esquemática de los organelos secretores del promastigote de Leishmania	26
Figura 11. Ruta propuesta de transporte de proteínas de secreción en Trypanosomatidos	28
Figura 12. Mecanismo general de los procesos de fosforilación y desfosforilación en células eucarióticas	33
Figura 13. Regulación de la Fosforilación en Tirosina	34
Figura 14. Tiempo óptimo de crecimiento de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> para la secreción de fosfatasas	56
Figura 15A. Tiempo óptimo de la actividad de fosfatasa de secreción de <i>Leishmania mexicana</i>	57
Figura 15B. Tiempo óptimo de la actividad de PTPasa de secreción de <i>Leishmania mexicana</i>	58

Figura 16. Viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> por citometría de flujo.....	59
Figura 17. Determinación de pH óptimo para la actividad de fosfatasa de secreción de <i>Leishmania mexicana</i>	60
Figura 18. Análisis en gel SDS-PAGE de los diferentes tiempos de secreción de <i>Leishmania mexicana</i> teñido con plata.....	61
Figura 19. Identificación de la PTPasa de secreción de <i>Leishmania mexicana</i> por inmunoelectrotransferencia con un anticuerpo monoclonal α - PTPasa 1B de placenta humana y un anticuerpo policlonal α -Try AcP 115 de <i>Trypanosoma brucei</i> en el medio de 5 h de secreción.....	63
Figura 20. Efecto de los inhibidores específicos de PTPasas y de serina/treonina fosfatasas en la actividad de la PTPasa de secreción de <i>Leishmania mexicana</i>	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1. Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad de fosfatasa de secreción de promastigotes metacíclicos de <i>Leishmania mexicana</i> utilizando <i>p</i> -NPP como sustrato.....	66
---	----

ABREVIATURAS

Ag	Plata
ATP	Adenosina trifosfato
D.O	Densidad óptica
FA	Fosfatasa ácida
g	Gramos
gp63	Glicoproteína de 63 kDa
IP	Ioduro de propidio
IFN-	Interferón gamma
kDa	Kilodaltones
LPG	Lipofosfoglicano
mM	Milimolar
M	Molar
ml	Mililitros
min	Minutos
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sodio
Na₃VO₄	Vanadato
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrógeno
p-NPP	para-Nitrofenilfosfato
p-NP	para-nitrofenol
PTC	Proteína tirosina cinasa
PTPasa	Proteína tirosina fosfatasa
PS/TP	Proteína serina/treonina fosfatasa
pV(phen)	Pervanadato
rpm	Revoluciones por minuto
SAP	Fosfatasa ácida de secreción
S-Acp	Fosfatasa ácida soluble
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
SHP-1	Proteína tirosina fosfatasa de células hematopoyéticas
α-PTPasa- 1β	Anti-proteína tirosina fosfatasa 1B de placenta humana
μl	Microlitros
μM	Micrometros
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
Tyr	Tirosina
Van	Vanadato
YohH	PTPasa de secreción de <i>Yersinia</i> spp

RESUMEN

La fosforilación en tirosina juega un papel importante en la regulación de diversos procesos como: crecimiento, proliferación y transformación celular. Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas) son enzimas encargadas de desfosforilar residuos de tirosina de proteínas esenciales que participan en la transducción de señales. Se sabe que algunos microorganismos infecciosos como *Mycobacterium tuberculosis* y *Salmonella* pueden secretar esta enzima al medio de cultivo. Esta enzima bacteriana es capaz de desfosforilar proteínas esenciales de la célula hospedera. En parásitos Trypanosomatidos, las PTPasas pueden ser secretadas al medio de cultivo por una invaginación especializada de la membrana plasmática, llamada bolsillo flagelar. Se ha observado que este protozoario puede sobrevivir dentro de macrófagos de su hospedero a pesar de las condiciones adversas en las que se encuentra en el fagolisosoma. Esto podría deberse a su capacidad de secretar proteínas que pueden desempeñar un papel esencial en el establecimiento de la infección, ya que han sido sugeridas como factores de virulencia en microorganismos como *Yersinia* y *Salmonella*.

En este trabajo encontramos que promastigotes de *Leishmania mexicana*, además de secretar fosfatasa ácida al medio, secretan una enzima con actividad de PTPasa. Se cultivaron promastigotes de *Leishmania mexicana* en medio RPMI modificado. Se observó la viabilidad de los parásitos por medio de citometría de flujo. Se colectó y se concentró el medio de cultivo condicionado por medio de un sistema de Amicon. Se determinó la actividad de fosfatasa

ácida y de PTPasa por medio de ensayos calorimétricos por medio de espectrofotometría. Se realizaron ensayos de Western-blot.

Siguiendo con la identificación de la enzima, se realizaron ensayos con inhibidores específicos de fosfatasas de tirosina a diferentes concentraciones, vanadato 200 μ M, molibdato 200 μ M y pervanadato 50 μ M. Y con inhibidores específicos de fosfatasas de serina/treonina a diferentes concentraciones, caliculin 5nM y ácido okadáico 1 μ M.

Encontramos que después de 7 h de incubación en el medio de cultivo RPMI modificado, los promastigotes de *Leishmania mexicana* son capaces de secretar una enzima con actividad de proteína tirosina fosfatasa, encontrándose que el tiempo óptimo de secreción es de 5 h. Además, durante el tiempo de incubación de los parásitos, se analizó su viabilidad mediante citometría de flujo, la cuál demostró que más del 95 % se encontraban viables y en óptimas condiciones, ya que no presentaban lisis debido a la incubación. Este medio fue concentrado y analizado en geles por SDS-PAGE y transferido a membranas de nitrocelulosa e incubado con un anticuerpo monoclonal, el cual reconoce el dominio catalítico de la PTPasa de eucariontes superiores, y con un anticuerpo policlonal, el cual reconoce el dominio catalítico de la PTPasa de *Trypanosoma brucei*, donde se vio que ambos anticuerpos reconocen una molécula entre 50 y 60 kDa únicamente en los cultivos del parásito.

El patrón de inhibición con inhibidores de proteína tirosina fosfatasa fue diferente al patrón de inhibición con los de serina treonina fosfatasa, ya que con

los primeros inhibidores se observó una mayor inhibición de la actividad de la PTPasa en contraste con la casi nula inhibición que se observó con los inhibidores de serina/treonina.

Este trabajo nos permite sugerir que promastigotes de *Leishmania mexicana* poseen una PTPasa de secreción, la cual podría estar participando en eventos tempranos del proceso de infección.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Epidemiología de la Leishmaniasis

La leishmaniasis se refiere a un espectro de enfermedades parasitarias zoonóticas que son provocadas por un protozooario perteneciente al género *Leishmania*. Este es un parásito intracelular obligado del hombre y de diversos mamíferos, que infecta células de su hospedero. La transmisión del parásito al hombre ocurre a través de la picadura de un insecto díptero hematófago del género *Lutzomyia* en el nuevo mundo y *Phlebotomus* en el viejo mundo, infectado con parásitos del género *Leishmania* que inocula a un hospedero. Los reservorios son animales vertebrados. La mosca hembra, requiere sangre para el desarrollo de sus huevos y se infecta al ingerir sangre con macrófagos infectados de hospederos vertebrados. Los parásitos se encuentran principalmente en células del sistema fagocítico mononuclear en la piel. También pueden infectar otras células de la piel como las células de Langerhans y los queratinocitos en la epidermis, fibroblastos y neutrófilos en la dermis. Esta enfermedad se caracteriza por comprometer la piel, mucosas y vísceras, según la especie de *Leishmania* y la respuesta inmune del huésped (1, 2, 3).

La infección empieza con la inoculación de la *Leishmania* en la piel por la picadura del mosquito transmisor. Las células del sistema fagocítico mononuclear (macrófagos) combaten al parásito mediante diversos receptores que reconocen principalmente dos moléculas que cubren su superficie: LPG

(Lipofosfoglicano) y gp63 (Glicoproteína de 63 kDa). Dentro del macrófago, el parásito también utiliza el LPG y la gp63 para inhibir los mecanismos leishmanicidas de la célula ^(4, 5).

La leishmaniasis es una enfermedad de prevalencia alta en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo, tales como el este y sureste de Asia, Medio Oriente, norte y este de África, el sur de Europa (cuena del Mediterráneo) y América Central y Sudamérica ⁽⁶⁾ (Figura 1). La leishmaniasis es endémica en 88 países de áreas tropicales, 72 de los cuales están en vías de desarrollo. En el continente Americano se encuentra en 24 países aproximadamente, se extiende desde el sur de Estados Unidos (Texas) hasta el norte de Argentina ^(3, 7). Su presencia depende de la existencia de reservorios, de vectores y de la susceptibilidad del hospedero humano. Además se esta transformando en una enfermedad reemergente importante a nivel mundial, debido al incremento de pacientes coinfectados con VIH que cursan con inmunodepresión ⁽⁸⁾.

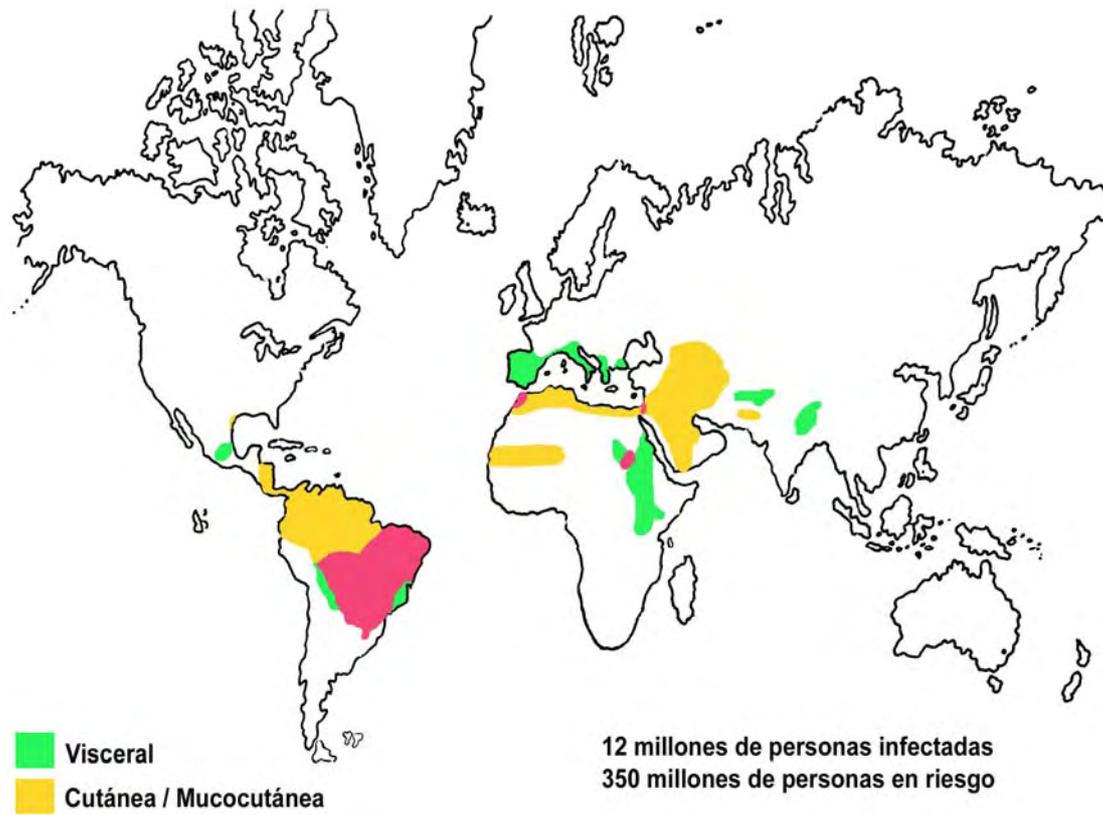


Figura 1. Mapa de leishmaniasis en el mundo (Fuente: <http://usuarios.lycos.es/archivodeprotocolo/mapamundi.jpg> en el Mundo).

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la incidencia anual es de 1.5 millones para leishmaniasis cutánea y la prevalencia es de 12 millones de personas en el mundo, con 1.5 a 2 millones de nuevos casos cada año ⁽⁹⁾. Existen 350 millones de personas expuestas al riesgo de infección ⁽⁶⁾. La distribución geográfica de la leishmaniasis está limitada por la distribución del vector. El número de casos de leishmaniasis está en aumento debido principalmente a los cambios del medio ambiente generados por el hombre, lo que aumenta la exposición humana al vector ⁽⁶⁾.

En México, la región más afectada es el sureste, aunque se distribuye al menos en 17 entidades, desde Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas en el norte, hasta Campeche, Yucatan y Quintana Roo en el sur. Se estima que anualmente se presentan 400 nuevos casos de leishmaniasis ⁽⁸⁾ (Figura 2).



Figura 2. Mapa de leishmaniasis en México.
(En: Becker I, et al, 2006).

1. 2. Agente Etiológico

El agente etiológico de la leishmaniasis es un protozoario del género *Leishmania*.

1. 2. 1. Clasificación Taxonómica

En la actualidad, el género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, según su desarrollo en el intestino de los vectores: *Leishmania*, en el cual el desarrollo del parásito está restringido a la porción anterior del tracto alimentario del vector; y *Viannia*, en el cual el desarrollo del parásito se desarrolla en el intestino medio y posterior del vector ⁽¹⁰⁾.

Las distintas especies del género *Leishmania* no se pueden distinguir morfológicamente. Para llegar a la clasificación de las especies del género *Leishmania* se deben considerar ciertas características: a) biológicas: tipo de desarrollo en el vector, crecimiento en los medios de cultivo, desarrollo en el hospedero vertebrado; b) bioquímicas: diferencias en sus isoenzimas, y en el ADN del núcleo y del cinetoplasto; c) inmunológicas: reactividad del parásito con anticuerpos monoclonales y serotipificación del factor de excreción y taxonomía numérica para definir mejor la evolución molecular y la relación filogenética de los parásitos del género *Leishmania* ⁽¹¹⁾.

Clasificación Taxonómica basada en Levine et al, 1980

Reino:	Protista (Haeckel, 1986).
Subreino:	Protozoa (Golfuss, 1817).
Phylum:	Sarcomastigophora (Honigberg and Balamuth, 1963)
Subphylum:	Mastigophora (Deising, 1866).
Clase:	Zoomastigophora (Calkins, 1909).
Orden:	Kinetoplastida (Honigberg, 1963; Vickerman, 1976).
Suborden:	Trypanosomatina (Kent, 1880).
Familia:	Trypanosomatidae (Doflein, 1901; Grobber, 1905).
Género:	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903).

1. 2. 2 Morfología

Leishmania presenta principalmente dos formas de desarrollo: los promastigotes y amastigotes.

1. 2. 2. 1. Promastigotes

Los promastigotes son flagelados y se desarrollan en el tracto digestivo del insecto, miden de 12 a 20 μm , tienen un núcleo central y un flagelo anteronuclear que nace del cuerpo basal situado por delante del cinetoplasto (Figura 3). En el intestino del mosquito entre las 12 y 18 horas, el parásito inicia

un proceso de diferenciación, en el cual los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, que morfológicamente se caracterizan por ser cortos, ovoides y tener ligera movilidad, y que se adhieren al epitelio del intestino medio del mosquito mediante la molécula de lipofosfoglicano (LPG). Al séptimo día, los promastigotes procíclicos migran a la región del cardias donde se transforman (metacicloogénesis) en promastigotes metacíclicos, que se caracterizan por ser altamente activos. Durante esta metacicloogénesis, las moléculas de LPG se duplican y experimentan cambios en las cadenas laterales de los disacáridos, lo cual permite que el parásito se desprenda del epitelio intestinal y migre a la faringe y probóscide del mosquito ⁽⁸⁾.

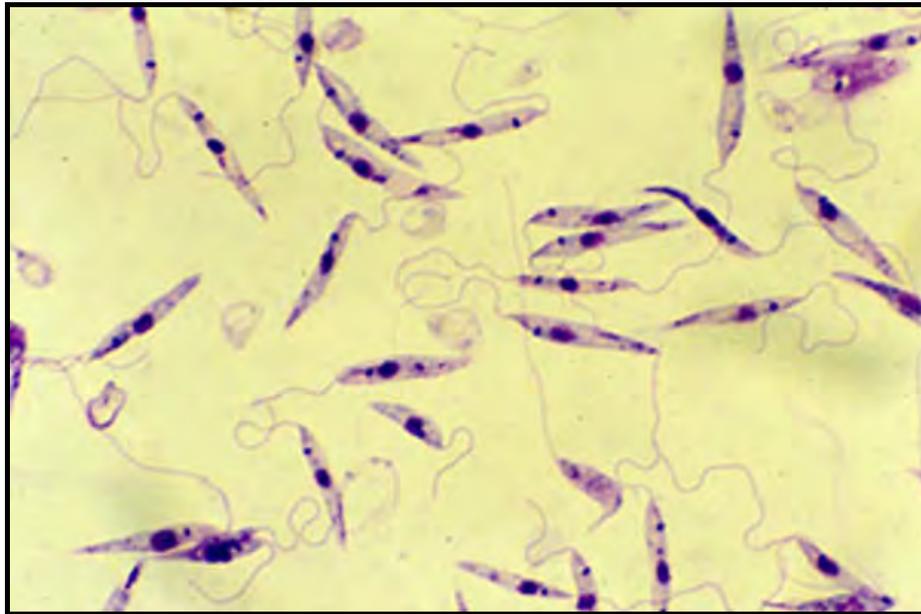


Figura 3. Promastigotes.

