



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA FOSFATASA 2C
EN LA MODULACIÓN DE LA APOPTOSIS DEL
PARÁSITO *Leishmania***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

MARCO DAVID ORNELAS CRUCES



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA
2014**



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.

Hoja de Datos

1. Datos del alumno
Ornelas Cruces Marco David (markornelascruces@gmail.com)
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306266908
2. Datos del tutor
Dra. María Magdalena Aguirre García (maguirre@unam.mx)
Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM
3. Datos del sinodal 1
Dra. María de Lourdes Segura Valdez (lourdes_segura@ciencias.unam.mx)
Grupo de Nanobiología, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM
4. Datos del sinodal 2
Dra. Laila Gutiérrez Kobeh (l Gutierr@unam.mx)
Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM
5. Datos del sinodal 3
Dra. Patricia García López (pgarcia_lopez@yahoo.com.mx)
Laboratorio de Farmacología, Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de
Cancerología
6. Datos del sinodal 4
M. en C. Alma Reyna Escalona Montaña (almiusqfb23@yahoo.com.mx)
Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM
7. Datos del trabajo escrito
Participación de la proteína fosfatasa 2C en la modulación de la apoptosis del parásito
Leishmania
76 p.
2014

A mi padre Marco Antonio Ornelas Belaunzarán, a mi madre Patricia Cruces Arredondo y a mis hermanas Patricia del Rocío y Ana Valeria, por esta maravillosa y amorosa vida a su lado.

« We start off confused and end up confused on a higher level.»

Alan F. Chalmers, 1982.

Agradecimientos académicos

El presente trabajo fue elaborado durante el curso del taller *Bases moleculares de la infección de la célula hospedera por el parásito Leishmania*, en el laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias, por todo lo brindado a lo largo de mi licenciatura y por todo lo que viene en el futuro.

A la Dra. Magdalena Aguirre García por su esfuerzo, tutoría, dedicación y apoyo en la realización de mi tesis.

A la Dra. Lourdes Segura, por darse el tiempo de revisar mi tesis y siempre estar pendiente de mis avances.

A la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, por revisar a detalle mi trabajo y hacer que quedara hermoso.

A la Dra. Paty García, por su apoyo con los anticuerpos Bax y Bcl-2 y por su paciencia al revisar esta tesis.

A la Dra. Norma Salaiza Suazo por su apoyo en la realización de la técnica de TUNEL y el análisis de la misma.

Al M. en C. Jesús Argueta por su apoyo y enseñanza en relación con la citometría de flujo y el análisis de la misma.

Al Tec. en Sist. Dig. Marco Gudiño por su disposición para las micrografías de los parásitos.

A la Dra. Jenny Nancy Gómez Sandoval por su apoyo al hacer los alineamientos presentados en este trabajo.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por haberme dado la oportunidad de ingresar al taller y realizar mis experimentos en su laboratorio.

Agradecimientos personales

A la Dra. Magdalena Aguirre García, porque a lo largo de esta travesía me ha enseñado que siempre puedo dar un paso más para alcanzar mis metas. Gracias Dra., por todo el apoyo que me brindó al hacer éste trabajo, por expandir mis perspectivas y por ambicionar un mejor futuro lleno de dicha y felicidad.

A mi Dra. favorita, Alma Reyna Escalona Montaña, por enseñarme todo lo que sé en el laboratorio; por siempre sacarme de apuros cuando iniciaba y por darme la confianza de hacerme cargo de otros en el laboratorio al finalizar. Por todas las pláticas académicas y por aquellas que no lo eran. Por todo tu apoyo, por tus enseñanzas, por tu ayuda en mi ponencia en el XIII ICOPA, por la práctica del inglés y por todo lo que no cabe en estas líneas. Siempre estaré agradecido contigo, te quiero.

A Jenny Nancy Gómez Sandoval por siempre hacer amena mi estancia en el laboratorio. Por todas las risas, los chistes y la buena vibra que tienes. Por siempre tener esa sonrisa y por todas las experiencias compartidas dentro y fuera del laboratorio, por esas críticas que siempre mejoraron mis presentaciones y por tu ayuda al momento de hacer mi ponencia en el XIII ICOPA.

Al Dr. Arturo Wilkins, por su apoyo con la cepa de los parásitos utilizados en mi tesis; por todas las discusiones enriquecedoras, las risas y las críticas constructivas en mi trabajo de tesis y para mi ponencia en el XIII ICOPA.

A la Dra. Berenice Martínez, por su siempre fría y a veces resonante pero siempre buena honestidad para mejorar mi trabajo. Gracias por tu apoyo, Bere.

A los integrantes del laboratorio de Inmunoparasitología: la M. en C. Adriana Ruiz, la Dra. Miriam Berzunza, la futura Dra. y mamá Eddie Tafoya, el Dr. José Sotero, el Dr. Rosalino Vázquez, la M. en C. Cristina Cañeda, la M. en C. Rocely Cervantes, a Jaime, Claudia, Ricardo, Daniel Sokani, Fabián, Ilse, Isabel (y sus hamburguesas), Pamela, Anel, Mariana y Olivia; porque siempre estuvieron presentes durante la realización de mi tesis.

De manera muy especial, a mis mejores amigas y amigo de toda la vida que siempre han sido pilares en mi vida y por todo lo que aprendí y les enseñé desde la prepa: Antonio Avendaño Barrón, Mariangel Bonilla Martínez, Iris Márquez Castro y Stefanía Gómez Angulo. Les amo.

A Dalia Ortiz Lozano, a Samantha Contreras Mirón y a Carlos Cervantes Montes, por siempre estar a mi lado. A veces es difícil distinguir entre familia y amigos, ustedes son ambos.

A los *plantólogos* David Arias e Iliana Bayarte, por las risas bien merecidas. A Hugo Molina, Maritza Orozco y Gethsemany Guerrero, por todas esas pláticas y encuentros muy amenos en la facultad. A Pablo Colunga, Juan Noguera, Estefanía Grostieta y Mayarí Aguilar por su apoyo total desde que nos conocimos y por tantas pláticas que hicieron que el día acabara con un delicioso clericot. A Paola Vázquez y Lizeth Hernández por esas desveladas maravillosas desde que nos conocimos. A Tania Mena y Armando Arias por ser las personas más sensibles que he conocido en toda mi vida.

A Hiroshi Nishikawa por siempre ser mi oído crítico y quien me haga poner los pies en la tierra. Sé que siempre estarás ahí para apoyarme. ¡Gracias!

A mi amiga y Dra., Vivette García Deister, por haberme dado la oportunidad de conocer el mundo de la filosofía de la ciencia desde mis inicios en la licenciatura; a la Dra. Edna Suárez Díaz, por darme la oportunidad de trabajar en mi primer laboratorio de investigación. A la M. en C. Alicia Villela, por siempre ser un apoyo en el laboratorio de Estudios Sociales de la Ciencia y por estar interesada en mi tesis.

Agradezco infinita e especialmente a la Dra. Ana Barahona Echeverría, por darme mi primer trabajo, por dejarme apoyarla en su laboratorio y en sus clases, por impulsarme dentro de la investigación, por ser una maravillosa mujer y porque vamos para la maestría y el doctorado juntos. ¡Gracias, Ana!

Y a todos aquellos que no he podido mencionar por falta de memoria y que me han acompañado a lo largo de este trabajo y esta hermosa travesía que se llama vida.