(Fuente: www.vet.uga.edu/VPP/nsep/Brazil2002/leishmania/images/lip_g1.jpg)

1. 2. 2. 2. Amastigotes

Los amastigotes son aflagelados, redondeados, miden de 2.5 a 3.5 μm de diámetro, tienen un núcleo grande y excéntrico y un cinetoplasto que consta de blefaroplasto y cuerpo basal, de donde nace un rizoplasto que se convierte en flagelo en el promastigote ⁽⁸⁾ (Figura 4). Los vertebrados se infectan por la picadura de la *Lutzomyia* transmitiendo promastigotes metacíclicos. Los promastigotes son fagocitados por macrófagos de la piel, células de Langerhans epidérmicas o monocitos circundantes. Una vez dentro de los fagolisosomas, los promastigotes metacíclicos se diferencian en amastigotes, se reabsorbe su flagelo y proliferan intensamente por fisión binaria, provocando la lisis de la célula. Los amastigotes liberados infectan células vecinas. También pueden circular por líquido tisular ⁽⁸⁾.

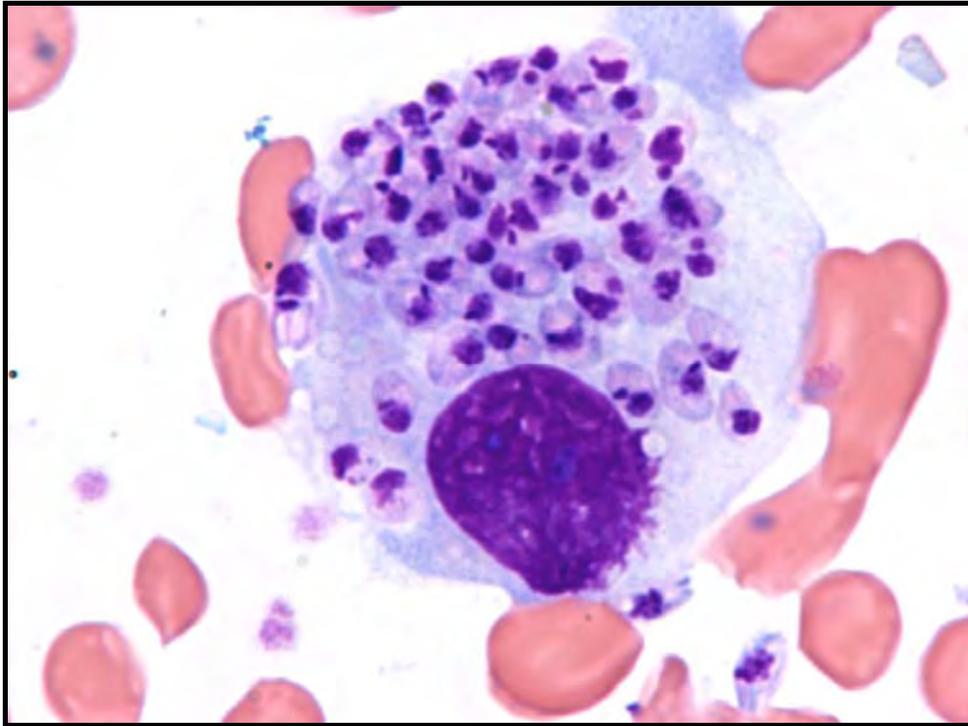


Figura 4. Macrófago infectado con amastigotes.
(Fuente: Laboratorio de Inmunoparasitología, Departamento de Medicina Experimental,
Facultad de Medicina, UNAM).

1. 2. 3. Ciclo de vida

Leishmania requiere de un vector y un hospedero vertebrado en su ciclo de vida.

Como se muestra en la imagen 5: El insecto hembra se infecta cuando pica al hospedero vertebrado e ingiere sangre con el parásito y pica e inocular en la piel de otro hospedero vertebrado susceptible, los parásitos en forma de promastigotes metacíclicos, los cuales se localizaban en las glándulas salivales de la probóscide de la mosca hembra (1). Los promastigotes metacíclicos son fagocitados por los macrófagos (2). Los parásitos pierden el flagelo y se transforman en amastigotes los cuales se dividen por fisión binaria, esto les toma alrededor de 2 a 5 días, dependiendo de la especie de *Leishmania* (3). Los amastigotes se multiplican dentro de vacuolas parasitóforas denominados fagosomas-lisosomas, las cuales varían de tamaño y contienen de 1 a 10 amastigotes, esto provoca que la célula hospedera estalle, liberándose los parásitos e infecten a otras células fagocíticas (4). El insecto pica al hospedero infectado e ingiere fagocitos infectados con amastigotes o amastigotes libres (5-6). Dentro del vector los parásitos se transforman en promastigotes procíclicos que se anclan en el intestino medio y comienzan a dividirse durante el tiempo que dura la digestión de la sangre, que es de 5 a 7 días (7-8). Los parásitos se diferencian en promastigotes metacíclicos (altamente infectivos) ya que presentan alteraciones en algunas de las moléculas de superficie y son incapaces de unirse al intestino medio, por lo que migran hacia la probóscide

donde vuelven a ser inoculados o regurgitados por el vector hacia un hospedero vertebrado (13, 14, 15).

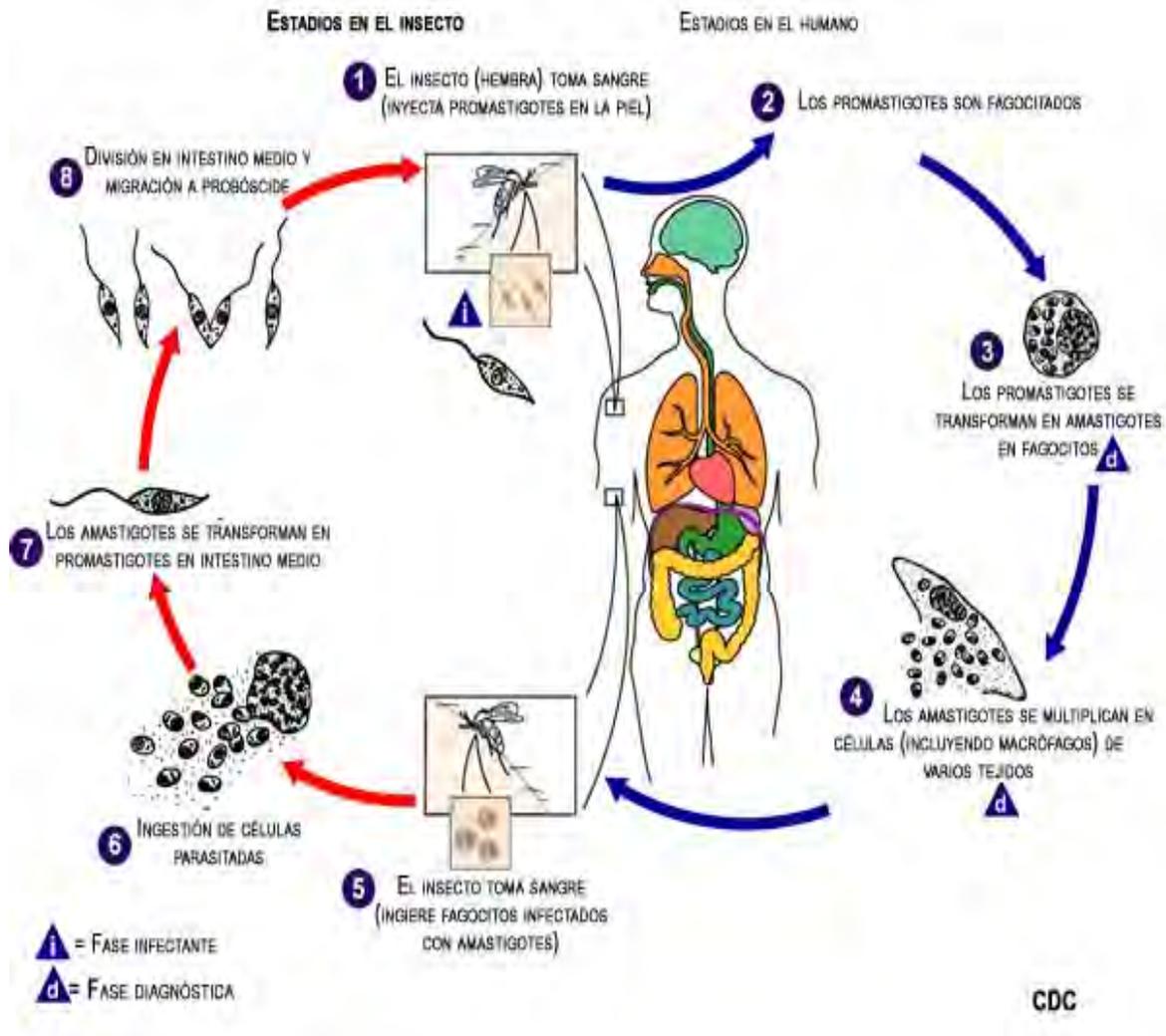


Figura 5. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

(Fuente:

www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/images/Life%20Cycle.gif).

1. 3. El Vector

La *Leishmania* es transmitida por pequeños dípteros pilosos del género *Phlebotomus* en Europa, Asia y África y por el género *Lutzomyia* en América. Los vectores presentan metamorfosis completa y por lo tanto, pasan por el estadio de huevo, varias etapas de larva, pupa y finalmente de adulto. Las larvas son terrícolas por lo que viven en el suelo a la intemperie, con abundancia de materiales orgánicos en descomposición ⁽¹⁶⁾. Tienen de 2 a 3 mm de longitud, con un cuerpo muy piloso y alas erectas en forma de “V” ⁽¹⁷⁾.

Lutzomyia es más activa durante el crepúsculo y desaparece progresivamente hacia la noche. Su forma de vuelo es muy particular, a manera de brincos o saltos y mantiene un vuelo bajo y silencioso. El área de su vuelo puede abarcar hasta 200 m a la redonda de donde se cría; sin embargo, puede ser transportado por el viento a distancias mayores ⁽¹⁷⁾.

Las hembras son las únicas hematófagas (Imagen 6) y se infectan al ingerir sangre de un hospedero parasitado. En el vector se lleva a cabo una parte del ciclo de vida del parásito donde pasa por la metaciclogénesis y adquiere la capacidad infectiva. El vector se distribuye por todo el país pero solo son importantes en las áreas endémicas en leishmaniasis. Su hábitat se encuentra en lugares húmedos de bastante vegetación y áridos con poca o sin vegetación. Cuando el ser humano vive en zonas con estas características o ingresa en estas zonas por motivos de trabajo, turismo, etc., corre el riesgo de ser picado por el vector y adquirir leishmaniasis ⁽¹⁸⁾.



Figura 6. *Lutzomyia* en el momento de la picadura. (Fuente: www.periodicoelpulso.com/images/jul03/breves/brev-05.jpg)

1. 3. 1. El Reservorio

En América existe una variedad de animales silvestres y domésticos que han sido registrados como reservorios de las especies del género *Leishmania*. Es evidente la relación ecológica estrecha que existe entre los vectores de un parásito y su reservorio ⁽¹⁷⁾.

Se ha encontrado infectado naturalmente al perro doméstico (*Canis familiaris*), y una gran variedad de roedores, que incluye a la rata (*Rattus rattus*). En algunos estudios se ha observado, que los parásitos aislados en el hombre y en la rata pertenecen a la misma especie. En la selva, aún no se ha podido determinar los reservorios ^(1, 3).

En Brasil se ha encontrado como reservorios de *L. (L) amazonensis* a los marsupiales y principalmente a los roedores *Proechymis* y *Oryzomys*; para *L.*

(V) *guyanensis*, se ha registrado al perezoso (*Choloepus didactylus*), tamandúa (Tamandúa tetradactyla), marsupiales y roedores; y de *L. (V) brasiliensis*, se han registrado a animales domésticos como perros, equinos, mulas y roedores domésticos ^(19, 20).

1. 3. 2. Transmisión

La transmisión de la *Leishmania* por la picadura del vector, además de ser selvática también puede ser intradomiciliaria o peridoméstica, ya que puede haber reservorios infectados en este entorno ecológico ⁽⁸⁾. Es posible evitar la transmisión doméstica mediante el uso de mosquiteros y fumigación. El control del vector o de los reservorios requiere del uso de medidas costosas y de buena infraestructura; además, el control de la leishmaniasis en humanos depende de la detección temprana y del tratamiento oportuno. ⁽⁸⁾.

Todas las especies de *Lutzomyia* pueden ser potencialmente vectores de la *Leishmania* y dependerán de sus preferencias alimenticias. Se cree que un 10% de las 600 especies de *Lutzomyia* conocidas están involucradas en la transmisión de la leishmaniasis humana ⁽¹⁷⁾.

Las especies que pican al hombre para alimentarse son las que pueden transmitir la enfermedad, mientras que las especies que nunca o solo ocasionalmente pican al hombre pueden ser muy importantes en el mantenimiento de la Leishmaniasis en los reservorios ⁽²¹⁾.

La mayoría de las especies son silvestres y solo atacan a los hombres que penetran en su hábitat. Existen algunas especies que muestran una antropofilia acentuada y se adaptan al domicilio y peridomicilio humano.

1. 4. Formas Clínicas de la Leishmaniasis cutánea

El género *Leishmania* abarca un número creciente de especies, actualmente 30, de las cuales aproximadamente 20 causan enfermedades en seres humanos ⁽²²⁾. El complejo *Leishmania mexicana* se encuentra en el continente Americano junto con los complejos de *L. (Viannia) braziliensis* y *L. donovani chagasi*. El complejo *L. mexicana* involucra a cuatro especies (*L. mexicana mexicana*, *L. mexicana venezuelensis*, *L. mexicana amazonensis*, y *L. mexicana pifanoi*), su distribución ha sido analizada extensivamente en Centro y Sudamérica ⁽²³⁾. Aún no ha sido considerado el dato de la distribución de las especies que existen en México, aunque la leishmaniasis cutánea es altamente endémica, tiene amplia distribución geográfica y un amplio espectro de manifestaciones clínicas ⁽²⁴⁾.

Las principales formas clínicas de leishmaniasis cutánea en humanos son: Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y Leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

1. 4. 1. Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)

En México la enfermedad es conocida como úlcera del chiclero debido a que fue encontrada en trabajadores que extraían la goma del árbol del chicle y con frecuencia se observaba que afectaba el pabellón auricular ⁽¹⁶⁾. Esta forma clínica puede ser causada por: *Leishmania mexicana* en México y *L. amazonensis* en Sudamérica, etc. ⁽²²⁾.

La Leishmaniasis cutánea localizada ocurre entre dos y cuatro semanas después de la picadura del vector. En la lesión aparece primero una pápula asintomática, que se agranda y enrojece gradualmente, transformándose en una úlcera de bordes indurados y de coloración violácea en el sitio de la picadura, pero sin producir calor o dolor (Figura 7). Las úlceras pueden ser únicas o múltiples, redondeadas, de fondo limpio o con tejido de granulación, pero indoloras ⁽⁸⁾. La curación de la lesión implica la migración de los leucocitos, que aíslan el área infectada que conduce a la necrosis de los tejidos infectados, y la formación de un granuloma curativo en la base de la lesión ⁽²²⁾. La curación generalmente es espontánea, en tiempo que va de 6 meses hasta 2 años según la especie del parásito y el sitio de la lesión ^(8, 22). El tamaño de la lesión puede variar entre algunos milímetros a varios centímetros de diámetro.



Figura 7. Lesión de LCL.
(Fuente: www.baylor.edu/~Charles_Kemp/hand.jpg)

1. 4. 2. Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)

En México esta forma clínica es también producida por *Leishmania mexicana*. Es generalmente una manifestación de la infección con los parásitos que causan normalmente LCL, asociada a una anergia específica o a una carencia de respuesta inmunológica celular específica hacia antígenos de *Leishmania*, permitiendo la diseminación incontrolada del parásito, con el desarrollo de lesiones nodulares en toda la piel (Figura 8), con excepción del cuero cabelludo^(8, 22). El parásito se disemina por el líquido tisular, por la linfa o por vía sanguínea. Los pacientes presentan invasión de mucosas orofaríngea y nasofaríngea con nódulos dolorosos que pueden llegar a obstruir las vías aéreas e impedir la deglución en los estadios finales del padecimiento; además, tienen lesiones en los genitales externos y en las plantas, la piel se adelgaza y se vuelve muy frágil, por lo que frecuentemente se úlceras y se infecta secundariamente con bacterias. Las lesiones presentan escasos datos de una respuesta inmune celular efectiva: en toda la dermis se encuentran macrófagos altamente parasitados y pocos linfocitos. Se caracterizan por tener una respuesta tipo Th2, debido a que sus linfocitos CD4⁺ secretan citocinas supresoras de macrófagos como son IL-10, TGF- β e IL-4, que inhiben los mecanismos leishmanicidas de los macrófagos, lo cual permite la multiplicación incontrolada del parásito dentro de las vacuolas parasitoforas, además bloquean la producción de las citocinas IFN- γ , y TNF- α . Los pacientes cursan con una enfermedad progresiva que generalmente tiene un desenlace mortal⁽⁸⁾. Esta forma clínica se ha reportado en Oaxaca, Campeche, Tabasco, Veracruz, Michoacán, Tamaulipas y Coahuila⁽²⁵⁾.



Figura 8. Paciente con leishmaniasis cutánea difusa. En la foto se observan las lesiones características en todo el tegumento.

(Fuente: fotografía tomada en el Laboratorio de Inmunoparasitología, Depto. De Medicina Experimental, UNAM, Hospital General de Mexico).

1. 5. Moléculas presentes en promastigotes de *Leishmania*

La superficie de los promastigotes de *Leishmania* está cubierta por glicoproteínas, donde la manosa es el componente mas abundante de estas moléculas, allí se encuentran presente varias clases de fosfatidilinositol o moléculas de anclaje tales como: lipofosfoglicano (LPG), un pequeño grupo de glicoinositolfosfolípidos (GIPLS), proteínas con GPI como la gp63 y proteofosfoglicanos (PPGs), los cuales constituyen otro mecanismo de defensa contra el estallido respiratorio ^(4, 26, 27). Las moléculas ubicadas en la superficie del parásito denominadas determinantes invasivos/evasivos, son cruciales para la infección pero no producen patología en el huésped. Las moléculas relacionadas con la virulencia de *Leishmania* son la gp63 y LPG. La gp63 ayuda a los promastigotes a evadir la lisis por complemento ⁽⁵⁾, también ayuda junto con la LPG, a que las células del sistema fagocítico mononuclear combatan al parásito mediante diversos receptores presentes en su superficie, como CR1 y CR3 (receptores de complemento) y receptores de manosa-fucosa que reconocen la manosa presente en el LPG y que participan en la fagocitosis de *Leishmania* permitiendo su entrada a la célula ^(28, 29). LPG y gp63, pueden ser importantes para la sobrevivencia del parásito dentro del fagolisosoma ^(28, 29, 30).

1. 5. 1. Lipofosfoglicano

La macromolécula más abundante en la superficie del promastigote de *Leishmania* es el Lipofosfoglicano (LPG). Esta molécula está anclada a la membrana mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) altamente conservado y compuesto por una larga columna de dominios repetitivos de fosfosacáridos específicos para cada especie de *Leishmania* que infectan humanos. Se localiza cubriendo la superficie entera del parásito incluyendo el flagelo formando un denso glicocálix ^(31, 32, 33).

1. 5. 2. Glicoproteína gp63

La glicoproteína (gp63), conocida como proteasa de superficie, es especialmente abundante en promastigotes, (5 X 10⁵ moléculas por célula representa el 1% de todas las proteínas celulares) ⁽³⁴⁾. Es liberada por estas formas del parásito hacia el exterior quedando anclada a la membrana celular mediante una región que contiene glicosilfosfatidilinositol (GPI) ⁽³⁵⁾; ha mostrado ser proteolíticamente activa sobre diferentes sustratos y puede estar incluida en la degradación de diferentes macromoléculas del hospedero. Es una metaloproteasa dependiente de zinc de 63 kDa de peso molecular y puede proteger al promastigote de las enzimas hidrolíticas en el intestino del vector y de la actividad microbicida del macrófago ⁽³⁵⁾.

1. 5. 3. Fosfatasas ácidas

Las fosfatasas ácidas son enzimas que catalizan la hidrólisis de fosfomonoéster a un pH ácido (Figura 9) ⁽³⁶⁾.

Las fosfatasas ácidas han sido identificadas en parásitos protozoarios de la familia Trypanosomatidae. Se han descrito dos tipos de fosfatasas ácidas: las asociadas a membrana y las secretadas al medio de cultivo (SAP) ⁽³⁶⁾.

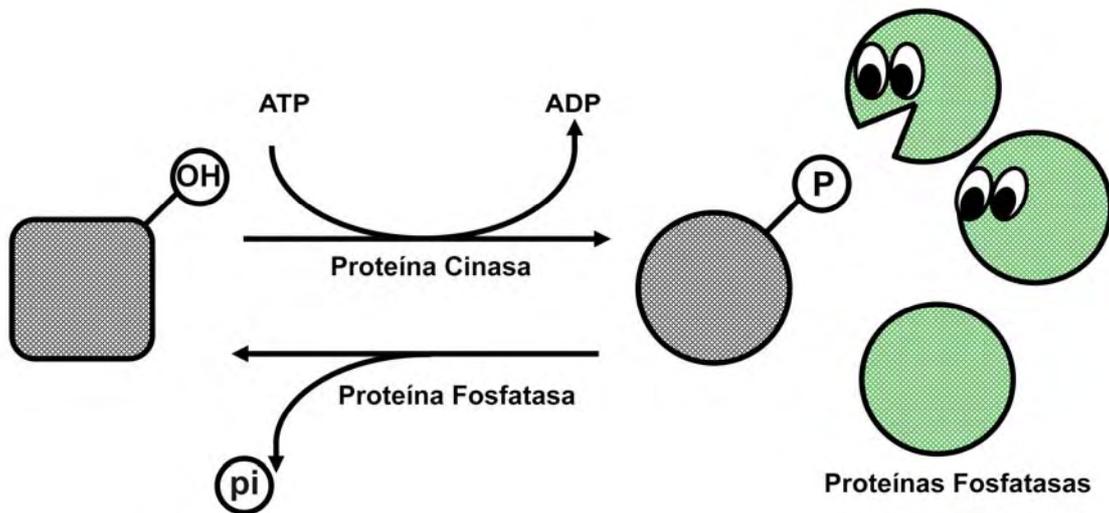


Figura 9. Reacción de catálisis por fosfatasas.

1. 5. 4. Vías de secreción en promastigotes de *Leishmania*

Los parásitos de *Leishmania* infectan diversos tejidos o tipos celulares en su hospedero mamífero. La supervivencia del parásito dentro de estos ambientes requiere del transporte superficial regulado de glicoproteínas y de glicolípidos altamente abundantes en la superficie, así como de una gran cantidad de otros transportadores menos abundantes de la membrana plasmática como las enzimas superficiales y los receptores que se liberan a la superficie de la célula por una invaginación especializada en la membrana plasmática, llamada bolsillo flagelar (“pocket flagelar”) ⁽³⁸⁾.

Leishmania pasa a través de un par de etapas distintas de desarrollo durante su ciclo de vida en el insecto y en el mamífero hospedero. Las formas características en estas etapas de desarrollo se llevan a cabo por un arsenal de microtubulos que son la base de la membrana plasmática. Un solo flagelo emerge de una invaginación profunda en la membrana plasmática (bolsillo flagelar), que es posterior al núcleo en los promastigotes. En la etapa de desarrollo de amastigote, el flagelo no emerge del bolsillo flagelar, el cual es un compartimiento semi-aislado que es accesible a una gama de proteínas, incluyendo complejos macromoleculares muy grandes ⁽³⁹⁾.

La mayoría de las proteínas destinadas a la superficie celular o a los lisosomas son ensambladas inicialmente en el retículo endoplásmico (RE). El RE es también el sitio de síntesis de la mayoría de los fosfolípidos y glicolípidos de la membrana ⁽⁴⁰⁾.

La mayoría de los organelos involucrados en la ruta de secreción están organizados alrededor del “pocket flagelar” (fp) de *Leishmania* (Imagen 10). El RE comprende la envoltura nuclear (NE) y el retículo cortical (ER) que está conectado al retículo endoplásmico especializado (tER) próximo al aparato de Golgi (G) y al “pocket flagelar”. Los endosomas tardíos (EE) representados como una red compleja de vesícula-tubulo, están también localizados cerca del “pocket flagelar”. En los promastigotes de *Leishmania*, una “población” de endosomas tardíos (MVBs), se forma cerca al aparato de Golgi y se fusionan con los lisosomas MVT (L-MVT), los cuales se extienden a lo largo del eje anterior posterior de la célula ⁽³⁸⁾.

membrana plasmática se pueden dirigir al cuerpo de la célula o al flagelo. Las proteínas lisosomales y las proteínas de la membrana del ER destinadas para la degradación se pueden transportar a los lisosomas por una vía interna y directa del aparato de Golgi (1, 2 y 3) o pueden ser liberadas al bolsillo flagelar para internalizarlas en endosomas tempranos. Ambas rutas están implicadas en la internalización de las proteínas de membrana en el lumen de los endosomas tardíos (MVBs) como vesículas microinvaginadas (2 y 6). Las proteínas lisosomales residentes y los productos de degradación de los lisosomas pueden ser exocitados por varias vías reversibles (3, 6 y 7; líneas punteadas), o por la fusión directa con la membrana del bolsillo flagelar. Algunas proteínas superficiales se reciclan a través de los endosomas y vuelven a la membrana del bolsillo flagelar (4 y 5) ⁽³⁸⁾.

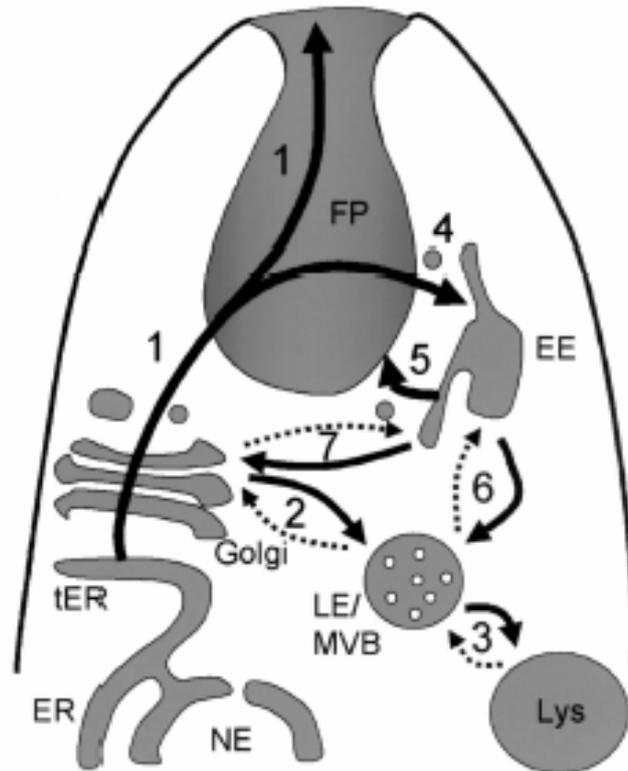


Figura 11. Ruta de transporte de proteínas de secreción en Trypanosomatidos: *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Crithidia*. Las líneas sólidas indican las rutas que son apoyadas por estudios bioquímicos o ultra estructurales. Las líneas punteadas son especulativas pero se basan en los caminos que se han definido en otros eucariontes (En: Mc Conville, M. J., et. al., 2002)

1. 5. 5. Productos de excreción/secreción en *Leishmania*

Leishmania puede sobrevivir en macrófagos de su hospedero a pesar de las condiciones adversas en las que se encuentran dentro del fagolisosoma. Esto podría reflejarse en su capacidad de secretar proteínas que pueden desempeñar un papel esencial en el establecimiento de la infección y servir como blanco para la inmunorrespuesta celular. En las últimas décadas, se han identificado varias moléculas implicadas en la biología del parásito de la *Leishmania*. Se han estudiado moléculas secretadas ó excretadas por patógenos intracelulares tales como *Mycobacterium tuberculosis* y *Toxoplasma*

gondii. Estas moléculas son antígenos altamente inmunogénicos y protectores usados en vacunas. ⁽⁴¹⁾. De manera semejante, en estudios realizados, se ha observado que ratones BALB/c infectados con *L. major* inducen una fuerte protección al inocular proteínas solubles del cultivo de promastigotes de *L. major*. Pero son pocas las proteínas que han sido caracterizadas completamente como moléculas de excreción/secreción (ES). Otros estudios sugieren que antígenos de excreción/secreción de *Leishmania* pueden generar péptidos que se pueden acoplar a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I o clase II. En adición de moléculas liberadas en la vacuola del fagolisosoma de *Leishmania*, se puede también derivar la maquinaria de presentación asociada a la fagocitosis mediada del retículo endoplásmico, que podría representar una evasión de la respuesta inmune para evitar una inmunorespuesta celular. Las proteínas del parásito podrían desempeñar papeles cruciales en la biología o la virulencia de *Leishmania*, los cuales están muy bien adaptados para sobrevivir en las duras condiciones del compartimiento del fagolisosoma del macrófago hospedero. Las proteínas ES de parásitos muy probablemente pueden generar péptidos para la presentación de células CD8⁺ y servir como blanco para la respuesta inmune citotóxica ⁽⁴²⁾. Recientemente se demostró que las inmunorespuestas citotóxicas específicas son desarrolladas por los individuos que viven en áreas de transmisión de *L. major* ⁽⁴³⁾, y juegan un papel crucial en la resistencia a la reinfección ⁽⁴⁴⁾.

1. 6. Fosfatasas ácidas secretadas por *Leishmania*

Son varias las especies del género *Leishmania* que secretan fosfatasas ácidas al medio, en la forma de promastigote, ésto lo hacen a través del bolsillo flagelar, el cual es su principal órgano secretor ⁽³⁶⁾, estas especies son: *Leishmania mexicana*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. amazonensis*; a excepción de *L. major*.

Las SAPs son codificadas por múltiples genes, sus secuencias son muy parecidas entre las diferentes especies de *Leishmania*, lo cual sugiere que pudiera jugar un papel esencial en la supervivencia del parásito ⁽⁴⁵⁾.

Sin embargo en la forma de amastigote, las SAPs pueden o no ser expresadas, esto depende de la especie de ⁽⁴⁶⁾.

En 1981, Gottlieb y Dwyer reportaron la presencia de una alta actividad de fosfatasa ácida distribuida sobre toda la superficie externa y en vesículas intracelulares de promastigotes de *Leishmania donovani*. La existencia de concentraciones inusualmente altas de actividad de fosfatasa ácida en promastigotes de *L. donovani* fue confirmada después por Glew y colaboradores en 1982. En el mismo estudio también fue demostrado que los promastigotes contienen relativamente bajos niveles de otras hidrolasas ácidas. La actividad de fosfatasa fue extraída de la membrana plasmática y purificada parcialmente, encontrándose un pH óptimo para la actividad de fosfatasa en

5.5, siendo resistente al tartato y capaz de catalizar la desfosforilación del *p*-nitrofenilfosfato y de una variedad de otros fosfomonoesteres ⁽⁴⁷⁾.

También se encontró que los promastigotes de *Leishmania donovani* producen una fosfatasa ácida soluble (S-Acp) la cual es rápidamente sintetizada y secretada al medio de cultivo. Esta enzima es detectada a los 20 minutos de haberse sintetizado. Este es el primer estudio de una vía de secreción en un protozooario. Además, la energía invertida en la síntesis rápida y secreción de la fosfatasa ácida soluble, sugiere que esta enzima puede desempeñar un papel importante en el establecimiento y/o en el mantenimiento de la relación del hospedero-parásito ⁽⁴⁸⁾.

Hasta la fecha, numerosos estudios indican que promastigotes de *Leishmania* sp. secretan macromoléculas durante su crecimiento *in vitro*. Aunque su papel fisiológico se desconoce, el potencial de esta fosfatasa ácida extracelular se sugiere que puede actuar en sitios lejanos al parásito y contribuir a la nutrición del parásito, a su resistencia a los factores potencialmente perjudiciales del hospedero, y a su patogenicidad ⁽⁴⁹⁾.

1. 7. Fosforilación y desfosforilación

La fosforilación de proteínas es un evento importante en diversas funciones celulares. Esta se presenta en residuos serina, treonina, histidina y/o tirosina. Se lleva a cabo por las proteínas tirosina cinasas (PTCs), las cuales son enzimas responsables de la fosforilación de proteínas en residuos tirosina, catalizando la transferencia de un grupo fosfato del ATP a un residuo de aminoácido específico del sustrato ^(50, 51). La fosforilación en residuos tirosina juega un papel importante en la regulación de diversos procesos tales como crecimiento, proliferación, diferenciación, metabolismo, transformación y migración celular dentro de las células (Fig. 12).

La desfosforilación de proteínas es un importante mecanismo de modulación de las vías de señalización, es realizada por las proteínas fosfatasas (PTPasas) ⁽³⁶⁾. Es así como el nivel de proteínas fosforiladas dentro de las células es modulado por el balance PTPasas y PTCs.

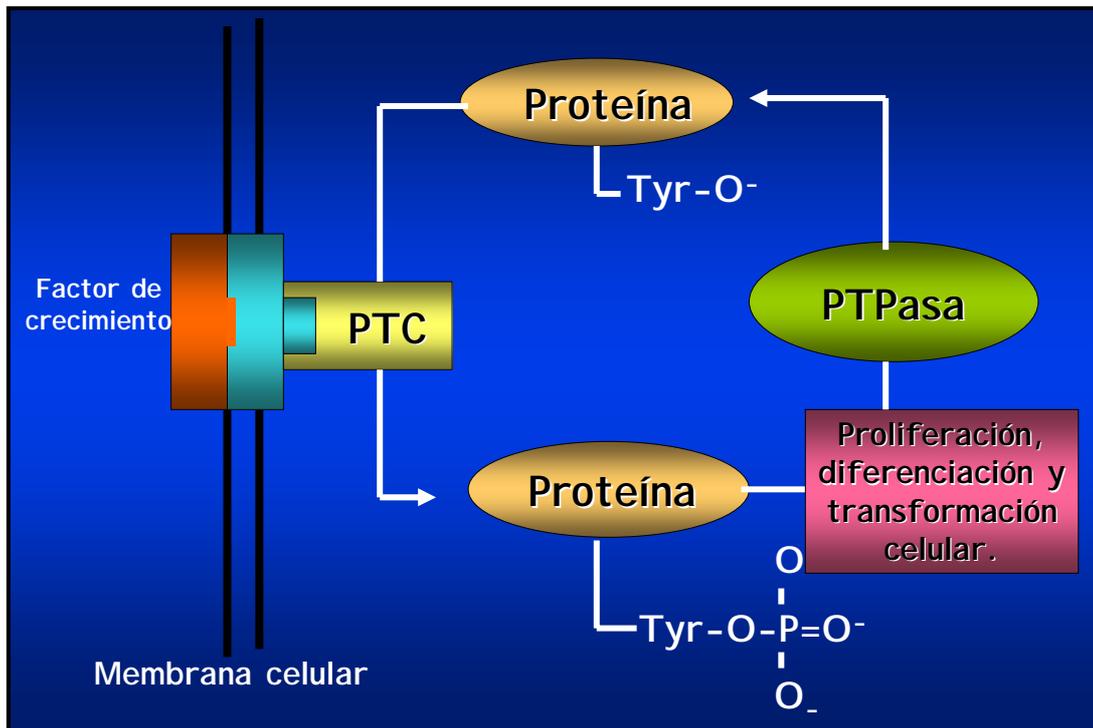


Figura 12. Mecanismo general de los procesos de fosforilación y desfosforilación en células eucariontes. (Fuente: www.scielo.cl/fbpe/img/rmc/v128n10/img18.gif)

1. 8. Proteínas tirosina fosfatasas

Las PTPasas son responsables de la desfosforilación de proteínas en residuos tirosina, hidrolizando el fosfato de un residuo fosforilado.