Abreviaturas

$\Delta\Psi_m$	Diferencia en el potencial de membrana mitocondrial
Apaf-1	Proteasas activadoras del factor-1
Ca^{2+}	Ion calcio
Cytc	Citocromo c
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
h	Hora(s)
JNK	Cinasa <i>c-jun</i> N-terminal
LC	Leishmaniasis cutánea
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LM	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
μg	Microgramo
μL	Microlitro
M	Molar
$M\phi$	Macrófagos
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
min	Minutos
Mg^{2+}	Ion magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mn^{2+}	Ion manganeso
N	Normal
NCCD	Comité de Nomenclatura en Muerte Celular

nM	Nanomolar
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>p</i> -NPP	<i>para</i> -nitrofenil fosfato
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PP2C	Proteína fosfatasa 2C
PARP	Poli-ADP-ribosa polimerasa
PPM	Proteínas fosfatasas monoméricas / dependientes de metales
PPP	Fosfoproteínas fosfatasas
PSTP	Proteínas serina/treonina fosfatasas
PTP	Proteínas tirosina fosfatasas
ROS	Especies reactivas del oxígeno
TNF	Factor de necrosis tumoral

Índice

I. Introducción	19
1.1 <i>Leishmania</i> spp.	19
1.1.1 Leishmaniasis cutánea.....	20
1.2 La apoptosis en mamíferos.....	21
1.3 La apoptosis en parásitos protozoarios unicelulares.....	22
1.4 La fosforilación de proteínas	24
1.4.1 Las proteínas serina/treonina fosfatasa.....	25
1.4.2 La proteína fosfatasa PP2C	25
1.5 Inhibidores de proteínas fosfatasa.....	26
A) PP1 y PP2A	26
B) PP2B	27
C) PP2C.....	27
1.5.1 La sanguinarina.....	27
1.6 Participación de las proteínas fosfatasa de serina/treonina en la apoptosis	28
1.7 La proteína fosfatasa PP2C y la apoptosis.....	28
1.8 Las proteínas cinasa activadas por mitógenos.....	29
1.8.1 Las proteínas cinasa activadas por mitógenos del parásito <i>Leishmania</i> spp.....	30
II. Justificación	32
III. Hipótesis	33
IV. Objetivo	34
4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivos particulares.....	34
V. Materiales y métodos.....	35
5.1. Preparación del compuesto sanguinarina	35
5.2 Cultivo de promastigotes.....	35

5.3 Obtención del extracto total de promastigotes	36
5.4 Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford	36
5.5 Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa.....	37
5.6 Evaluación de la apoptosis en los promastigotes por la técnica de TUNEL.....	37
5.7 Determinación de la translocación de la fosfatidilserina por citometría de flujo	38
5.8 Análisis de fosforilación de la cinasa MAPp38, Bcl-2, Bax y de la poli-ADP-ribosa polimerasa por Western blot	38
VI. Resultados	40
6.1 Análisis de la morfología de los promastigotes de ambas especies de <i>Leishmania</i> incubados tres días con la sanguinarina.....	40
6.2 Crecimiento de los promastigotes de <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i> en presencia de la sanguinarina	47
6.3 Actividad enzimática de la fosfatasa en los promastigotes de <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i> en presencia de la sanguinarina	49
6.4 Análisis de la fragmentación del DNA de los promastigotes de <i>L. major</i> y <i>L.</i> <i>mexicana</i> incubados con la sanguinarina	50
6.5 Análisis de la traslocación de fosfatidilserina por citometría de flujo en los promastigotes de <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i>	53
6.6 Identificación del marcador de apoptosis PARP en los extractos totales de los promastigotes de <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i>	55
6.7 Identificación de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en extractos totales de los promastigotes de <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i>	56
6.8 Identificación de la proteína pro-apoptótica Bax en extractos totales de los promastigotes de ambas especies de <i>Leishmania</i>	57

6.9 Análisis de la fosforilación de la cinasa MAPp38 en los extractos totales de los promastigotes de <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i> incubados durante tres días con la sanguinarina	59
VII. Discusión.....	60
VIII. Conclusiones.....	69
IX. Perspectivas.....	69
X. Referencias	70

Índice de figuras

Esquema 1. Descripción gráfica de la vía apoptótica propuesta para los integrantes de la familia Trypanosomatidae.....	24
Figura 1.1 Morfología de los promastigotes de <i>L. major</i> en el día 1 de cultivo incubados con la sanguinarina.....	41
Figura 1.2 Morfología de los promastigotes de <i>L. major</i> en el día 2 de cultivo incubados con la sanguinarina.....	42
Figura 1.3 Morfología de los promastigotes de <i>L. major</i> en el día 3 de cultivo incubados con la sanguinarina.....	43
Figura 1.4 Morfología de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> en el día 1 de cultivo incubados con la sanguinarina.....	44
Figura 1.5 Morfología de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> en el día 2 de cultivo incubados con la sanguinarina.....	45
Figura 1.6 Morfología de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> en el día 3 de cultivo incubados con la sanguinarina.....	46
Figura 2. Curvas de crecimiento de los promastigotes de <i>Leishmania</i> incubados con la sanguinarina durante 3 días de cultivo.	48
Figura 3. Actividad enzimática de fosfatasa en los extractos totales de <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i>	49
Figura 4.1 Micrografías de los promastigotes de <i>Leishmania major</i> donde se muestra la fragmentación del DNA analizada por la técnica de TUNEL.....	51
Figura 4.2 Micrografías de los promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> donde se muestra la fragmentación del DNA analizada por la técnica de TUNEL.....	52

Figura 5. Traslocación de la fosfatidilserina en los promastigotes de <i>L. major</i> (A) y <i>L. mexicana</i> (B) incubados tres días con el compuesto sanguinarina.....	54
Figura 6. Identificación del marcador PARP en los extractos totales de promastigotes de <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i>	55
Figura 7. Identificación de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en extractos totales de los promastigotes de <i>L. major</i> incubados con el compuesto sanguinarina.....	56
Figura 8. Identificación de la proteína pro-apoptótica Bax en los extractos totales de los promastigotes de ambas especies de <i>Leishmania</i> incubados con el compuesto sanguinarina.....	58
Figura 9. Fosforilación diferencial de la cinasa MAPp38 en promastigotes de <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i> en presencia y ausencia del compuesto sanguinarina.	59
Figura 10. Secuencia de aminoácidos 1-205 del anticuerpo Bcl-2.	65
Figura 11. Alineamientos representativos de <i>L. major</i> para la isoforma β de la proteína Bcl-2 de <i>Homo sapiens</i>	66
Figura 12. Alineamientos representativos de <i>L. mexicana</i> para la isoforma β de la proteína Bcl-2 de <i>Homo sapiens</i>	66

Resumen

La muerte celular juega un papel crítico en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis en eucariontes. Actualmente, existen evidencias experimentales de muerte celular en eucariontes unicelulares incluyendo a los protistas de la Familia Trypanosomatidae del género *Leishmania*. En estos parásitos, la apoptosis es inducida por diferentes estímulos como shock calórico, especies reactivas del oxígeno (ROS), ausencia de nutrientes y antiparasitarios, entre otros. Una vez que la apoptosis es desencadenada en estos parásitos, comienza la cascada de eventos comunes a la apoptosis de mamíferos como la producción de ROS, incremento de los niveles de Ca^{2+} citosólico, cambios en el potencial de membrana mitocondrial, exposición de la fosfatidilserina, liberación de citocromo *c*, inducción de proteasas y ruptura del DNA. Una proteína que ha sido relacionada con la muerte celular es la proteína fosfatasa PP2C ya que desfosforila sustratos intracelulares como las cinasas dependientes de ciclinas, cinasas MAP y Bad. La sanguinarina es un alcaloide aislado de la planta *Sanguinaria canadensis* que inhibe la actividad enzimática de la PP2C, induce la apoptosis en células tumorales y el mecanismo aún es desconocido. Se ha propuesto un modelo de inducción de apoptosis a través de la inhibición de la actividad enzimática de la PP2C y la fosforilación de la cinasa MAPp38 en células tumorales. Por lo tanto, el principal objetivo de este trabajo fue determinar si la PP2C de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* participa en la modulación de la apoptosis a través de la cinasa MAPp38. Para esto se realizó una curva de crecimiento de los parásitos incubados durante tres días con la sanguinarina a diferentes concentraciones (50, 100 y 250 nM) donde se demostró que dicho compuesto inhibe el crecimiento de los promastigotes. Después, se realizaron los extractos totales de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* para continuar con el análisis de la actividad enzimática de fosfatasa donde se comprobó que existe una inhibición de la PP2C por parte de la sanguinarina. Para analizar el proceso de apoptosis,

se realizó la técnica de TUNEL, que tiñe los núcleos celulares con DNA fragmentado y se hizo un análisis de traslocación de fosfatidilserina mediante citometría de flujo, demostrando que existe una muerte de tipo apoptótica en los promastigotes. Por otro lado, con los extractos totales se realizaron los western blots para la identificación del marcador de apoptosis poli-ADP-ribosa polimerasa, la proteína anti-apoptótica Bcl-2, la proteína pro-apoptótica Bax y el análisis de la fosforilación de la cinasa MAPp38 donde se reportan diferencias de estas moléculas en *L. major* y *L. mexicana*. Todos estos resultados demuestran la presencia de marcadores apoptóticos de tipo 'canónicos' de mamíferos en protozoarios del género *Leishmania* y que la inhibición de la PP2C induce la fosforilación de la cinasa MAPp38 y la apoptosis en los promastigotes de *L. major*.

I. Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad transmitida por un vector y cuenta con tres formas clínicas, como son, la leishmaniasis visceral (LV), la leishmaniasis cutánea (LC) y la leishmaniasis mucocutánea (LM). Esta enfermedad permanece como un problema de salud pública en todo el mundo afectando a 12 millones de personas en 88 países, principalmente de áreas rurales. De acuerdo a la distribución geográfica, la leishmaniasis se puede dividir en la leishmaniasis del Viejo Continente, donde la infección es transmitida por la mosca hematófaga del género *Phlebotomus* y la leishmaniasis del Nuevo Continente, transmitida por la mosca del género *Lutzomyia*. Existen poco más de 17 especies conocidas de *Leishmania* que infectan al ser humano (Pavli *et al.*, 2010). De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la enfermedad afecta a los países en vías de desarrollo y está asociada a la desnutrición, los desplazamientos de población, las malas condiciones de vivienda y a la falta de una adecuada respuesta inmune. La epidemiología depende de las características de la especie del parásito, las características ecológicas locales de los lugares donde se transmite, la exposición previa y actual de la población humana al parásito y las pautas de comportamiento humano. De igual manera, la OMS estima que cada año surgen 1.3 millones de nuevos casos y entre 20 y 30 mil defunciones (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/> consultado el 10 de abril de 2014).

1.1 *Leishmania* spp.

Leishmania spp. pertenece al reino Protista, del phylum Euglenozoa y a la familia Trypanosomatidae. El ciclo de vida de *Leishmania* es sencillo e involucra dos estadios sin fase sexual. En el vector, el parásito adquiere la forma de promastigote la cual está

caracterizada por la morfología alargada y móvil y cuyo ambiente es extracelular. En vertebrados, el parásito adquiere la forma de amastigote. El amastigote tiene morfología ovoide, no presenta movimiento y es intracelular. Después de ser inoculados en el hospedero mamífero, los promastigotes son tomados por los neutrófilos para llegar, en última instancia, a los macrófagos y las células dendríticas, formando dentro de estos tipos celulares una vacuola parasitófora que les permite sobrevivir y convertirse en amastigotes (Schroeder *et al.*, 2013) en un periodo de 12 a 24 horas después de la inoculación. Después de la transformación, el amastigote se multiplica dentro del macrófago y cuando éste estalla libera los amastigotes listos para infectar otras células (Sharma *et al.*, 2008). El parásito está adaptado a los ambientes heterogéneos, como son la temperatura de 37°C en el hospedero mamífero; pH de neutro a ácido en el estómago del vector y en la vacuola parasitófora, respectivamente; presencia de nutrientes y oxígeno (Schroeder *et al.*, 2013).

1.1.1 Leishmaniasis cutánea

En Asia, África y Europa es causada por *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania aethiopica* y *Leishmania infantum*. En América del Sur las especies involucradas son: *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania pifanoi*, *Leishmania venezuelensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania shawi* y *Leishmania lainsoni* (Goto *et al.*, 2010) y es en este continente donde la enfermedad tiene varias manifestaciones clínicas que van desde úlceras hasta la destrucción de las mucosas y generalmente se acompaña con una linfadenopatía local, mientras que en el resto del mundo se presenta con múltiples lesiones (Pavli *et al.*, 2010). La LC es endémica en más

de 70 países con un estimado de 1.5 a 2 millones de nuevos casos por año. La LC puede manifestarse semanas, meses e incluso, de manera ocasional, años con una o más lesiones en la piel después de la picadura del vector (Pavli *et al.*, 2010). Los pacientes pueden tener una o más lesiones y se le conoce como leishmaniasis cutánea localizada (LCL) (David *et al.*, 2009). En el sureste de México, la LC es conocida como la “úlceras del chiclero”, ya que quienes la presentaban, eran las personas que se dedicaban a la explotación del árbol del chicle (Murray *et al.*, 2005). La región selvática de la península de Yucatán ha sido bien descrita como área endémica de dicha enfermedad (Murray *et al.*, 2005). Asimismo, en estudios previos, el estado de Campeche ha documentado casos de leishmaniasis (González *et al.*, 2011). En el estado de Tabasco, que se sitúa dentro de la zona endémica, existen informes sobre casos de leishmaniasis desde la primera mitad del siglo XX (Córdova *et al.*, 1993). *L. mexicana* es el principal agente de la enfermedad y *Lutzomyia olmeca olmeca* y *Lu. cruciata* han sido descritas como sus vectores (Andrade-Narvaez *et al.*, 2005). Actualmente se utilizan nuevos compuestos, como el miltefosine, para inducir una muerte de tipo apoptótica en los promastigotes del género *Leishmania*.