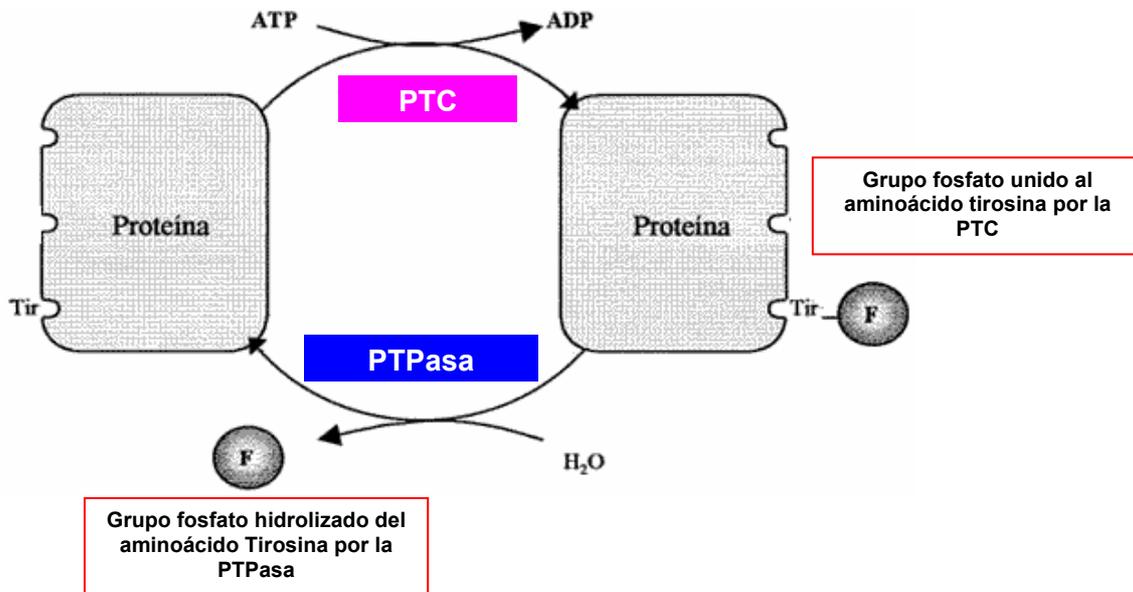


Figura 13. Regulación de la Fosforilación en Tirosina.

Se ha demostrado que las PTPasas y las PTCs están involucradas en la sobrevivencia, internalización y replicación de los patógenos, afectando la fosforilación de moléculas en las células hospedadoras e interfiriendo en muchas vías de transducción de señales ⁽⁵²⁾.

La superfamilia de las PTPasas funciona de manera coordinada con las PTCs para controlar las rutas de señalización que son la base de un amplio espectro de procesos fisiológicos fundamentales ⁽⁵¹⁾.

Todas las PTPasas poseen un dominio catalítico común que consta de aproximadamente de 250 aminoácidos que contienen 21 residuos constantes, muchos de los cuales, se ha demostrado, que son esenciales para la actividad de fosfatasa. En el dominio catalítico se encuentra una secuencia conservada constituida por los siguientes aminoácidos (I/V) H C X A G X X R (S/T) G (las letras indican un aminoácido específico y la X cualquier aminoácido) con una estructura terciaria similar. La cisteína en esta secuencia es requerida para la actividad catalítica y está involucrada en la formación del intermediario de reacción que es la fosforilenzima ⁽⁵³⁾.

Estas fosfatasas pueden ser caracterizadas por su sensibilidad a inhibidores específicos de PTPasas como: el vanadato, molibdato, pervanadato, y pueden presentar insensibilidad a inhibidores específicos de serina/treonina fosfatasas como la caliculina y al ácido okadaíco. Una característica esencial es la propiedad de hidrolizar el *p*-nitrofenilfosfato y la pérdida total de la actividad por mutación de la cisteína del sitio activo ⁽⁵³⁾.

1. 9. Inhibidores de PTPasas

Se sabe que las PTPasas son inhibidas por concentraciones micromolares de molibdato de amonio, ortovanadato de sodio y tungstato de sodio, asimismo son activadas por EDTA. Además estos inhibidores son incapaces de inhibir proteínas fosfatasa de Ser/Thr (PS/TP), las cuales son inhibidas por el ácido okadáico, un inhibidor específico de PS/TP ^(54, 55).

1. 9. 1. Vanadato

El vanadato (ortovanadato de sodio, Na_3VO_4) es un potente inhibidor general reversible de PTPasas, con valores de inhibición a concentraciones de 10 a 100 μM .

El vanadio y el vanadato, han demostrado tener una variedad de efectos biológicos y bioquímicos, ya que imitan acciones metabólicas de la insulina *in vitro* e *in vivo*, estimulando directamente la actividad de tirosina cinasa en células intactas; y en sistemas purificados forman enlaces covalentes con grupos hidroxil ⁽⁵⁴⁾.

La afinidad de unión del vanadato por las PTPasas es de varias órdenes de magnitud mayor que para el ión fosfato ⁽⁵⁶⁾.

El vanadato es considerado como un análogo del fosfato, pudiendo adoptar una estructura similar al fosfato inorgánico, además de una estructura trigonal

bipiramidal, que semeja el estado de transición para la hidrólisis de la fosfoenzima intermediaria en la reacción de catálisis de las PTPasas. La cristalografía de rayos X del complejo PTPasa-vanadato, muestra que la molécula de vanadio ocupa el sitio activo con una distancia covalente del grupo tiol del residuo catalítico de cisteína, formando un enlace éster tiol-vanadil que asemeja la unión covalente tiol-fosfato formado durante la catálisis. De esta manera, se considera que el vanadato es un inhibidor competitivo de las PTPasas ^(56, 57).

El tratamiento prolongado de células con Na_3VO_4 pudiera inactivar permanentemente las PTPasas, ya que el residuo de cisteína pudiera ser oxidado directamente por el Na_3VO_4 o indirectamente seguida la formación intracelular de pervanadato ⁽⁵⁸⁾.

1. 9. 2. Pervanadato

El pervanadato (pV) es el término general que se da a una variedad de complejos químicos sintetizados, formados por la combinación de vanadato y peróxido de hidrógeno, los cuales son potentes inhibidores estables de PTPasas en solución acuosa y tienen mayor efecto inhibitorio que sus contrapartes individuales. La mayoría de estos complejos presentan una forma pentagonal bipiramidal en estado cristalino. Se sabe que estos componentes tienen también una gran variedad de efectos biológicos. Pueden activar el receptor cinasa de la insulina e imitar la acción biológica de la insulina *in vivo*, además tienen la capacidad de activar células del sistema inmune. ^(59, 60).

Los pVs son conocidos por ser potentes agentes oxidantes y pueden inhibir irreversiblemente las PTPasas por oxidación del residuo catalítico de cisteína. La oxidación por la adición de 2 oxígenos (ácido sulfínico) o 3 oxígenos (ácido sulfónico) al sitio activo de cisteína es irreversible ^(58, 49).

Debido a que el pervanadato mantiene la mitad vanadil, puede dirigirse y acomodarse en el sitio catalítico PTPasa, oxidando al residuo de cisteína mediante los grupos peroxo, los cuales son cruciales para su actividad inhibitoria del reactivo ^(36, 59).

Los pVs son 1000 veces más potentes que el vanadato como inhibidor de PTPasas ⁽⁵⁵⁾.

1. 10. Participación de las PTPasas en microorganismos patógenos

Las PTPasas han sido identificadas en bacterias tales como *Salmonella* y *Yersinia*; En parásitos como *Ascaris suum*, *Trypanosoma brucei* y *Entamoeba histolytica* ^(61, 62, 63, 64).

Trypomastigotes y amastigotes vivos de *Trypanosoma cruzi* poseen una ectoproteína con actividad de tirosina fosfatasa, optima a pH ácido, como se ha reportado por la habilidad de las células intactas por catalizar la desfosforilación de la proteína básica de mielina, fosforilada en el residuo tirosina, [³²P] TyrRaytide ⁽⁶⁵⁾.

Se ha demostrado que las PTPasas de *Salmonella* y *E. histolytica* actúan sobre las proteínas de actina de células epiteliales afectando el rearreglo del citoesqueleto ^(62, 64). Además las proteínas identificadas como proteína de anclaje Cas y proteína de unión Fyn (FYB) son proteínas desfosforiladas por las PTPasas de *Yersinia* y están asociadas con la interrupción de complejos focales ⁽⁶⁶⁾. También inhiben la fagocitosis y el estallido oxidativo en macrófagos ⁽⁶⁷⁾.

1. 11. PTPasas caracterizadas en *Leishmania*

Estudios realizados han sugerido que la PTPasa SHP-1 juega un papel importante en la patogénesis de la infección con *Leishmania* a través de la activación de la PTPasa en macrófagos por *Leishmania* ^(68, 69, 70).

Las PTPasas han sido reportadas como factores de virulencia en diferentes patógenos. Otros estudios sugieren que las PTPasas juegan un papel importante en la patogénesis de infecciones por *Leishmania* a través de la activación de macrófagos por las PTPasas del parásito ⁽⁶⁹⁾.

En *Leishmania major* se han encontrado diferencias en la PTPasas asociadas a membrana presentes en las etapas procíclica y metacíclica de los promastigotes. En los promastigotes metacíclicos, la actividad de PTPasa fue totalmente inhibida por inhibidores específicos de PTPasas e inhibidores de serina /treonina, mientras que en promastigotes procíclicos la actividad de PTPasa fue solamente inhibida con inhibidores de PTPasas. Además por ensayos de Western-blot, identificaron una PTPasa de *Leishmania* de 55-60 kDa por medio de dos anticuerpos: un anticuerpo monoclonal dirigido contra el sitio catalítico de la PTPasa de placenta humana 1B; y un anticuerpo policlonal dirigido contra la PTPasa de *T. brucei* ⁽⁷¹⁾.

Hasta la fecha pocos son los estudios que indican la presencia de PTPasa asociada a la membrana de *Leishmania*. Sin embargo, no se conoce si esta

enzima puede ser secretada al medio de cultivo, como se ha reportado en otros microorganismos.

2. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad que engloba diversas formas clínicas debidas a la variedad inmunogenética de los hospederos ⁽⁷²⁾ y a la diversidad de los parásitos que interactúan con las poblaciones humanas, los vectores y los reservorios ^(73, 74). La ausencia de medidas terapéuticas efectivas para su control, la toxicidad de las drogas utilizadas para el tratamiento de la enfermedad, la frecuencia de la expresión de quimio-resistencia por parte de los parásitos, la ausencia de un control efectivo de los vectores y el costo en implementación de medidas de profilaxis y de diagnóstico preciso, han sido determinantes en el repunte de la leishmaniasis cutánea; debido a ello, la comprensión de la fisiología del parásito y de su interacción con las células hospederas implicadas, constituye un reto fundamental para el diseño de estrategias para el control efectivo de la enfermedad.

La leishmaniasis progresa desde el momento de la infección, pasando por una fase sintomática hasta la fase de recuperación o muerte del huésped. La aparición de cada fase es debida a la interacción de moléculas específicas del parásito con un compartimiento específico del sistema inmune del hospedero.

Se sabe que *Leishmania sp* presenta PTPasas que pueden regular varias funciones asociadas con la metaciclologénesis del parásito, así como en la internalización y replicación del parásito en el macrófago ⁽⁷⁵⁾. Además de que el parásito es capaz de dañar la respuesta funcional del macrófago a través de la activación de la PTPasa SHP-1 del macrófago, que inhibe los eventos de señalización de proteínas cinasas por mitógeno ⁽⁷⁶⁾.

Los resultados de los últimos años han demostrado que las PTPasas forman una gran familia de enzimas, sometidas a una compleja regulación, que van a intervenir en el control de múltiples rutas de señalización celular ⁽⁷⁷⁾. Además, presentan una elevada especificidad de sustrato, llegando incluso a diferenciar el lugar de fosforilación que será hidrolizado dentro de cada sustrato.

Debido a lo anterior y a la necesidad de conocer si promastigotes de *Leishmania mexicana* secretan al medio de cultivo una enzima con actividad de PTPasa, estamos interesados en buscar y analizar el tiempo óptimo de mayor secreción, la actividad catalítica, el peso molecular y la caracterización bioquímica de esta enzima (pH óptimo y el efecto que ejercen algunos compuestos químicos sobre su actividad enzimática). Con el objetivo de conocer a futuro la participación de esta enzima en el proceso infectivo de *Leishmania mexicana* en células (macrófagos) de su hospedero y de esta forma, con el conocimiento de su posible función, ayudar al desarrollo de estrategias para el control de la Leishmaniasis.

3. HIPÓTESIS

Promastigotes de *Leishmania mexicana* secretan al medio de cultivo una enzima con actividad de proteína tirosina fosfatasa.

4. OBJETIVO

4. 1. Objetivo General

Identificar y caracterizar la proteína tirosina fosfatasa de secreción de *Leishmania mexicana*.

4. 2. Objetivos Particulares

1. Determinar el tiempo óptimo de crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana* para la secreción de la fosfatasa al medio de cultivo RPMI modificado.
2. Determinar el tiempo óptimo de secreción de la PTPasa por promastigotes de *Leishmania mexicana* en el medio de cultivo RPMI modificado.
3. Determinar el pH óptimo para la actividad de fosfatasa secretada por promastigotes de *Leishmania mexicana*.

4. Detección por Western-blot de la PTPasa de secreción utilizando un anticuerpo α -PTPasa 1B de placenta humana y un anticuerpo α -Try AcP 115 *Trypanosoma brucei*.

5. Caracterizar la PTPasa de secreción utilizando inhibidores específicos de PTPasa (ortovanadato de sodio, molibdato de amonio, pervanadato), e inhibidores de serina/treonina fosfatasa (Calyculina y Ácido Okadáico).

5. METODOLOGÍA

5. 1. Cultivo de parásitos

Promastigotes de *Leishmania mexicana* de la cepa MHOM/MX/92/UADY68 donadas por el Dr. Fernando Andrade (Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán), se crecieron en medio RPMI 1640 (Bio Whittaker) con 5 % de suero fetal de bovino (SFB) (GIBCO) inactivado con calor en un baño María a temperatura de 56° C durante 1 h. Los parásitos fueron cultivados con un inculo inicial de 1×10^6 parásitos/ml en botellas de cultivo con un volumen de 30 ml de medio RPMI con 5% de SFB y se incubaron a temperatura constante de 26° C durante 96 h.

5. 2. Colecta de parásitos

Para determinar el tiempo en que el cultivo de promastigotes se encontraba en su momento óptimo de crecimiento para la secreción de la fosfatasa, se analizó la actividad de fosfatasa secretada en diferentes tiempos de crecimiento (24, 48, 72, 96 h) con la finalidad, de que, a los cultivos posteriores, se les hiciera en ese tiempo determinado, un cambio de medio de RPMI al 5% de SFB a medio RPMI modificado 1640 (1X) (con L-Glutamina, sin carbonato de sodio, sin tirosina, sin fosfato dibásico de sodio y sin rojo de fenol) (In vitro) para iniciar posteriormente una cinética de secreción de 1, 3, 5 y 7 h.

A las 24, 48, 72 y 96 h de cultivo, se tomó una alícuota de una de las botellas, se realizó conteo de los parásitos en una cámara de Neubauer, para saber que

cantidad de parásitos se tenían en total en las botellas, ya que la cantidad óptima de parásitos para hacer el pase al medio RPMI modificado, fue de 3×10^9 parásitos.

Los parásitos en medio de cultivo RPMI con 5% de SFB de todas las botellas, fueron centrifugados a 3400 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante que correspondía al medio RPMI con 5 % de SFB y el “pellet” se resuspendió con 40 ml de medio RPMI modificado. Se hicieron lavados con este medio, hasta llevar todos los “pellets” a un solo tubo. Se centrifugó nuevamente este tubo a 3400 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el “pellet” se resuspendió nuevamente en 40 ml de medio RPMI modificado.

Se tomó una alícuota para realizar un segundo conteo de los parásitos para conocer cuantos se tenían en el tubo. Se ajustó una botella por cada tiempo (24, 48, 72 y 96 h) a 4.3×10^8 parásitos en 10 ml de medio RPMI modificado para realizar la cinética de secreción de fosfatasa durante 5 h. Las botellas se etiquetaron, se colocaron en agitación y se incubaron a temperatura constante de 26° C.

Cuando cada una de las condiciones (24, 48, 72 y 96 h) cumplió el tiempo de 5 h de secreción, el medio RPMI modificado con los parásitos y la fosfatasa de secreción, se pasaron a un tubo de 15 ml (en condiciones de esterilidad) y se centrifugó a 3400 rpm durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante se decantó

en otro tubo y a los parásitos (pellet) se les determinó su viabilidad por citometría de flujo.