1.2 La apoptosis en mamíferos

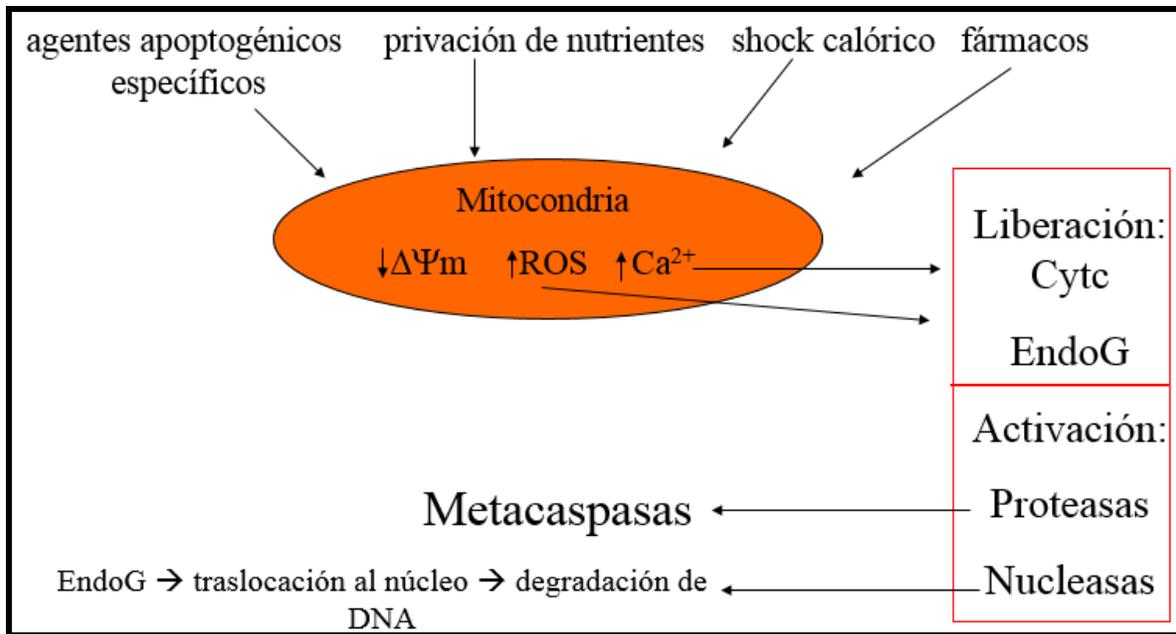
Antes de describir la muerte de tipo apoptótica en la familia Trypanosomatidae, se debe definir qué es la apoptosis y el más claro ejemplo es en los mamíferos. La apoptosis es reconocida como una vía intracelular activa de transducción de señales por la cual una célula puede regular su propia muerte. Asimismo, apoptosis es sinónimo de muerte celular programada y es requerida para la eliminación de células dañadas y para la renovación celular durante el desarrollo embrionario y la homeostasis tisular (Van Hoof, 2003). A la fecha, existen tres tipos principales de muerte celular que han sido

caracterizados, el primero es la apoptosis, seguido de la necrosis y la autofagia; ésta última aún está en debate. Asimismo, la apoptosis es el modelo de muerte celular más estudiado y es un proceso dependiente de energía asociado a cambios morfológicos bien caracterizados, entre los que se encuentran: la globulación celular, la contracción, la condensación de la cromatina, la translocación de la fosfatidilserina y la fragmentación del DNA (Sun *et al.*, 2012). La apoptosis es inducida por una gran variedad de factores fisiológicos, intracelulares y ambientales. Dependiendo del tipo celular y el contexto, muchos sistemas de señalización pueden activarse y todos ellos convergen en una sola vía de transducción. La unión de ligandos activadores a receptores de muerte celular de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (vía extrínseca) o la activación de la familia Bcl-2 en la membrana mitocondrial (vía intrínseca) permiten la liberación del citocromo *c* (Cyt_c). El Cyt_c funciona en conjunto con ATP como cofactor de las proteasas activadoras del factor-1 (Apaf-1), una proteína pro-apoptótica que es requerida para la activación de las caspasas, que ejecutan la respuesta apoptótica (Kitada *et al.*, 1998; Van Hoof & Goris, 2003).

1.3 La apoptosis en parásitos protozoarios unicelulares

Como ya se mencionó, la apoptosis es un proceso de muerte celular programado y originalmente descrito en organismos multicelulares para la eliminación de células sin inducir una respuesta inflamatoria (Smirlis *et al.*, 2011). Hace algunos años que ha incrementado la evidencia experimental de un tipo de muerte celular muy similar que opera en eucariontes unicelulares incluyendo a los protistas de la familia Trypanosomatidae del género *Leishmania* (Smirlis *et al.*, 2010). Los organismos de esta familia son considerados como los descendientes directos de los primeros eucariontes

que aparecieron en la Tierra hace 1.5 mil millones de años. Esta muerte celular programada en parásitos de la familia Trypanosomatidae posee las características morfológicas de los organismos multicelulares descritas por el Comité de Nomenclatura en Muerte Celular (NCCD), éstas incluyen el redondeo celular, la reducción del volumen celular, la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos. A pesar de que estos parásitos tienen características apoptóticas similares a los organismos multicelulares, los principales reguladores de apoptosis como las caspasas, los miembros de la familia Bcl-2, la familia de los receptores de TNF y las DNAsas activadas por caspasas no están presentes en estos eucariontes ancestrales (Smirlis *et al.*, 2011) y, por tanto, no se habían reportado otros marcadores apoptóticos como la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) que se ancla al DNA cuando éste comienza a fragmentarse (Khademvatan *et al.*, 2011). En estos parásitos, la apoptosis es inducida por diferentes estímulos como shock calórico, especies reactivas del oxígeno (ROS), ausencia de nutrientes y anti-protozoarios como el glucantime, entre otros. Una vez que la apoptosis es desencadenada en estos parásitos, comienza la cascada de eventos bioquímicos comunes a la apoptosis de mamíferos como la producción de ROS, incremento de los niveles de Ca^{2+} citosólico, cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$), liberación de endonucleasa G y Cyt c, inducción de proteasas y ruptura del DNA (Smirlis *et al.*, 2010). De igual manera, se ha reportado que la sobrecarga de ROS y Ca^{2+} intracelular puede causar citotoxicidad y desencadenar una muerte de tipo apoptótica por dos vías: a) el estímulo inductor de apoptosis eleva los niveles de Ca^{2+} citosólico, el cual entra en la mitocondria y disminuye el $\Delta\Psi\text{m}$ generando ROS dentro de ésta a través de la vía de fosforilación oxidativa y b) el inductor de apoptosis induce la formación de ROS la cual resulta en peroxidación lipídica, la cual afecta la fluidez y/o la función de los canales de calcio, perturbando la homeostasis del calcio resultando en el incremento de Ca^{2+} y la disminución del $\Delta\Psi\text{m}$ (Esquema 1; Smirlis *et al.*, 2010).



Esquema 1. Descripción gráfica de la vía apoptótica propuesta para los integrantes de la familia Trypanosomatidae (modificado de Smirlis *et al.*, 2010).

1.4 La fosforilación de proteínas

La fosforilación y la desfosforilación juegan un papel muy importante en la regulación de las funciones de las proteínas y asimismo cada aspecto de la fisiología celular. Los procesos dinámicos y reversibles de la fosforilación de las proteínas son realizados por las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasas. Las cinasas añaden un grupo fosfato a las proteínas y las fosfatasas lo remueven (Sun *et al.*, 2012). Los cambios moleculares de las fosfatasas afectan las cascadas de señalización que regulan el ciclo de vida, la diferenciación, las interacciones célula-célula, la movilidad celular, la respuesta inmune, el transporte de iones a través de canales, la transcripción de genes, la traducción de mRNA y el metabolismo (Szöör *et al.*, 2010). En eucariontes, la fosforilación de proteínas ocurre generalmente en tres residuos de aminoácidos, la serina, la treonina y la tirosina (Sun *et*

al., 2012) y al menos la actividad del 30% de las proteínas totales son reguladas por desfosforilación (García *et al.*, 2003).

1.4.1 Las proteínas serina/treonina fosfatasas

Las proteínas fosfatasas se clasifican con base en su dominio catalítico y al residuo que desfosforilan en: proteínas tirosina fosfatasas (PTP) y proteínas serina/treonina fosfatasas (PSTP) (Gómez-Sandoval *et al.*, 2014). Las PSTP se pueden dividir en dos superfamilias basándose en la estructura primaria. Los miembros de las fosfoproteínas fosfatasas (PPP) son las tipo 1 (PP1), 2A (PP2A) y 2B (PP2B/calcineurina) y, de las proteínas fosfatasas dependientes de metales (PPM) está la proteína fosfatasa 2C (PP2C) cuya estructura es un monómero y su actividad enzimática es dependiente de magnesio (Mg^{2+}) o manganeso (Mn^{2+}) (Aburai *et al.*, 2010).