El sobrenadante se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4° C y posteriormente se colocó en un sistema de concentración por ultrafiltración Amicon (Millipore), mediante una membrana (Millipore) con un diámetro de poro de 44.5 µm, activada con metanol-agua al 30%, el medio RPMI modificado con la enzima secretada, se concentró 10 veces su volumen inicial a 4° C. Terminada la concentración por Amicon, la muestra se almacenó a -70° C.

Este medio condicionado, producto de la incubación de promastigotes, se utilizó como fuente de enzima para determinar a que tiempo (24, 48, 72, 96 h) el cultivo de promastigotes presentó su mayor actividad de fosfatasa. Con en base a esto se encontró el tiempo óptimo de crecimiento del cultivo para la secreción de la fosfatasa.

5. 3. Obtención de la PTPasa secretada por promastigotes de *Leishmania mexicana*

Después de haber determinado el tiempo óptimo de crecimiento (96 h) de los promastigotes para la secreción de la fosfatasa, nuevamente se cultivaron iniciando con 1×10^6 parásitos/ml en botellas de cultivo con un volumen de 30 ml de medio RPMI al 5% de SFB cada una, en condiciones de esterilidad y se incubaron a temperatura constante de 26° C durante 96 h.

Posteriormente se tomó una alícuota de una de las botellas, se realizó un conteo de los parásitos en una cámara de Neubauer, para saber que cantidad de promastigotes se tenían en total en todas las botellas, ya que la cantidad óptima de parásitos para hacer el pase al medio RPMI modificado, fue de 3×10^9 parásitos.

Los promastigotes en medio de cultivo RPMI con 5% de SFB de todas las botellas, fueron centrifugados a 3400 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante que correspondía al medio RPMI con 5 % de SFB y el “pellet” se resuspendió con 40 ml de medio RPMI modificado.

Se hicieron lavados con este medio, hasta llevar todos los “pellets” a un solo tubo (todo fue realizado en condiciones de esterilidad). Se centrifugó nuevamente este tubo a 3400 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.

Terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el “pellet” se resuspendió nuevamente en 40 ml de medio RPMI modificado. Se tomó una alícuota para realizar un segundo conteo de los parásitos para saber cuantos se tenían en el tubo. Cuatro botellas de cultivo se ajustaron a 4.3×10^8 parásitos en 10 ml de medio RPMI modificado por cada tiempo (1, 3, 5 y 7 h) para realizar la cinética de secreción. Las botellas se etiquetaron, se colocaron en agitación y se incubaron a temperatura constante de 26° C hasta que se cumplió cada tiempo (1, 3, 5 y 7 h).

Cumplido el tiempo de cada condición, el medio RPMI modificado con los parásitos y con la PTPasa de secreción, se pasó a un tubo de 15 ml (en condiciones de esterilidad) y se centrifugó a 3400 rpm durante 10 minutos a 4° C.

Posteriormente, el sobrenadante se decantó en otro tubo y a los parásitos (pellet) se les determinó su viabilidad por citometría de flujo. El sobrenadante se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4° C.

Finalizada la centrifugación, el sobrenadante que correspondía al medio RPMI modificado con la enzima secretada, se concentró 10 veces su volumen inicial a 4° C en el sistema de concentración por ultrafiltración Amicon.

Terminada la concentración por Amicon, la muestra se pasó por una columna con resina (Sephadex) para retener el fosfato (PO_4^{-3}) intrínseco presente en la muestra. Por ello se centrifugó la columna con la muestra a 1500 rpm a 4° C. El sobrenadante se almacenó a -70° C. Este medio condicionado, producto de la incubación de promastigotes, se utilizó como fuente de enzima para todos los siguientes ensayos.

5. 4. Método de viabilidad de promastigotes de *Leishmania mexicana* por citometría de flujo

Por intereses del laboratorio surgió la necesidad de encontrar y montar una técnica adecuada para observar la viabilidad de los promastigotes de *L. mexicana* cuando estos se encontraban en cultivo y después de secretar la PTPasa y que comprobara que la enzima presente en el medio de cultivo, era producto de la secreción del parásito y no el resultado de la lisis del mismo. Es por ello que se estandarizó esta técnica basándonos en el método descrito por Sasaki y colaboradores ⁽⁷⁸⁾.

Las diferentes condiciones sometidas a secreción, después de cumplirse el tiempo (1, 3, 5 y 7 h), se centrifugaron a 3400 rpm durante 10 min a 4° C para retirar el sobrenadante (que contiene la enzima secretada) y los “pellets” (promastigotes) de los diferentes tiempos se utilizaron para realizar la prueba de viabilidad por citometría de flujo. El precipitado de cada tiempo, contenía aproximadamente 430 millones de parásitos, de los cuales solo se utilizaron 2 millones, que fueron incubados 10 min en 50 µl de HEPES Ca⁺⁺. Se adicionaron 2 µl de Anexina V-FITC (BD Bioscience) y 1µl de Ioduro de propidio (IP) (Sigma) a una concentración de [1mg/ml]. Se incubó 10 min a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se adicionaron 500 µl de HEPES Ca⁺². Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (FAC Sort Becton Dickinson) y la viabilidad se midió por la exclusión del Ioduro de Propidio (IP) y Anexina V como el porcentaje de eventos Anexina V⁻ / IP⁻.

5. 5. Determinación de la actividad de fosfatasa ácida

La actividad de fosfatasa fue medida mediante la desfosforilación del *p*-nitrofenil fosfato 0.1 M (*p*-NPP) (SIGMA) la cual se determinó en medio condicionado después de haber incubado los promastigotes en diferentes tiempos (24, 48, 72, 96 h) y (1, 3, 5, 7 h) como se describió anteriormente y utilizando medio RPMI como control. La técnica consistió en colocar en una placa de 96 pozos de fondo cóncavo, 120 μ l de mezcla de reacción con el siguiente orden: 70 μ l de solución amortiguadora de acetato de sodio (CH_3COONa) (MERCK) 0.2 M a pH de 5.0; 20 μ l de cada muestra. La reacción se inició con la adición de 10 μ l del sustrato *p*-NPP. Posteriormente se incubó a 37° C por 60 minutos en una estufa y la reacción se terminó con la adición de 20 μ l NaOH 2N. Para analizar el *p*-Nitrofenol (pNP) generado, el cual es producto de la hidrólisis del *p*-NPP, se leyó a 405 nm en el espectrofotometro (Bio-Tek Instruments, EL 312e). Cada condición se realizó por duplicado. El medio RPMI se utilizó como blanco (BCO).

5. 6. Determinación de la actividad de proteína tirosina fosfatasa

Se analizó la actividad de proteína tirosina fosfatasa en medio RPMI modificado después de haber incubado los promastigotes por diferentes tiempos (1, 3, 5 y 7 h) como se describió anteriormente, utilizando un Kit de PROMEGA específico para PTPasa, el cual contiene un péptido END p (Y) INASL (1118 kDa). Se usó en un amortiguador de acetato de sodio 0.2 M a pH 5.0. Se realizó una curva estándar de fosfatos utilizando un stock de fosfato estándar 1

mM a diferentes concentraciones (500, 1000, 2000, 3000 y 4000 picomoles). Se incubaron las muestras de *L. mexicana* (1, 3, 5, 7 h y medio solo RPMI modificado) libres de fosfatos con 5 μ l de sustrato en un volumen total de reacción de 100 μ m, por 15 min. Se detuvo la reacción con 50 μ m de Dye additive/Dye solution. Posteriormente se leyó en el lector de ELISA a 630 nm utilizando el Programa KC4 v 2.7.

5. 7. Determinación del pH óptimo

Se realizó un ensayo de cinética de pH de la actividad de fosfatasa con amortiguador de acetato de sodio 0.2 M, y con amortiguador de Trizma 10 mM ($C_4H_{11}NO_3$) (SIGMA). La técnica consistió en colocar 10 μ l del medio de cultivo (RPMI modificado) de 5 h, en una placa de ELISA de 96 pozos de fondo cóncavo; 120 μ l de mezcla de reacción con el siguiente orden: 80 μ l de solución amortiguadora de acetato de sodio 0.2 M a pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 80 μ l TRIZMA 10 mM a pH 6.0, 6.5 y 7.0; 10 μ l de la muestra de 5 h. La reacción se inició con la adición de 10 μ l del sustrato *p*-NPP. Posteriormente se incubó a 37° C por 60 minutos en una estufa y la reacción se detuvo con la adición de 20 μ l NaOH 2 N. Para analizar el *p*-Nitrofenol (pNP) generado, el cual es producto de la hidrólisis del *p*-NPP, se leyó a 405 nm en espectrofotometro (Bio-Tek Instruments, EL 312e). Cada condición se realizó por duplicado. El medio RPMI se utilizó como blanco (BCO).

5. 8. Identificación de la PTPasa de secreción, por ensayos de Western-blot, utilizando un anticuerpo monoclonal α -PTPasa 1B de placenta humana y un anticuerpo α -Try AcP 115 de *Trypanosoma brucei*

Se corrieron geles de poliacrilamida al 10 % colocando 10 μ l de muestra concentradas por Amicon, correspondientes a los tiempos de 1, 3, 5, 7 h y MS (medio solo RPMI) y precipitadas en 900 μ l de acetona. Uno de los geles se tiñó con plata Ag para observar el perfil de proteínas presentes. Otros dos geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se identificaron por inmunoelectrotransferencia utilizando el anticuerpo monoclonal α -PTPasa 1B de placenta humana, anticuerpo dirigido hacia el dominio catalítico de la PTPasa de organismos eucariontes superiores; y el anticuerpo policlonal α -Try AcP 115, un anticuerpo dirigido contra una PTPasa de *Trypanosoma brucei* y posteriormente se revelaron por quimioluminiscencia.

5. 9. Efecto de algunos agentes químicos en la actividad de fosfatasa ácida

En el medio condicionado con actividad de PTPasa y utilizando el tiempo óptimo de 5 h, se analizó el efecto de varios compuestos químicos reportados como inhibidores de PTPasas (Ortovanadato de sodio 200 μ M, Molibdato de amonio 200 μ M, Pervanadato 50 μ M) e inhibidores de serina/treonina fosfatasa (Caliculina 5nM y Ácido okadaico 1 μ M). Se incubó la muestra de 5 h a temperatura ambiente con los inhibidores por 15 min. La actividad de PTPasa presente, se determinó por el método descrito anteriormente en la sección 5.5.

5. 10. Análisis estadístico

Se analizaron las diferencias estadísticas entre grupos con la prueba no paramétrica U-Mann Whitney, tomando los valores significativos cuando la $p < 0.05$. Se utilizó el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Versión 12.

6. RESULTADOS

6. 1 Secreción de la PTPasa por promastigotes de *Leishmania mexicana*

6. 1. 1. Tiempo óptimo de crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana* para la secreción de la fosfatasa

Se analizó la actividad de fosfatasa secretada en los diferentes tiempos de crecimiento (24, 48, 72 y 96 h) utilizando como sustrato el *p*-NPP a 0.1M. Encontramos diferencias significativas en la actividad de fosfatasa ácida en la mayoría de los tiempos analizados, principalmente entre las 96 h con los demás. Observamos que la mayor actividad de fosfatasa secretada se presentó en este tiempo de 96 h (Figura 14).

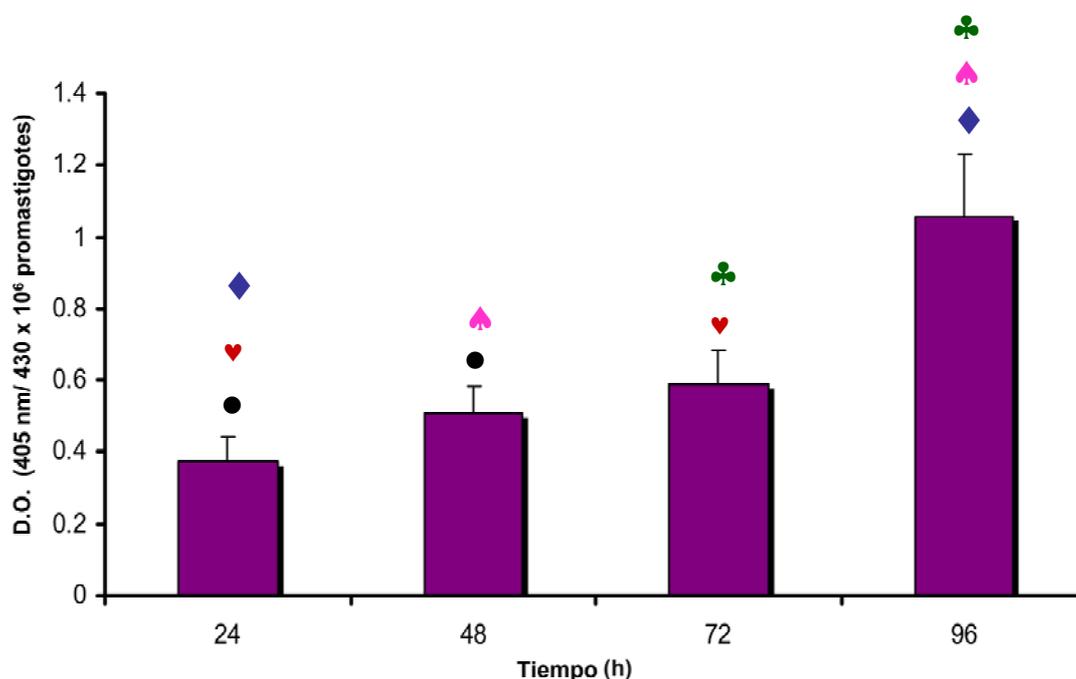


Figura 14. Tiempo óptimo de crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana* para la secreción de fosfatasa. La figura representa la media de 3 experimentos realizados por duplicado. • $p < 0.05$. ♥ $p < 0.05$. ♦ $p < 0.05$. ♠ $p < 0.05$. ♣ $p < 0.05$.

Posteriormente los parásitos se tomaron en este tiempo de crecimiento (96 h), se lavaron y se incubaron en un medio RPMI modificado. Observamos que una proteína con actividad de fosfatasa (Figura 15A) es secretada a los diferentes tiempos (1, 3, 5, y 7 h) donde se sometieron los parásitos a secreción en el medio de cultivo, siendo el tiempo de 7 h, el de mayor actividad. Encontramos diferencias significativas en la actividad de fosfatasa ácida secretada entre los distintos tiempos, principalmente entre el tiempo de 7 h con los demás. Por lo tanto, la actividad de fosfatasa se incrementa con el tiempo.

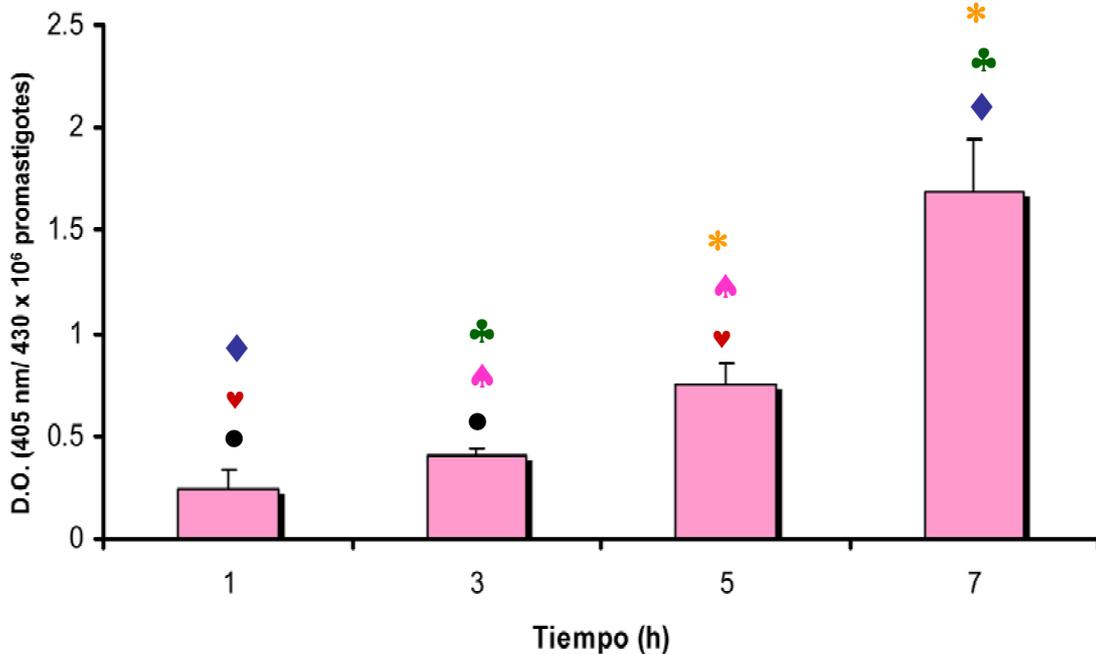


Figura 15A. Tiempo óptimo de la actividad de fosfatasa de secreción de *Leishmania mexicana*. La figura representa la media de 3 experimentos realizados por duplicado. • p < 0.05. ♥ p < 0.05. ♦ p < 0.05. ▲ p < 0.05. ♣ p < 0.05. * p < 0.05.

Se analizó también la actividad de PTPasa (Figura 15B), a los diferentes tiempos (1, 3, 5, y 7 h) donde se observó que es secretada una proteína con actividad de PTPasa, siendo a las 5 h el tiempo óptimo para su secreción. No

se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tiempos, es por ello que escogimos este tiempo de 5 h de secreción, ya que fue donde se observó el mayor promedio de la actividad de PTPasa.

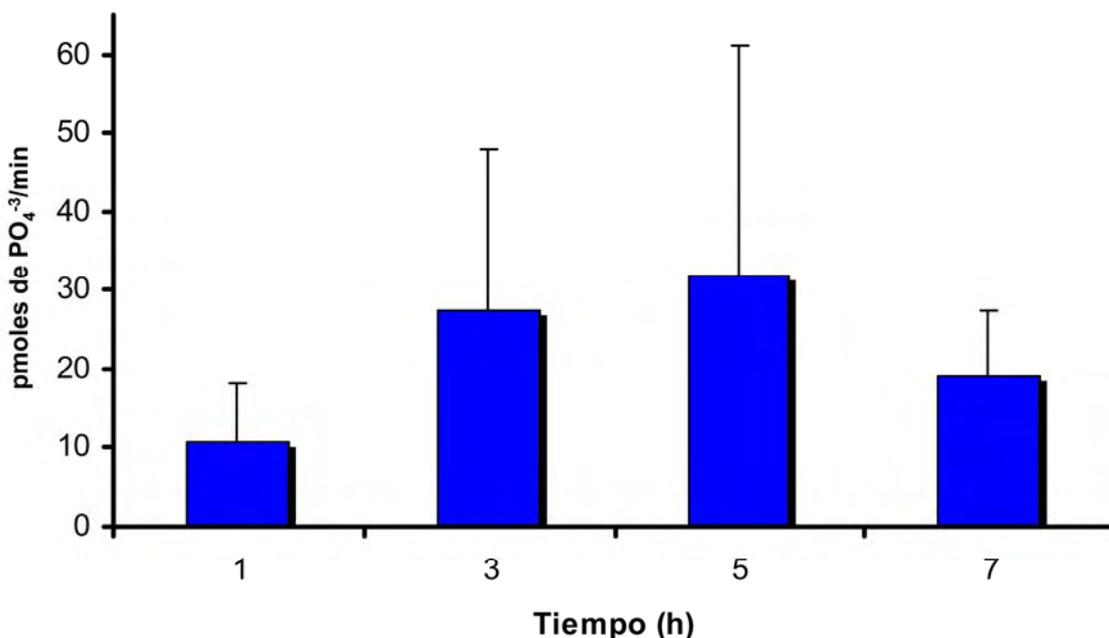


Figura 15B. Tiempo óptimo de la actividad de PTPasa de secreción de *Leishmania mexicana*. La figura representa la media de 3 experimentos realizados por duplicado. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tiempos. $p > 0.05$.

6. 1. 2. Viabilidad de promastigotes de *Leishmania mexicana* por citometría de flujo

Durante el tiempo de incubación (1, 3, 5 y 7 h) de los promastigotes en medio de cultivo RPMI, se verificó la viabilidad de estos por el método de citometría de flujo. El porcentaje de viabilidad en los diferentes tiempos fue de 90 al 96%, lo cual nos puede indicar que la actividad de PTPasa era producto de la secreción de una proteína con actividad de PTPasa y no de la lisis del parásito. (Figura 16).

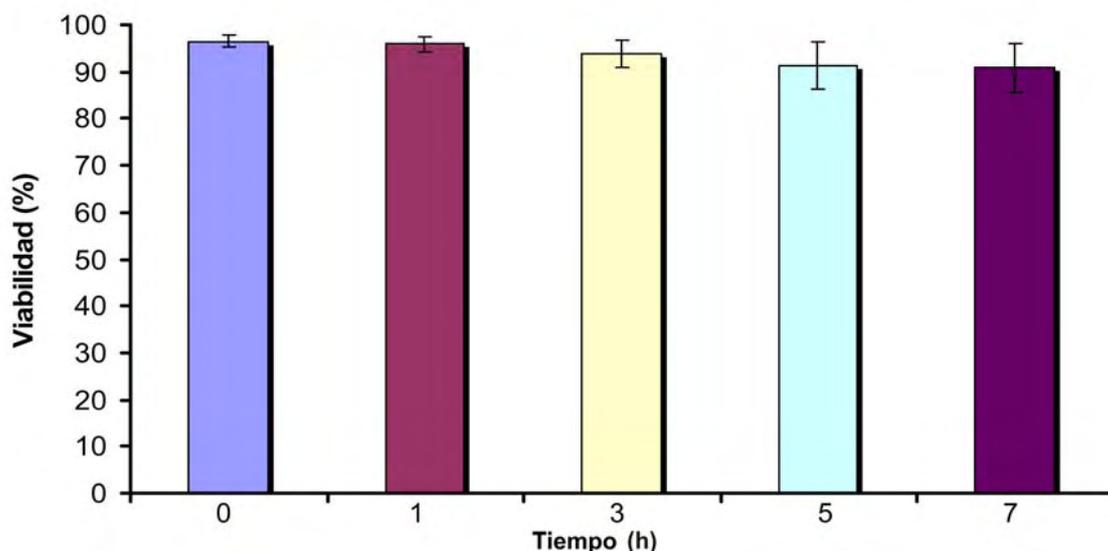


Figura 16. Viabilidad de promastigotes de *Leishmania mexicana* por citometría de flujo. La figura representa la media de 3 experimentos realizados por duplicado.

6. 2. Caracterización de la PTPasa de secreción de promastigotes de *Leishmania mexicana*

6. 2. 1. Determinación del pH óptimo

Con el fin conocer las condiciones óptimas de pH para actividad de fosfatasa se realizó una curva con acetato de sodio 0.2 M y Trizma 10 mM a diferentes pHs comprendiendo un rango de pH 4 a pH 7, empleando como fuente de fosfatasa, el medio de cultivo RPMI de 5 h de incubación con los promastigotes de *Leishmania mexicana*. Como se muestra en la figura 17, al variar el pH del amortiguador, se pueden observar diferencias significativas entre pH 5.0 (donde se presentó la mayor actividad de la enzima cuando se utiliza como sustrato el *p*-NPP a 0.1M) con los demás pH, a excepción, del pH 4.5 donde no se observan diferencias significativas con el pH óptimo de 5.0.

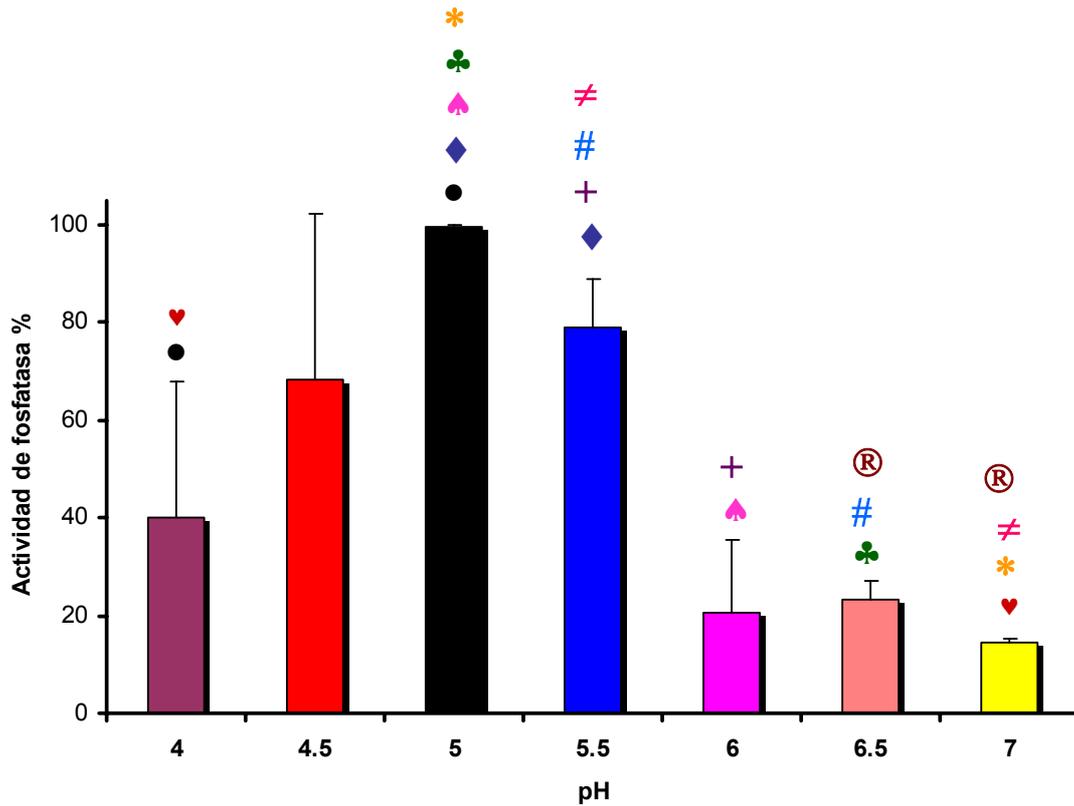


Fig. 17. Determinación de pH óptimo para la actividad de fosfatasa de secreción de *Leishmania mexicana*. La figura representa la media de 3 experimentos realizados por duplicado. • p < 0.05. ♥ p < 0.05. ♦ p < 0.05. ♠ p < 0.05. ♣ p < 0.05. * p < 0.05. + p < 0.05. # p < 0.05. ≠ p < 0.05. ® p < 0.05.

Para el pH óptimo de la actividad de PTPasa fue difícil obtener un resultado satisfactorio, por lo tanto, el que se obtuvo no fue incluido en la tesis.

6. 2. 2. Análisis electroforético de las proteínas de secreción de *Leishmania mexicana*

Se ha descrito que *Leishmania* secreta proteínas al medio de cultivo, por lo cual se analizó, por electroforesis en geles de poliacrilamida el patrón de dichas proteínas secretadas.

En la figura 18 se muestra el análisis electroforético en un gel al 10% teñido con plata (Ag) del medio de cultivo condicionado a los diferentes tiempos de secreción (1, 3, 5 y 7 h) así como el control del medio solo. Se observaron varias proteínas secretadas en el medio de cultivo, donde se aprecia el enriquecimiento de una proteína de alrededor de 55 kDa en el tiempo de secreción que presentó mayor actividad de PTPasa (5 h) a diferencia del medio control donde no se observó ninguna proteína.

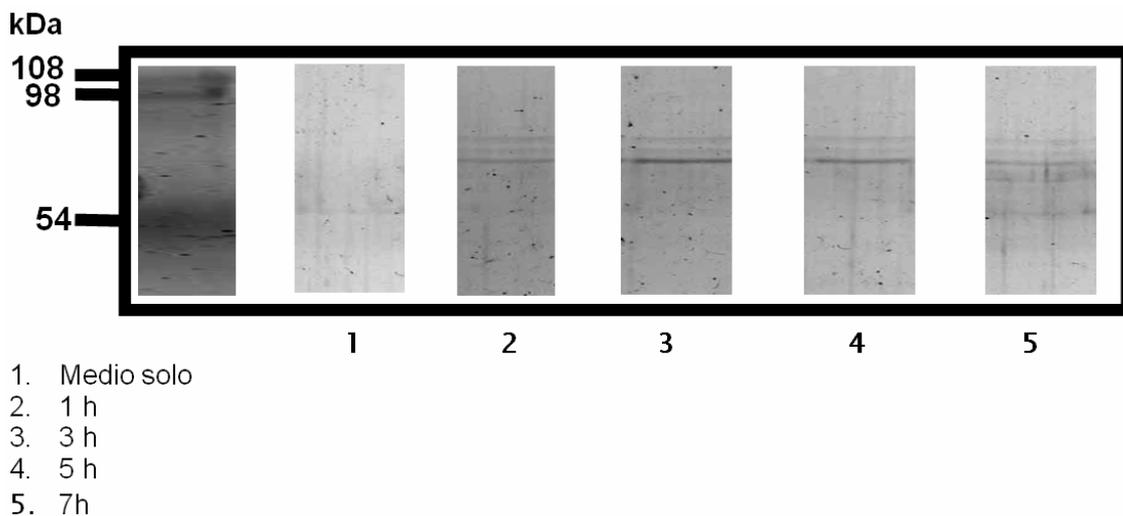
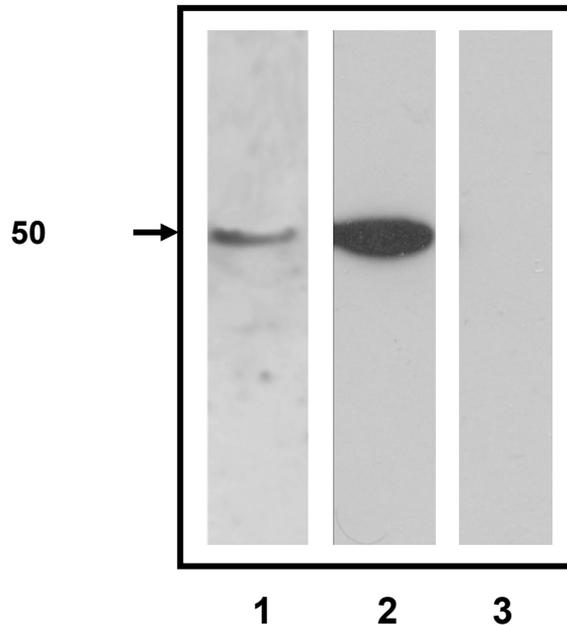


Figura 18. Análisis en gel SDS-PAGE de los diferentes tiempos de secreción de *Leishmania mexicana* teñido con plata.

6. 3. Inmunodetección de la PTPasa de secreción de *Leishmania mexicana* por ensayos de Western - blot con un anticuerpo monoclonal anti - PTPasa 1B de placenta humana y un anticuerpo policlonal α -Try AcP 115 de *Trypanosoma brucei*

Existen reportes los cuales mencionan que las PTPasas de eucariontes superiores poseen un sitio catalítico altamente conservado. Además existen anticuerpos monoclonales y policlonales que reconocen este sitio catalítico en extracto de parásitos ⁽⁷⁹⁾. Con la finalidad de analizar si el medio condicionado donde se detectó la actividad de PTPasa, pudiera encontrarse una molécula que compartiera epitopes con la PTPasa 1B y la Try AcP 115, se corrieron geles de poliacrilamida con muestras de medio condicionado del tiempo 5 h así como el control del medio solo, precipitadas con acetona. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la cual se reveló con el anticuerpo monoclonal α -PTPasa 1B de placenta humana y un anticuerpo policlonal α -Try AcP 115 de *Trypanosoma brucei*. (Figura 19).



1. anti-PTPasa 1B de placenta humana
2. anti-PTPasa de *Trypanosoma*
3. Medio solo

Figura 19. Identificación de la PTPasa de secreción de *Leishmania mexicana* por inmunoelectrotransferencia con un anticuerpo monoclonal α - PTPasa 1B de placenta y un anticuerpo policlonal α -Try AcP 115 de *Trypanosoma brucei* humana en los diferentes tiempos de secreción.

Los resultados por inmunoelectrotransferencia permitieron observar que el anticuerpo monoclonal (α -PTPasa 1B de placenta humana), en el carril 1 y el anticuerpo policlonal (α -Try AcP 115 de *Trypanosoma brucei*) en el carril 2 que corresponden al medio proveniente de 5 h de incubación con los parásitos y donde se encontró la mayor actividad de PTPasa, reconocieron una molécula de alrededor de 50 kDa (Figura 19). Estos datos confirman que la PTPasa secretada por promastigotes de *Leishmania mexicana*, comparte epitopes con las PTPasas de eucariontes superiores.

6. 4. Efecto de inhibidores específicos de PTPasas

Siguiendo con la caracterización de la enzima, se utilizaron inhibidores específicos para PTPasas: ortovanadato de sodio 200 μM , molibdato de amonio 200 μM y pervanadato 50 μM , e inhibidores específicos de serina/treonina fosfatasa: caliculina 5 nM y ácido okadáico 1 μM (Figura 20), para conocer el patrón de sensibilidad y/o resistencia hacia estos compuestos. Se observó alrededor de un 64% de inhibición de la actividad de PTPasa, presente en la condición de 5 h, con los inhibidores específicos de PTPasa. Por otro lado, se observó alrededor de un 7% de inhibición de la actividad de PTPasa con los inhibidores específicos de serina/treonina fosfatasa. Se observan diferencias significativas en la actividad relativa de la enzima, entre cada uno de los inhibidores específicos de PTPasas con los inhibidores específicos de PS/TP, pero no entre inhibidores del mismo grupo.