1.4.2 La proteína fosfatasa PP2C

La proteína fosfatasa PP2C pertenece a la familia de las PPM y representa a una amplia familia de proteínas fosfatasas altamente conservadas dentro del genoma humano que pueden expresar, al menos, 22 isoformas. Las plantas poseen muchos más genes para PP2C en comparación con los mamíferos, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* tiene 80 genes y la planta del arroz 78 genes. En células de mamíferos la principal función de la PP2C es la regulación de las señales ante el estrés, en la diferenciación celular, en el crecimiento celular, en la apoptosis y en el metabolismo celular (Shi, 2009). La PP2C representa una diversa familia de enzimas que comprenden seis productos génicos

(α , β , γ , δ , Wip1 y calmodulina dependiente de Ca^{2+}), sin embargo, han sido descubiertas dos isoformas de la PP2C α (α -1 y α -2) para el humano y cinco isoformas de la PP2C β (β -1, β -2, β -3, β -4 y β -5) para el ratón, las cuales son producto del *splicing* alternativo (Sim *et al.*, 2003). A pesar de todos los estudios, todavía queda mucho por aprender acerca del mecanismo molecular de la PP2C, que tiene un gran número de isoformas codificadas por diferentes genes. Las diferentes isoformas tienen distintas secuencias, distintos dominios y estas isoformas también presentan diferentes funciones, patrones de expresión y localización subcelular que han sido poco estudiados (Shi, 2009).

1.5 Inhibidores de proteínas fosfatasas

En años anteriores se ha dado un aumento en el número de reportes acerca de pequeñas moléculas inhibitoras de las proteínas fosfatasas tanto de la familia PPP como de la familia PPM, por ejemplo, la cantaridina, el *thyriferyl-23-acetate*, la *isopalinurin*, la dragmacidina-E y la fostriecina (McCluskey *et al.*, 2001). El interés por estas moléculas se da porque han mostrado una inhibición selectiva de las proteínas fosfatasas como a continuación se menciona.

A) PP1 y PP2A

Un enlace interesante entre la PP1 y la PP2A es la sensibilidad que comparten, quizá como consecuencia a su homología, hacia una diversa familia de productos naturales. Éstos compuestos son inhibidores potentes y competitivos para PP1 y PP2A e incluyen a la tautomicina, la caliculina-A y el ácido okadaico. La tautomicina es un potente inhibidor de la PP1 a concentraciones de 1nM y en concentraciones 10 veces mayor (10nM) inhibe a PP2A. La caliculina-A inhibe tanto a PP1 como a PP2A en concentraciones que van de

0.5-1nM. El ácido okadaico es un potente inhibidor de la PP2A a concentraciones de 2nM, mientras que para PP1 se necesitan concentraciones de 60-200nM (McCluskey *et al.*, 2001; Szöör, 2010).

B) PP2B

Otro ejemplo claro es la PP2B, la cual puede ser inhibida por la ciclosporina-A la cual evita que la PP2B desfosforile la proteína blanco (McCluskey *et al.*, 2001). Dicha PP2B es inhibida por el ácido okadaico en concentraciones de 10mM (Szöör, 2010).

C) PP2C

Se ha reportado que la proteína fosfatasa PP2C puede ser inhibida por el compuesto sanguinarina, el cual ha resultado ser sumamente específico y potente para dicha proteína (Aburai, *et al.*, 2010).

1.5.1 La sanguinarina

La sanguinarina es un alcaloide benzo[c]fenantridina aislado de la planta *Sanguinaria canadensis* y se le conoce un gran espectro de actividades biológicas, tales como anti-microbianas, anti-fúngicas, anti-inflamatorias, anestesia local e incluso citotoxicidad contra varias líneas celulares tanto normales como transformadas (Malikova *et al.*, 2006). La unión de la sanguinarina a DNA y RNA y la inhibición de la enzima topoisomerasa han sido relacionadas con una gran actividad anti-cancerígena. En años recientes, los alcaloides derivados de plantas han sido utilizados en la práctica clínica para la prevención o el tratamiento del cáncer y esto se ha vuelto una terapia ampliamente extendida (Vrba *et al.*, 2004). Los alcaloides son metabolitos secundarios de plantas, especialmente notables por sus actividades biológicas y su potencial uso medicinal. Los

alcaloides de plantas son abundantes en la naturaleza y poseen una toxicidad relativamente baja para los humanos comparada con la de otros compuestos químicos (Hossain *et al.*, 2011). La sanguinarina ha sido uno de estos alcaloides y se le ha puesto bastante atención al mecanismo de inducción de apoptosis. Asimismo, tratamientos con sanguinarina a diferentes concentraciones han resultado en un incremento de liberación de Cytc y Apaf-1, también se ha demostrado un aumento significativo en las proteínas pro-apoptóticas caspasa-3, caspasa-7, caspasa-8 y caspasa-9 de manera dosis dependiente en células HaCaT (Malikova *et al.*, 2006).

1.6 Participación de las proteínas fosfatasa de serina/treonina en la apoptosis

Como muchos procesos fisiológicos, la apoptosis es regulada por la fosforilación reversible de proteínas y por un equilibrio controlado en la actividad de cinasas y fosfatasas. La participación de las PSTP, cuyas familias se han mencionado anteriormente, aún no han sido estudiadas totalmente en el proceso apoptótico. Como ejemplo la PP2A que es una fosfatasa que desfosforila a Bad, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 cuya habilidad para heterodimerizarse con proteínas de supervivencia como Bcl-X y Bcl-2 y promover la muerte celular, es desfosforilada por PP2A volviéndola funcional al mismo tiempo que inhibe a Bcl-2 (Kitada *et al.*, 1998; Van Hoof & Goris, 2003).

1.7 La proteína fosfatasa PP2C y la apoptosis

En estudios anteriores se ha demostrado que la PP2C α , una isoforma de los mamíferos, inhibe el crecimiento celular y activa la ruta p53. Éste último es un supresor tumoral con

efectos anti-proliferativos que incluyen inhibición de crecimiento, apoptosis y senescencia celular (Ofek *et al.*, 2003). Por otro lado, la PP2C ϵ y la PP2C δ /ILKAP regulan la producción de TNF- α , el peróxido de hidrógeno y a la integrina que induce muerte celular (Sun *et al.*, 2012). Asimismo, la PP2C en células tumorales HL60 fue inhibida por un alcaloide, la sanguinarina, la cual está implicada en diversos mecanismos apoptóticos, se propuso un modelo de inducción de apoptosis a través de la inhibición de la PP2C y la activación de la transducción de señales de la cinasa MAPp38 comprobando la muerte celular con la condensación de la cromatina, el incremento en la actividad de caspasas y la fragmentación del DNA (Aburai *et al.*, 2010).