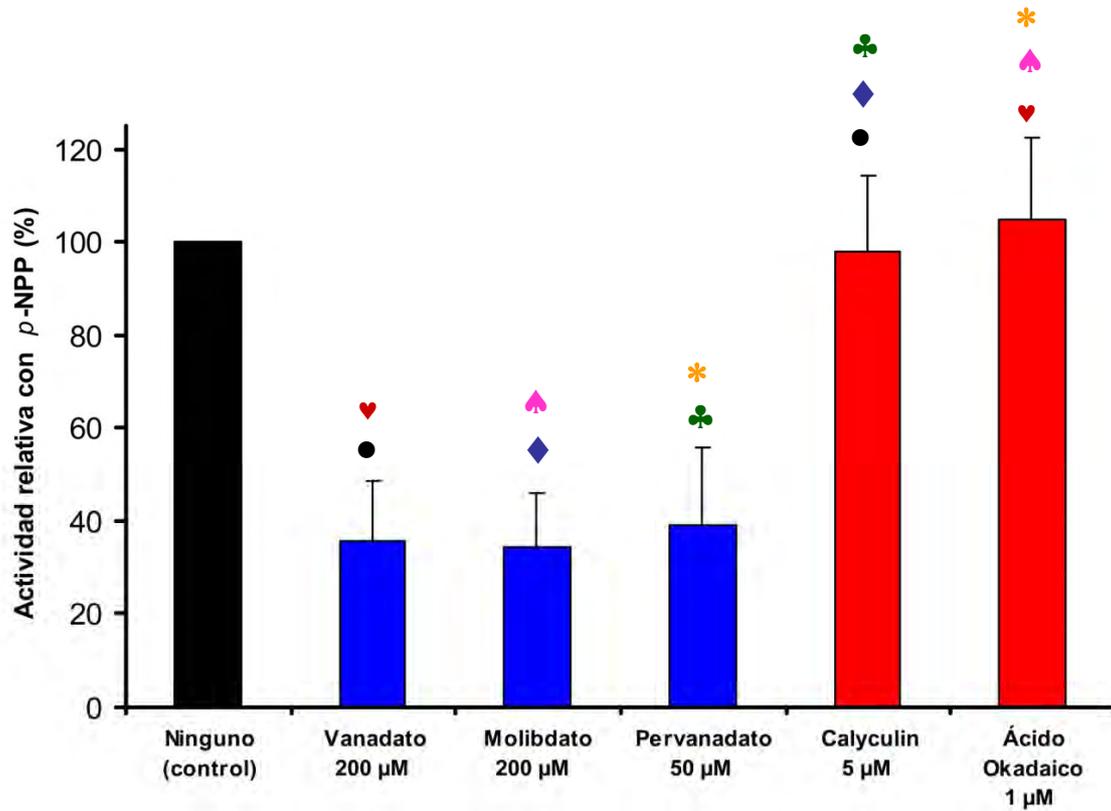


Figura 20. Efecto de los inhibidores específicos de proteínas tirosina fosfatasa y de serina/treonina fosfatasa en la actividad de la PTPasa de secreción de *Leishmania mexicana*. ■ Inhibidores específicos de PTPasas. ■ Inhibidores específicos de PS/TP. La figura representa la media de 3 experimentos realizados por duplicado. ● $p < 0.05$. ♥ $p < 0.05$. ♦ $p < 0.05$. ♠ $p < 0.05$. ♣ $p < 0.05$. * $p < 0.05$.

Inhibidores	Concentración	% Actividad Relativa	% de Inhibición
Ninguno	0	100	0
<i>Inhibidores de PTPasas</i>			
Ortovanadato de Sodio	200 μ M	36 \pm 13.05	64 \pm 13.05
Molibdato de amonio	200 μ M	34 \pm 11.83	66 \pm 11.83
Pervanadato	50 μ M	39 \pm 16.51	61 \pm 16.51
<i>Inhibidores de serina/treonina fosfatasas</i>			
Caliculina	5 nM	98 \pm 16.38	2 \pm 10.40
Ácido Okadáico	1 μ M	105 \pm 17.40	-5 \pm 7.42

Tabla 1. Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad de fosfatasa de secreción de promastigotes metacíclicos de *Leishmania mexicana* utilizando p-NPP como sustrato.

7. DISCUSIÓN

Leishmania es un parásito protozoario intracelular, del cual se conocen varias moléculas que contribuyen a la evasión de la respuesta inmune, dentro de estas moléculas están las asociadas a la membrana como el LPG y la gp63. El LPG participa como factor de virulencia ^(13, 90) y dentro del macrófago inhibe la proteína cinasa C (PKC) y el estallido oxidativo, así como la fusión fagosoma-endosoma ^(4,91). La gp63 es proteolíticamente activa contra un número de sustratos y por lo tanto, esta posiblemente involucrada en la degradación de macromoléculas del hospedero y puede proteger al promastigote de la actividad microbiciada del macrófago ⁽³⁵⁾. Hasta la fecha las moléculas más estudiadas en *Leishmania* se encuentran asociadas a la membrana y se sabe poco sobre las proteínas solubles que este parásito presenta.

En parásitos intracelulares como son: *Plasmodium spp*, *Toxoplasma spp* y *Theileria spp* se ha encontrado que presentan rutas de secreción en las cuales, distintos tipos de proteínas son llevadas a organelos de secreción. Estas moléculas pueden ser secretadas desde estos organelos secretores hasta el exterior del parásito, así como también dentro de las células hospederas infectadas por dichos parásitos ⁽⁹²⁾.

Las proteínas tirosina fosfatasas son algunas de las proteínas secretadas con actividad enzimática, las cuales se han asociado con la virulencia de varios microorganismos entre los que se encuentran: *Yersinia spp*, *Mycobacterium spp* y *Salmonella spp* ^(61,62). En el caso de *Yersinia*, la PTPasa que secreta, es

conocida como YopH, que es codificada por plásmidos de virulencia de la bacteria. Un mecanismo utilizado por esta bacteria para evadir las defensas del hospedero, es bloquear la fagocitosis de macrófagos, mediante su capacidad para modular los eventos de fosforilación en tirosina. Una vez en contacto con la célula, la bacteria secreta la YopH, la cual se transloca a través de la membrana plasmática al interior de la célula, interactuando y desfosforilando proteínas asociadas al citoesqueleto. Se ha observado además, que inhibe el estallido respiratorio de macrófagos ^(93, 94).

En parásitos se han estudiado algunas PTPasas, por ejemplo: los trofozoítos secretan fosfatasas ácidas con actividad de PTPasa, al medio de cultivo. En células HeLa provoca alteraciones en el citoesqueleto, debido a la destrucción de las fibras de actina ⁽⁶⁴⁾.

En leishmaniasis, las PTPasa modulan la respuesta inmune a través de la activación de la PTPasa SHP-1 del macrófago que inhibe los eventos de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógeno ⁽⁶⁹⁾.

Recientemente nuestro grupo reportó que promastigotes de *Leishmania major* presentan PTPasas asociadas a membranas ⁽⁷¹⁾. Además, recientemente se clonó una PTPasa en *Leishmania donovani* ⁽⁹⁹⁾. Sin embargo hasta la fecha no se sabe si este parásito pueda secretar al medio de cultivo fosfatasas con actividad de PTPasa.

Debido a lo anterior el objetivo de este trabajo fue analizar si promastigotes de *Leishmania mexicana* secretaban una PTPasa al medio de cultivo. Para lo cual se encontró, que el tiempo óptimo de mayor secreción de la enzima en el cultivo de los promastigotes de *Leishmania mexicana*, ocurrió entre las 72 y 96 h. En este intervalo de tiempo se observó que los parásitos se encontraban en su fase estacionaria, determinada por: el pH del medio de cultivo y la morfología de los parásitos. El pH fue determinado por el cambio de color del medio de cultivo ya que éste presenta un indicador que cambia de color de rojo a amarillo cuando está en condiciones ácidas. La morfología de los parásitos que se observó al microscopio fue la siguiente: los promastigotes presentaron un cuerpo celular corto, estrecho y un flagelo dos veces o más largo que el cuerpo celular ⁽⁹⁵⁾. Por lo tanto se seleccionó las 96 h como tiempo óptimo para colectar a los promastigotes e incubarlos para la secreción de fosfatasa ácida en medio modificado. Se utilizó este medio modificado el cual fue RPMI libre de fosfatos y libre de rojo de fenol para que no interfiriera con el método colorimétrico utilizado para la detección de la actividad de PTPasa. Observamos que el tiempo óptimo de incubación para la secreción de la fosfatasa ácida en esta condición, ocurrió a las 7 h, este tiempo de incubación no afectó la viabilidad de los promastigotes. También se encontró que la actividad de PTPasa fue secretada en un tiempo óptimo de 5 h de cultivo en este medio modificado. Esto se analizó porque se ha reportado, que algunas fosfatasas ácidas pueden presentar adicionalmente una actividad de PTPasa⁽⁶⁴⁾. Por otra parte se sabe que la actividad de fosfatasa puede incrementarse con la edad del cultivo mientras que la actividad de PTPasa puede presentarse en cultivos tempranos ⁽⁸²⁾. Respecto a la síntesis y

secreción de PTPasas en *Leishmania* no se conoce mucho, existen reportes de que la fosfatasa ácida secretada en *Leishmania donovani* puede ser detectada a los 20 minutos de haberse sintetizado. Otros experimentos muestran que los niveles de actividad de fosfatasa acida extracelular se incrementan en paralelo con el crecimiento de promastigotes *in vitro*. Esto indica que la enzima es liberada de los promastigotes por un proceso secretor constitutivo. La liberación de fosfatasa ácida ha sido observada en otras especies del parásito, sugiriendo que esta ruta se extiende en el género *Leishmania* ⁽⁹⁶⁾.

Se sabe que promastigotes de *Leishmania spp*, con la excepción de *Leishmania major*, secretan fosfatasas ácidas al medio, a través del bolsillo flagelar, el cual es su órgano secretor ⁽³⁶⁾. En el laboratorio encontramos que *Leishmania major* posee una PTPasa asociada a membrana por lo que estábamos interesados en analizar si promastigotes de *L. major* secretaban esta enzima al exterior. Nuestros datos fueron muy semejantes a los reportados, no encontramos la secreción de PTPasas al medio de cultivo por promastigotes de *L. major*; hasta la fecha no se sabe a que se debe esta inhibición de la secreción de esta enzima en esta especie de *Leishmania*.

Debido a que la presencia de la enzima en el medio de cultivo, podría ser resultado de las lisis de los parásitos durante la incubación y/o la centrifugación del medio; ya que existen reportes de la presencia de PTPasas asociadas a la membrana de promastigotes de *Leishmania major* ⁽⁷¹⁾, se analizó la viabilidad de los promastigotes por citometría de flujo, donde se observó que entre un 96-90% de los parásitos durante la incubación se encontraban viables, por lo que

la actividad presente en el medio era producto de la secreción y no de la lisis del parásito.

Siguiendo con la caracterización de la enzima de secreción, se sabe que una de las características de las fosfatasas, es que llevan a cabo su función en condiciones ácidas. El rango de pH reportado para las fosfatasas de otros microorganismos e inclusive para otras especies de *Leishmania* como *L. donovani*, es ácido, ya que se ha observado una actividad de fosfatasa ácida de pH 5.0 en una enzima asociada a la membrana de promastigotes ⁽³⁶⁾. Se conoce que promastigotes de *Leishmania major* tienen una proteína asociada a membrana con actividad de fosfatasa, ya que promastigotes procíclicos presentan esta actividad ácida a un pH óptimo de 5.0 y promastigotes metacíclicos presentan esta actividad a un pH óptimo de 6.0 ⁽⁷¹⁾. Esto concuerda con nuestros resultados, ya que se observó la actividad de fosfatasa de una proteína de secreción en condiciones ácidas, que presentó su actividad óptima a un pH ácido de 5.0. Estos resultados podrían establecer que, la proteína que presentó esta actividad de fosfatasa a un pH ácido, es el resultado de la secreción de la enzima al medio de cultivo, al igual que como se reportó en otro parásito como *E. histolytica*, donde se determinó el pH óptimo de una fosfatasa ácida de secreción en un rango de pH entre 4.5 y 5.0, distinto al pH óptimo entre 5.0 y 5.5 que se ha reportado en la enzima asociada a la membrana de este parásito y que es similar al de fosfatasas ácidas de secreción de *Leishmania spp.* y otros microorganismos como *Mycoplasma fermentans* y *Coxiella burnetii* ⁽⁶⁴⁾.

El peso molecular (PM) reportado para fosfatasa ácida de secreción oscila entre los 50 y 60 kDa. Sin embargo en otros microorganismos como *Mycobacterium spp*, se han encontrado PTPasas de secreción de PM de 30 kDa, en *Salmonella spp*, la SptP de 56 kDa ⁽⁹⁸⁾ y en *Yersinia spp*, la YopH de 51 kDa ⁽⁶¹⁾. Nosotros encontramos que el PM de esta enzima es aproximadamente de 50-55 kDa, el cual está presente en el tiempo óptimo de secreción de 5 h para la actividad de PTPasa. El reconocimiento de la enzima de secreción, la cual comparte dominios con la PTPasa de eucariotes superiores, sugiere fuertemente que este epítopo puede también estar presente en la PTPasa de *L. mexicana*. En parásitos tales como *T. brucei*, *A. suum*, *E. histolytica* y *L. major*, se han reportado caracterizaciones preliminares de la presencia de una proteína de 55 kDa que fue reconocida por la reacción cruzada con el anticuerpo monoclonal, contra el dominio catalítico de la PTPasa 1B de placenta humana ⁽⁹⁷⁾. También se tiene reportado que el anticuerpo policlonal dirigido contra la PTPasa de *T. brucei* detectó una proteína de 55-60 kDa en promastigotes procíclicos y metacíclicos de *L. major* ⁽⁷¹⁾. Además de que el PM (50-55 kDa) que presenta la PTPasa de *L. mexicana* es similar al de otras PTPasas de bacterias y protozoarios ⁽⁶⁴⁾.

Actualmente el uso de inhibidores o activadores específicos han sido utilizados para la caracterización preliminar de fosfatasa ácida como las PTPasas y proteínas serina fosfatasa (PS/TP) y ha servido como una herramienta para conocer más las características bioquímicas de esta enzima ^(85,86,87,88). Por lo tanto, el efecto de varios compuestos inhibidores, fue probado en la actividad de esta enzima. Las PTPasas que desfosforilan residuos tirosina y las que

desfosforilan residuos serina/treonina presentan un perfil diferencial en cuanto a su sensibilidad/resistencia a diferentes compuestos químicos. Las fosfatasas específicas de tirosina son inhibidas por concentraciones micromolares de ortovanadato de sodio y molibdato de amonio ^(54,87,89). Estos compuestos son incapaces de inhibir proteínas de serina/treonina las cuales son susceptibles a concentraciones nanomolares de ácido okadaico y concentraciones micromolares de calyculina ^(54,55).

La actividad de fosfatasa de secreción de *L. mexicana* fue inhibida por concentraciones micromolares de inhibidores de PTPasas como ortovanadato de sodio en un 64 %, por molibdato de amonio en un 66 % y por pervanadato en un 61 %, en comparación con los inhibidores de serina/treonina fosfatasa en concentraciones nanomolares como la caliculina que inhibió la actividad de la enzima en un 8 % y ácido okadaico en concentraciones micromolares que la inhibió en un 5 %. Estos datos reflejan un tipo de inhibición parcial por ambos grupos de inhibidores, sugiriendo que posiblemente puede tratarse de un tipo de PTPasa atípica. Este patrón de inhibición es diferente al observado en la PTPasa de membrana de promastigotes metacíclicos de *L. major*, donde la actividad de PTPasa fue inhibida al 100 % por concentraciones micromolares de inhibidores específicos de PTPasas (ortovanadato de sodio, molibdato de amonio y tungstato de sodio) y por concentraciones nanomolares de inhibidores de serina/treonina fosfatasas (ácido okadaico) ⁽⁷¹⁾. La inhibición de la fosfatasa ácida de secreción por concentraciones micromolares de inhibidores competitivos como el ortovanadato y molibdato, sugiere fuertemente la presencia de una actividad de PTPasa ⁽⁶⁴⁾, ya que el efecto ejercido por

diversos inhibidores en la actividad de la fosfatasa ácida fue constante con el patrón de inhibición esperado para las enzimas que pertenecen al subgrupo de tirosina fosfatasas y no por los inhibidores de serina/treonina, como se ha reportado para otros microorganismos ⁽⁹⁷⁾.

Algunos estudios con microorganismos patógenos que secretan PTPasas, como: *Yersinia spp*, *Salmonella spp*, *Mycobacterium spp* y *Entamoeba spp*, ⁽³⁷⁾ reportan que estas enzimas pueden participar como factor de virulencia ó afectando las vías de señalización en la célula hospedera. En base a ello, pensamos que *Leishmania mexicana* puede tener una estrategia similar a los microorganismos mencionados debido a que posee también proteínas tirosina fosfatasas asociadas a membranas y secretadas al medio de cultivo. Hasta el momento desconocemos si la PTPasa asociada a membrana de promastigotes de *Leishmania* y la PTPasa secretada al medio de cultivo se trata de la misma enzima o de dos enzimas diferentes. Las enzimas secretadas por el parásito podrían desempeñar un papel crucial en la biología o la virulencia de los parásitos de *Leishmania spp*, los cuales están muy bien adaptados para sobrevivir en las condiciones hostiles del compartimiento fagolisosomal del macrófago hospedero, por las características que presentan de soportar ambientes de bajo pH, temperatura y enzimas hidrolíticas. Sin embargo este hallazgo abre un nuevo panorama sobre los mecanismos de evasión de *Leishmania* mediante moléculas solubles que puedan regular la señalización de la célula huésped además de ser consideradas como nuevos blancos interesantes para un posible tratamiento.

8. CONCLUSIÓN

Leishmania mexicana secreta una proteína con actividad de tirosina fosfatasa la cual fue comprobada por:

- Desfosforilación del péptido fosforilado en tirosina.
- Comparte epítomos con las PTPasa de eucariontes superiores.
- Patrón de sensibilidad a inhibidores específicos de PTPasas.

Los promastigotes de *Leishmania mexicana* secretan una proteína tirosina fosfatasa al medio de cultivo.