1.8 Las proteínas cinasas activadas por mitógenos

Las MAPK tienen un papel importante en algunos procesos celulares, incluyendo el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis. Las MAPK están organizadas en tres niveles, las cuales consisten en la MAPK, el activador de la MAPK (MAPK cinasa) y el activador de la MAPKK (MAPKK cinasa) (Koul *et al.*, 2013). Las MAPK de mamíferos son activadas por una gran variedad de estímulos, como son shock osmótico, exposición a la radiación ultravioleta, citocinas, factores de crecimiento, antígenos, toxinas y medicamentos (Munshi *et al.*, 2013). Como ejemplo de la participación de las MAPK en los procesos celulares arriba mencionados están los estudios que han demostrado que la exposición de células tumorales a la radiación ionizante resulta en la activación de múltiples vías de señalización, las cuales son mediadas por la superfamilia de las MAPK y determinan la supervivencia o muerte de las células expuestas (Munshi *et al.*, 2013). En células de mamíferos se han identificado cuatro vías principales de las MAPK: la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), ERK5, la cinasa *c-jun* N-terminal (JNK) y la

cinasa MAPp38. La vía de la cinasa MAPp38 está asociada con la producción de citocinas, la inflamación, el crecimiento celular, la diferenciación celular y la apoptosis (Yang *et al.*, 2010). La cinasa MAPp38 tiene un papel dual puesto que puede tanto mediar la supervivencia celular como mediar la muerte celular dependiendo no sólo del tipo de estímulo sino del tipo celular; adicionalmente y como ejemplo, la cinasa MAPp38 puede modular la supervivencia y la migración e invasión de tumores metastásicos (Koul *et al.*, 2013). Aunque en mamíferos la vía de de las MAPK ha sido ampliamente estudiada, en el parásito *Leishmania* su estudio es menos profundo y de acuerdo a análisis genómicos, existen 17 MAPK en el género *Leishmania* siendo por lo tanto una de las familias de proteínas cinasas más extensa en comparación con los mamíferos (Horjales *et al.*, 2012).

1.8.1 Las proteínas cinasas activadas por mitógenos del parásito *Leishmania* spp.

Las MAPK son mediadores de transducción de señales ampliamente estudiadas en eucariontes y, como ya se mencionó, regulan procesos celulares importantes. Aunque se han identificado 17 MAPK en *Leishmania*, las descripciones de sus funciones en el parásito aún son escasas, por ejemplo: la MAPK de *Leishmania mexicana*, LmxMPK1, es esencial para la diferenciación de promastigote a amastigote y para la supervivencia del amastigote en las células infectadas del hospedero mamífero; la LmxMPK2 es esencial para establecer la infección en ratones BALB/c; la LmxMPK3 y la LmxMPK9 están involucradas en la regulación de la longitud del flagelo en los promastigotes (Ashutosh *et al.*, 2012; Bengs *et al.*, 2005). Asimismo, la sobreexpresión de las MAPK de *L. major*, LmaMPK4, LmaMPK7 y LmaMPK10 inducen la actividad de fosfotransferasa; la activación de la LmaMPK7 regula el crecimiento del amastigote y la activación de la LmxMPK4 controla diferenciación del parásito (Brumlik *et al.*, 2011; Horjales *et al.*, 2012), La vía de

las MAPK es una de las más antiguas, es evolutivamente conservada y su activación requiere de la fosforilación de proteínas en ciertos residuos de aminoácidos (Kar *et al.*, 2010).

II. Justificación

En nuestro laboratorio se han clonado y caracterizado las proteínas fosfatasas PP2C de *L. major* y *L. mexicana* y estas proteínas presentan características bioquímicas semejantes a la proteína fosfatasa PP2C de mamíferos como son: mayor actividad enzimática con Mn^{2+} en comparación al Mg^{2+} y un pH de 8 (Escalona-Montaño, 2007; Zuñiga-Fabian, 2014). Además, se ha identificado la proteína PP2C en el saco flagelar de los promastigotes metacíclicos de *L. major* mediante microscopía electrónica (Escalona-Montaño, 2007). Por otro lado, en nuestro laboratorio se han estado incubando los promastigotes de *L. major* con el compuesto sanguinarina a concentraciones de 250 nM – 1 μ M durante tres días demostrando que inhibe el crecimiento de los promastigotes. Sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo de inhibición que ejerce la sanguinarina sobre los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*. Como ya se mencionó, la proteína fosfatasa PP2C en líneas celulares tumorales participa en la desfosforilación de Bad, proteína importante en la vía de la apoptosis. A pesar de esto, en *Leishmania* no se ha reportado una apoptosis semejante a la de mamíferos u otros eucariontes. Es por esto que el objetivo de este trabajo es investigar si la PP2C participa en la modulación de la apoptosis de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* cuando es inhibida con el compuesto sanguinarina.

III. Hipótesis

La inhibición de la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C por la sanguinarina induce la apoptosis en los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*, así como la fosforilación de la cinasa MAPp38.

IV. Objetivo

4.1 Objetivo general

Analizar la participación de la proteína fosfatasa PP2C en la apoptosis de promastigotes de *Leishmania major* y *Leishmania mexicana* así como la fosforilación de la cinasa MAPp38

4.2 Objetivos particulares

4.2.1 Analizar el efecto del compuesto sanguinarina en la morfología de los promastigotes.

4.2.2 Realizar una curva de crecimiento de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* en presencia de la sanguinarina.

4.2.3 Determinar la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C en los extractos de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* después de ser incubados con la sanguinarina.

4.2.4 Evaluar la apoptosis de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* incubados con la sanguinarina mediante las técnicas de TUNEL, citometría de flujo y Western blot.

4.2.5 Analizar por ensayos de Western blot la fosforilación de la cinasa MAPp38 en los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* después de la incubación con la sanguinarina.

4.2.6 Identificar por ensayos de Western blot las proteínas tales como Bcl-2 y Bax que participan en la apoptosis en los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* después de la incubación con la sanguinarina.

V. Materiales y métodos

5.1. Preparación del compuesto sanguinarina

La sanguinarina (Sigma-Aldrich, ST Louis, MO, EUA) fue disuelta en metanol quedando a una concentración final de 0.0135M la cual fue utilizada a diferentes concentraciones (50, 100, 250 nM). El volumen de metanol que correspondía a la concentración más alta de sanguinarina fue adicionado al medio de cultivo 199 con los parásitos. Éste fue utilizado como control en el cultivo de los parásitos.

5.2 Cultivo de promastigotes

La cepa de *Leishmania major* cepa Friendlin fue donada por el Dr. Santiago Martínez Calvillo (Unidad de Investigación en Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Estado de México) y la cepa de *Leishmania mexicana* MNYZ/BZ/62/M379 fue donada por el Dr. Paul Bates (Universidad de Lancaster, Lancaster, Reino Unido). Ambas cepas se mantuvieron en medio de cultivo 199 (Gibco, Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, CA, EUA) a una densidad de 0.5×10^6 parásitos/mL en un volumen final de 10 mL y temperatura de 26 °C por tres días, bajo las diferentes concentraciones de la sanguinarina. Para mantener la virulencia de la cepa, se inocularon 1×10^7 promastigotes de la fase estacionaria en el cojinete plantar de ratones BALB/c. Una vez desarrolladas las lesiones, los parásitos se aislaron de acuerdo a una metodología descrita anteriormente (Wilkins-Rodríguez, *et al.*, 2010), con algunas modificaciones. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extirpó la pata infectada, la cual se maceró con el émbolo de una jeringa de 10 mL sobre una malla de nylon con un poro de 100 μm (BD Falcon, Bedford, MA, USA). La suspensión obtenida se centrifugó a 100 g

durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 2000 g durante 10 min para obtener la pastilla que correspondía a los amastigotes, se lavaron tres veces y se cultivaron en el medio arriba descrito a 26 °C para lograr la diferenciación a los promastigotes. Los parásitos se diluyeron con paraformaldehído utilizando una dilución 1:5, se contaron durante 3 días utilizando la cámara de Neubauer y se analizó su morfología mediante microscopía de contraste de fases durante 3 días.

5.3 Obtención del extracto total de promastigotes

Transcurrido el tiempo de incubación con la sanguinarina, los promastigotes se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X y se centrifugaron a 2000 g a temperatura ambiente, asimismo se realizó un último lavado con PBS 1X y se centrifugó a 2000 g a temperatura de 4 °C para obtener una pastilla. Ésta se almacenó a -70 °C hasta su uso. La pastilla obtenida fue resuspendida en amortiguador de lisis cuyos reactivos fueron: amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.4 estéril y un cóctel de inhibidores de proteasas compuesto por leupeptin 0.002 µg/mL, aprotinina 0.01 µg/mL y benzamidina 1mM. La pastilla resuspendida se lisó utilizando un sonicador (Sonics, Vibracell™ Newtown, CT, EUA) por un ciclo de 1 min a 4 °C y una amplitud de 30%. Los extractos fueron almacenados a -70 °C hasta su uso.

5.4 Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford

Las muestras se cuantificaron por el método de Bradford con algunas modificaciones (Bradford, 1976). En una placa de 96 pozos se realizó una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) con las concentraciones de 0 a 15 µg más el amortiguador de lisis de

los parásitos hasta completar un volumen de 100 μL . En otros pozos se añadieron 5 μL del extracto total de cada una de las condiciones de los parásitos más el amortiguador de lisis y finalmente, se añadieron 40 μL de reactivo de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a la curva estándar y a las muestras. La placa se leyó a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Biotek^R, μQuant , Winooski, VT, EUA) con un programa KC4. Las cantidades obtenidas de cada una de las condiciones se ajustaron a de 40 μg de proteína para cada condición. Todo lo anterior se realizó por duplicado.

5.5 Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa

En una placa de 96 pozos se añadió amortiguador acetato de sodio 0.2 M, 10 μg de proteína del extracto total y 10 μL del sustrato de fosfatasas p-Nitrofenilfosfato (*p*-NPP) 0.1 M en un volumen final de 100 μL . La reacción se incubó por 1 h a 37 °C y se detuvo con 20 μL de hidróxido de sodio 2 N para analizarse en un espectrofotómetro (Biotek^R, μQuant) a una longitud de onda de 405 nm.

5.6 Evaluación de la apoptosis en los promastigotes por la técnica de TUNEL

Los promastigotes lavados por el método descrito anteriormente se adhirieron en un portaobjetos y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron durante 10min con metanol-peróxido de hidrógeno al 3%, con el fin de bloquear la actividad de las peroxidasas endógenas. Después de lavar las muestras tres veces con PBS, se incubaron con la solución permeabilizadora (Tritón X-100 al 0.1% en citrato de sodio al 0.1%) en hielo durante 2 min. Nuevamente las muestras se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con la solución enzima del kit de

TUNEL (In situ Cell Death Detection Kit; Roche Molecular Biologicals, Mannheim, Alemania) durante 1 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS 1X y la actividad de la peroxidasa se reveló con aminoetilcarbazol y se contratiñó con hematoxilina. Las muestras se analizaron en el microscopio AxioPlan II Zeiss (Zeiss, Thornwood, NY, EUA) y de 100 parásitos se contaron aquellos que presentaron el núcleo teñido de marrón.

5.7 Determinación de la translocación de la fosfatidilserina por citometría de flujo

Una vez obtenida la pastilla, se resuspendió en 30 μ L de un amortiguador de unión (10 mM de HEPES-NaOH pH 7.4, 140 mM de NaCl y 25 mM de CaCl_2). Los tubos se centrifugaron a 2000 g por 5 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 30 μ L del amortiguador antes mencionado y se agregaron 2 mL de anexina-V FITC (BD Pharmingen, San José, CA, EUA) y 0.5 μ L de 7-ADD (Sigma-Aldrich). Los tubos se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, los tubos se centrifugaron a 2000 g por 5 min y se resuspendieron en 1 mL del mismo amortiguador. Se analizaron en el citómetro FACSsort con el software FlowJo. Los resultados obtenidos se graficaron y se realizó el análisis estadístico de los datos se analizó por la prueba ANOVA ($p < 0.05$).

5.8 Análisis de fosforilación de la cinasa MAPp38, Bcl-2, Bax y de la poli-ADP-ribosa polimerasa por Western blot

Para el análisis de la cinasa MAPp38 se realizó una electroforesis utilizando un gel al 10% SDS-PAGE y para las proteínas Bcl-2, Bax y poli-ADP-ribosa polimerasa un gel al 15%. Se utilizaron 40 μ g de proteína de cada una de las condiciones arriba mencionadas. Para

la electroforesis se aplicó un voltaje de 70 V por 30 min y después a 120 V hasta finalizar. Transcurrido el tiempo, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore, Darmstadt, Alemania) previamente activada en metanol por 3 min y lavada con agua desionizada tres veces cada 5 min para después equilibrar en buffer de transferencia. La membrana de PVDF se colocó en una cámara de electrotransferencia semiseca (Bio-Rad Laboratories) a 20 V durante 60 min. Las membranas se bloquearon con leche en polvo (Bio-Rad) al 5%, se lavaron con solución amortiguadora de Tris-Tween (TBST) 1X seis veces cada 10 min y fueron incubadas con los anticuerpos correspondientes α -p38 con una dilución 1:500, α -Bcl2 y α -Bax con una dilución 1:1000 y 1:600 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) y del α -poli-ADP-ribosa polimerasa se utilizó a un volumen de 0.5 μ L/mL (Roche Diagnostics, Sant Cugat del Valles, Barcelona, España) toda la noche en agitación constante a 4 °C. Las membranas se lavaron nuevamente con TBST 1X seis veces cada 10 min. Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios anti-mouse IgG-HRP y anti-rabbit IgG-HRP (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA); diluidos 1:5000 en leche al 5%. Después de lavar seis veces con TBST 1X cada 10 min, las membranas se revelaron usando un sustrato quimioluminiscente (Millipore) y se expusieron a películas para rayos-X (Kodak BioMax, MR).

VI. Resultados

6.1 Análisis de la morfología de los promastigotes de ambas especies de *Leishmania* incubados tres días con la sanguinarina. Cuando se analizó el efecto de la sanguinarina en la morfología de los promastigotes de *L. major* se encontró que los promastigotes fueron alterados en su morfología a partir de la concentración 250nM en el día 3 (Fig.1.3, panel e). Para las condiciones restantes en los días 1 y 2, se observó que hubo cambios morfológicos con respecto al tamaño celular como lo son el tamaño y la forma de los promastigotes (Fig. 1.1, Fig. 1.2). Para *L. mexicana* se observó que la morfología se encuentra alterada desde el día 2 en la concentración 50nM (Fig. 1.5, panel c). En el día 3 a la concentración 250nM de *L. mexicana* se observó un patrón de redondeo celular (Fig. 1.6, panel e).