9. PERPECTIVAS

1. Participación de esta PTPasa de secreción en el crecimiento y diferenciación de promastigotes de *Leishmania mexicana*.
2. Participación de esta enzima soluble del parásito en el proceso de infección de Macrófagos.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Ministerio de Salud. Dirección General de Salud de las Personas. Dirección de Programa de Control de Enfermedades Transmisibles. Control de Malaria y OEM. Doctrina, Normas y Procedimientos para el control de Leishmaniasis en el Perú. Lima 1995:1-66.
2. Sánchez L, Sáenz E, Chávez M. Leishmaniasis en el Perú. En: Sociedad Peruana de Dermatología: Infectología y Piel. Lima: Mad Corp Editores e Impresores, 2000:201-7.
3. Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología. Módulos Técnicos. Serie de Monografías. Leishmaniasis. Lima, Perú. 2000:08-83.
4. Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. (2003). The role of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**: (16):9.536-9.541.
5. Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS. (1985). Role of *Leishmania* surface protease (Gp63) in complement fixation, cell adhesion and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunology* **155**:(6):3.102-3.111.
6. Vidyashankar C, Noel GJ. Leishmaniasis. *Medicine Journal* (2002); 3:1-19.
7. Grimaldi G, Tesh R, McMahon-Pratt D. (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Annals Journal Tropical Medicine Hygiene*; **41**: 697-725.
8. Becker I., Carrada, G., C., Berzunza, M., Sánchez, R., Gudiño, M. y Velasco-Castrejón, O. (2005). Análisis de Leishmaniasis en México. *OPS/OMS*. 27-33.
9. Neyra D. La leishmaniasis en el Perú. *Folia Dermatology Peru* (1997); **8**: 51-5.
10. Bonfante R, Barruela S. (2002). Leishmaniasis y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Caracas: Tipografía y Litografía Horizonte C.A.
11. De Gopugui MR, Ruiz R. (2003). Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. *International Journal Dermatology*. **37**. 801-14.
12. Alexander, J. and Rusell, D. G. (1992). The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Advances in Parasitology* **31**: 175-254.
13. Beverley, S. and Turco, S. (1998). Lipophosphoglycan (LPG) and the Identification of Virulence Genes in the Protozoan Parasite *Leishmania*. *Trends in Microbiology*. **6**: (1). 35-40.
14. Cheng, T. (1998). Human Parasitology (2 Edition). *Academia Press*. UK. 484.
15. Mehlhorn, H. and Piekarski, G. (1993). Fundamentos de Parasitología. Ed. Acribia. España. 388.
16. Biagi, F. (1977). Enfermedades Parasitarias (2º Ed.). Ed. LPMM. México. 376.
17. Sanchez-Saldaña, Saenz-Anduaga, Pancorbo-Mendoza, et al. (2004) 14(2):82-98. Leishmaniasis. *Dermatology Peru.*, may./ago. ISSN 1028-7175.

18. Velasco, (1994). Leishmaniasis con especial referencia a México. Colección de cuadernos técnicos del INDRE. SSA México.
19. Ministerio de Salud de Brasil. Fundación Nacional de Salud. Guía de control de la leishmaniasis tegumentaria americana. Brasil. 1991.
20. Ministerio de Salud de Brasil. Fundación Nacional de Salud. Leishmaniasis tegumentaria americana en el Brasil. Cuaderno Informativo destinado a los a los trabajadores de salud. Brasil. 1996.
21. Bonfante R, Barruela S. Leishmanias y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Caracas: Tipografía y Litografía Horizonte C.A. 2002
22. Ashford RW, Snowden KF. (2000). Protozoan parasites. In: Meslin FX, Macpherson CNL, editors. The dog in health and disease. Wallingford: CABI, 2000.
23. Carreira, P. F., Maingon, R., Ward, R. D., Noyes, H., Ponce, C., Belli, A., Arana, B., Zeledón, R., and Sousa O. (1995). Molecular techniques in the characterization of *Leishmania* isolates from Central America. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **89**: 31-36.
24. Velasco-Castrejón, O., Savarino, S. J., Walton B., Gam, A. A., and Neva, F. A. (1989). Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **41**. 280-288.
25. Velasco-Castrejon, O., Guzman, Rivas-Sanchez, B. (1994). La Leishmaniosis con Especial Referencia a México. *Publicación Técnica 4. México. INDRE-SSA*.
26. Guy RA y Belosevic M. (1993). Comparison of receptors required for entry of *Leishmania* major amastigotes into macrophages. *Infection and Immunity*. **61**: 1.553-1.558.
27. Spath F Erald, Epstein Linda, Leader Ben, Singer Steven, Avila Gerber A, Turco Salvatore J y Beverley Stephen M. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(16): 9.258-9.263.
28. Chang CS, Chang KP. (1986). Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of *Leishmania*-macrophage binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **83**: 100-104.
29. McGwire B, Chang KP. (1994). Genetic rescue of surface metalloproteinase (Gp63)-deficiency in *Leishmania amazonensis* increase their infection of macrophages at the early phase. *Molecular and biochemical parasitology* **66**: 345-347.
30. Chaudhuri G, Chudhuri M, Pan A, Chang KP. (1989). Surface acid proteinasa Gp63 of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome- encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *The Journal of biological chemistry*. **264**:7.483-7.489.
31. McConville, M. J., and M. A. J. Ferguson. (1993). The structure, biosintesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *The Biochemical journal*. **294**: 305-324.
32. McConville, M. J., L. F. Schur, C. Jaffe, and P. Schneider. (1995). Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan-inter-and intra-specific polymorphism in Old World species. *The Biochemical Journal* **310**: 807-818.
33. Mengeling, B. J., S. M. Beverly, and S. J. Turco. (1997). Designing glycoconjugate biosíntesis for an insidious intent: phosphoglycan assembly in *Leishmania* parasites. *Glycobiology* **7**: 873-880.

34. Tejes, R., Bouvier, J. and Bordier, C. (1986). The Major Surface Protein of *Leishmania* Promastigote is a Protease. *The Journal of Biological Chemistry* **251** (20): 9098-9101.
35. Alexander, J., Satoskar A. R. and Rusell, D. (1999). *Leishmania* Species: Models of Intracellular Parasitism. *Journal of Cell Science* **112**. 2993-3002.
36. Gottlieb, M. and y Dwyer, D. M. (1981) *Leishmania donovani*: Surface membrana acid phosphatase activity of promastigotes. *Experimental parasitology* **52**: 117-128.
37. Aguirre-Garcia, M. M., Cerbon, J., Talamas-Rohana, P. (2000). Purification and properties of an acid phosphatase from *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS. *International Journal for Parasitology* **30**: 585-591.
38. Malcom J., Mc Conville, Kylie A. Mullin, Steven C. Ilgoutz, and Rohan D. Teasdale. (2002). Secretary Pathway of Trypanosomatid Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**:122-154.
39. Overath, P., Y.-D. Stierhof, and M. Weise. (1997). Endocytosis and secretion in Trypanosomatid parasites-tumultuous traffic in a pocket. *Trends in cell biology* **7**: 27-33.
40. Bangs, J. D., L. Uyetake, M. J. Brickman, A. E. Balber, and J. C. Boothroyd.(1993). Molecular cloning and cellular localization of a Bip homologue in *Trypanosoma brucei*; divergent ER retention signals in a lower eukaryote. *Journal of Cell Science* **105**: 1101–1113.
41. Daryani, A., Hossen, A. Z. and Dalimi, A. (2003). Immune responses against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. *Veterinary Parasitology* **33**:123-134.
42. Bertholet, S., Debrabant, A., Desjardins, M. and Sacks, D. (2005). CD8+ T cells and cross-presentation pathways in Leishmaniasis. In *Third World Congreso on Leishmaniasis*, 10-15 April 2005, Palermo-Terrasini, Sicily, Italy.
43. Bousoffara, T., Louzir, H., Ben Salah A. and Dellagi, K. (2004). Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of *Leishmania*-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. **198**. 1265-1273.
44. Louzir, H., Bousoffara, T., Ben Salah, A., Kaabi, B., Chlif, Tak, P. P., Smeets, T. J. and Dellagi K. (2005). *Leishmania* specific cytotoxic cellular immune response as a new correlate for human protection against infection. In *Third World Congreso on Leishmaniasis*, 10-15 April 2005, Palermo-Terrasini, Sicily, Italy.
45. Doyle, P. and Dwyer, D. (1993). *Leishmania*: Immunochemical Comparison of the Secretary (Extracellular) Acid Phosphatases from various species. *Experimental parasitology*. **77** (4): 435-444.
46. Baghaei, M. and Mesripour, M. (2003). Characterization of Acid Phosphatase in the Promastigotes of Three Isolates of *Leishmania major*. *IJMS*. **28** (1): 1-8.
47. Remaley, A. T., Das, S. Campell. P. I., La Rocea, G., M., Pope, M. T., Glew RH. (1985). Characterization of *Leishmania donovani* acid phosphatase. *Journal Biological Chemistry*. **260**. 880-886.
48. Bates, P. A., and Dwyer, D. M. (1987). Secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani*: Molecular Strategies of Parasitic Invasión. 595-604.
49. Lovelace, J. K. and Gottlieb, M. (1986). Comparison of extracellular acid phosphatase from various isolates of *Leishmania*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **35**: 1121-1128.

50. Hunter, T. (1995). Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. *Cell*. 80 (27): 225-236.
51. Tonks, N. K. (2003). PTP1 β : From the sidelines to the front lines! *Letters* **546**: 140-148.
52. De Vinney, Steele-Mortimer, O. and Finlay, B. B. (2000). Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens. *Trend in Microbiology* **8**: 29-33.
53. Zhang, Z., 1997. Structure, mechanism, and specificity of protein tyrosine phosphatase. *Current topics in cellular regulation* **3**: 21-25.
54. Gordon, J. (1991). Use of Vanadate as Protein-Phosphotyrosine Phosphatase Inhibitor. *Methods in Enzimology* **201** (41): 477-482.
55. Zhang, Z. (2003). Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase. Handbook of Cell Signalin. *Elsevier Science. USA*. **1**. 677-684.
56. Deng, H., Callender, R., Huang, Z. and Zhang, Z. (2002). Is the PTPase-Vanadate Complex a True Transition State Analogue. *Biochemistry* **41**: 5865-5872.
57. Burke, T. and Zhang, Z. (1998). Protein Tyrosine Phosphatases: Structure, Mechanism, and Inhibitor Discovery. *Biopolymers (Peptide Science)*. **47**. 225-241.
58. Huyer, G., Liu, S., Nelly, J., Mofat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M. and Ramachandran, C. (1997). Mechanism of Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatases by Vanadate and Pervanadate. *The Journal of Biological Chemistry* **272** (2): 843-851.
59. Posner, B. I., Faure, R., Burges, J. W., Bevan, A. P., Lanchance, D., Zhang-Sun, G. Ng, J. B., May, D. A., Lum, B. S. and Shaver, A. (1994). Peroxovanadium Compounds. A New Class of Potent Phosphotyrosine Phosphatase Inhibitors Which are Insulin Mimetics. *The Journal of biological chemistry* **269**: 4596-4604.
60. Secrist, J., Burns, L., Karnitz, L., Koretzky, G. and Abrahams, R. (1993). Stimulatory Effects of the Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor, Pervanadate, on T-Cell Activation Events. *The Journal of Biological Chemistry* **268** (8): 5886-5893.
61. Guan, K. and Dixon, J. (1990). Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science*. **249**. 553-556.
62. Fu, Y. and Galan, J. (1998). The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Molecular Microbiology* **27**: 359-368.
63. Bakalara, N., Santarelli, X., Davis, CH. and Baltz, T. (2000). Purification, cloning and characterization of an Acidic Ectoprotein phosphatase differentially expressed in the infectious bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**. 8863-8871.
64. Aguirre-García, M. M., Anaya-Ruiz, M. and Talamás-Rohana, P. (2003). Membrana-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. *Parasitology* **123**: (3): 195-202.
65. Furuya T., Zhong, L., Meyers-Fernandes, J., R., Hong-Gang, L., Moreno, S. N. J. & Docampo, R. (1998). Ecto-protein tyrosine phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **92**. 339-348.
66. Hamid, N., Gustavsson, A., Andersson, K., McGee, K., Persson, C., Rudd, C. E. and Fallman, M. (1999). YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microbial Pathogenesis* **26**: 231-242.

67. Bliska, J. B. and Black, D. S. (1995). Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in the macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase, *Infection and Immunity* **63**: 681-685.
68. Nandan, D., Lo, R. and Reiner, N. (1999). Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-Fos and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity* **67**: 4055-4063.
69. Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K. and Olivier, M. (1999). *Leishmania*-induced increase in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN- γ -triggered JAK2 activation. *European Journal of Immunology* **29**: 3737-3744.
70. Forget, G., Siminovitch, K., Brochu, S., Radzioch, D. and Olivier M. (2001). Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. *European Journal Immunology* **31**: 3185-3196.
71. Aguirre-Garcia, MM., Escalona-Montaña, Bakalara, A. R. N., Perez-Torres, A., Gutierrez-Kobeh, L. and Becker, I. (2006). *Leishmania major*: Detection of membrana-bound protein tyrosine phosphatase. *Parasitology* **5**:1-9.
72. Pérez, H., Labrador, F. and Torrealba, J.W. (1979). Variations in the response of five strains of mice to *Leishmania mexicana*. *International journal for parasitology* **9**: 27-32.
73. Lainson, R. and Shaw, J. J. (1972). Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *British Medical Bulletin* **28**: 44-48.
74. Olliaro, P. L. and Bryceson, A. (1993). Practical progress and new drugs for changing patterns of Leishmaniasis. *Parasitology. Today* **9**: 323-328.
75. Ghosh, D., and Chakraborty, P. (2002). Involvement of Protein Tyrosine Kinases and Phosphatases in Uptake and Intracellular Replication of Virulent and Avirulent *Leishmania donovani* Promastigotes in mouse macrophage cells. *Bioscience Reports* **22** (3-4): 395-406.
76. Blanchette, J., Racette N., Faure, R., Siminovitch, K. A. and Olivier, M. (1999). *Leishmania*-Induced increases in activation of macrophages SHP-1 Tyrosine Phosphatase are Associated with Impaired IFN-Gamma Triggered JAK2 activation. *European Journal of Immunology* **29**: 3737-3744.
77. Tonks N. K, Neel B. G. (2001). Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Current Opinion in Cell Biology* **13**: 182-195.
78. Sasaki, D., Dumas, S., and Engleman, E., (1987). Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry* **8**: (4): 413-20.
79. Bakalara, N., Seyfang, A., Baltz, y Davis, C. (1995). Characterization of a life-cycle-stage-regulated membrana protein tyrosine phosphatase in *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry* **234**: 871-878.
80. Fischer, E. H., Charbonneau H., Tonks, N. K. (1991). Protein tyrosine phosphatases: A diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* **253**: (5018) 401-406.
81. Denu, J. M, and Tanner, K. G. (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**: (16) 5633-42.

82. Cool, D., E and Blum, J. J. (1993). Protein Tyrosine phosphatase activity in *Leishmania donovani*. *Molecular and Celular Biochemistry* **127/128**. 143-149.
83. Glew, R. H., Czuczman, M. S., Diven, W. F., Berens, R.L., Pope, M. T., Katsoulis, D. E. (1982). Partial purification and characterization of particulate acid phosphatase of *Leishmania donovani* promastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative biochemistry* **72**: (4) 581-90.
84. Schmid, B., Wimmer, M., TAG, C., R. Hoffman, and Hofer, H. W. (1996). Protein phosphotyrosine phosphatase in *Ascaris suum* muscle. *Molecular and Biochemical Parasitology* **77**: 183-192.
85. Fukami, Y. and Lipmann, F. (1982) Purification of a specific reversible tyrosine-O-phosphate phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79** (14):4275-9.
86. Zhang, Z. Y., and Van Etten RL. (1990) Purification and characterization of a low-molecular-weight acid phosphatase--a phosphotyrosyl-protein phosphatase from bovine heart. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **288**: (1) 39-49.
87. Hardie, D. G. (1993). Use of protein phosphatase inhibitors in intact cells. En Hardie, DG. (ED) protein phosphorylation: A Practical approach. Oxford: IRL Press. 109-119.
88. Zhang, Z. Y., and Dixon, J. (1994). Protein Tyrosine Phosphatases: Mechanism of Catalysis and Substrate Specificity. John Wiley Sons, INC. USA.
89. Swarup, G., Cohen, S., Garbers, D. L. (1982). Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **107** (3):1104-9.
90. Turco, S. J., G. F. Spath, and S. M. Beverley. (2001). Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends in Parasitology* **17**: 223-226.
91. Lodge, R. and Dixon, J. (2000). Modulation of Phagolysosome Biogenesis by the Lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clinical Immunology* **114**: 256-265.
92. Ravindran S. and Boothroyd J. (2008). Secretion of Proteins into Host Cells by Apicomplexan Parasites. *Traffic*.
93. Black, D. S., and Bliska, J. B. (1995). Identification of P130 as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a Bacterial Protein Tyrosine Phosphatase That Translocates Into Mammalian Cells and Targets Focal adhesions. *EMBO*. **16**: 2730-2744.
94. Sun, J., Wu, L., Fedorov, A., Almos, S. and Zhang, Z. (2003). Crystal Structure of the *Yersinia* Protein-Tyrosine Phosphatase YopH Complexed with a Specific Small Molecule Inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: (35). 33392-33399.
95. Zakai, H., Chance, M., and Bates, P., (1998). In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Parasitology* (**116**): 305-309.
96. Bates, P., and Dwyer, D., (1987). Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* (**26**): 289-296.
97. Aguirre-García MM, Okhuysen PC., (2007). *Cryptosporidium parvum*: identification and characterization of an acid phosphatase. *Parasitology Research*. **101**: 85-89.

98. Kaniga, K., Uralil, J., Bliska, J. B., and Gálan, J. E. (1996) A secreted tyrosine phosphatase with modular effector domains encoded by the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* **21**: 633-641.
99. Nascimento, M., Zhang, W., Ghosh, A., Houston, D., Berghuis, A., Olivier, M., and Matlashewski, G. (2006). Identification and characterization of a protein tyrosine phosphatase in *Leishmania* ; involvement in virulence. *The Journal of Biological Chemistry* (**47**): 36257-68.