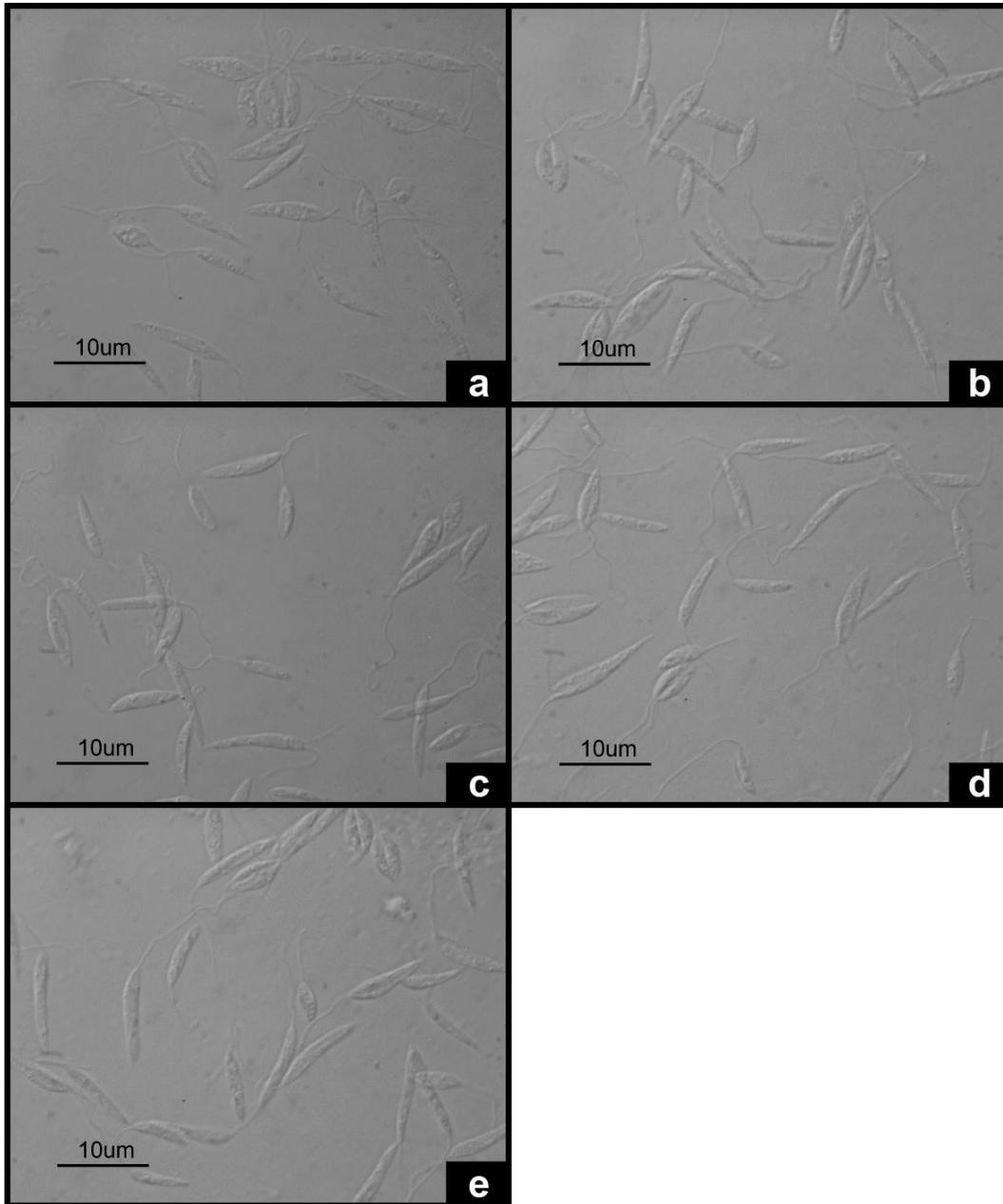


Figura 1.1 Morfología de los promastigotes de *L. major* en el día 1 de cultivo incubados con la sanguinarina. Micrografía de los promastigotes que fueron incubados con diferentes concentraciones de sanguinarina: **a)** sin inhibidor, **b)** metanol, **c)** 50, **d)** 100 **e)** 250 nM. Se incubaron 0.5×10^6 parásitos/mL inicialmente en un volumen final de 10 mL y se diluyeron con paraformaldehído utilizando una dilución 1:5 y se analizó su morfología mediante microscopía de contraste de fases.

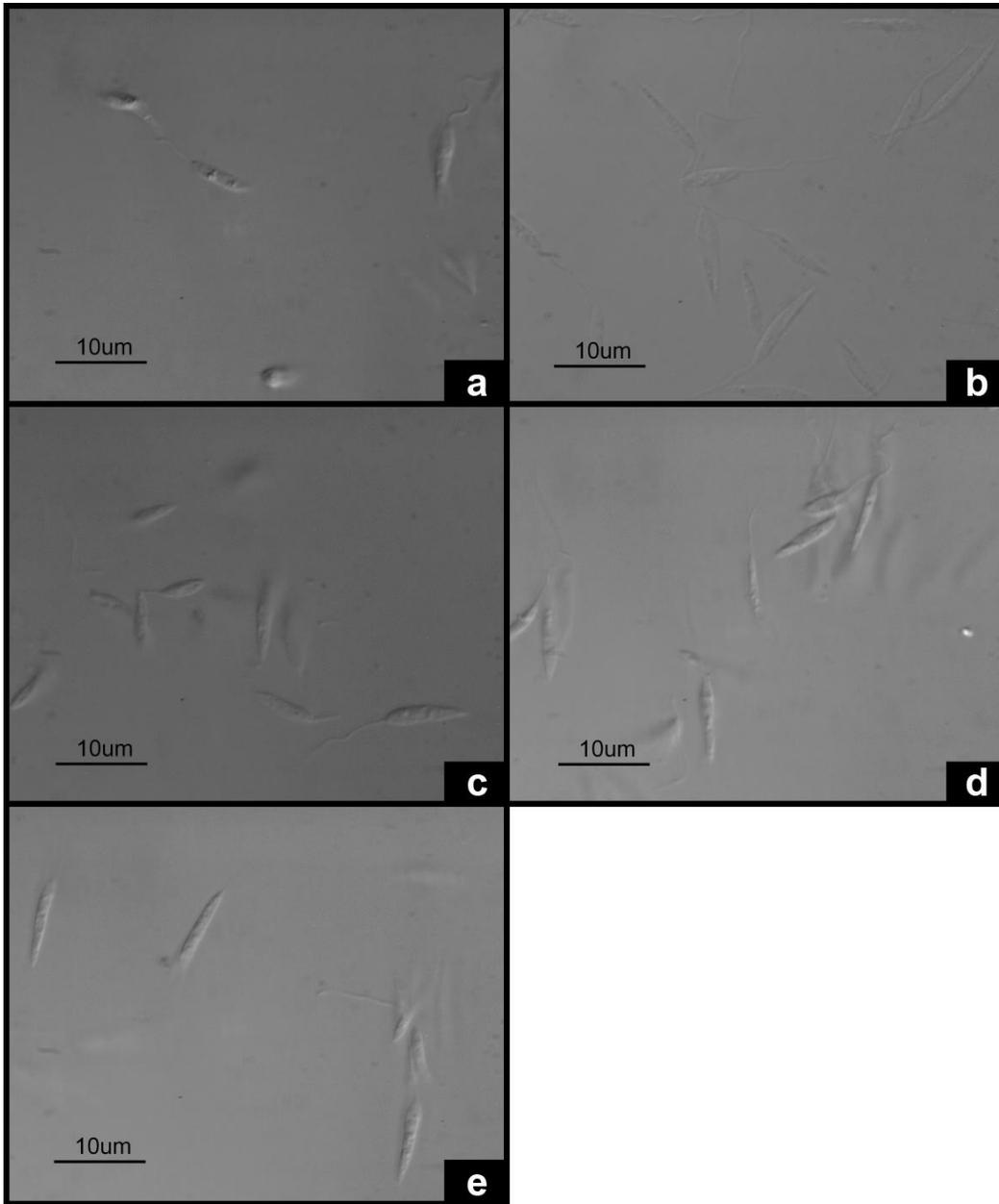


Figura 1.2 Morfología de los promastigotes de *L. major* en el día 2 de cultivo incubados con la sanguinarina. Micrografía de los promastigotes que fueron incubados con diferentes concentraciones de sanguinarina: **a)** sin inhibidor, **b)** metanol, **c)** 50, **d)** 100 **e)** 250 nM. Se incubaron 0.5×10^6 parásitos/mL inicialmente en un volumen final de 10 mL y se diluyeron con paraformaldehído utilizando una dilución 1:5 y se analizó su morfología mediante microscopía de contraste de fases.

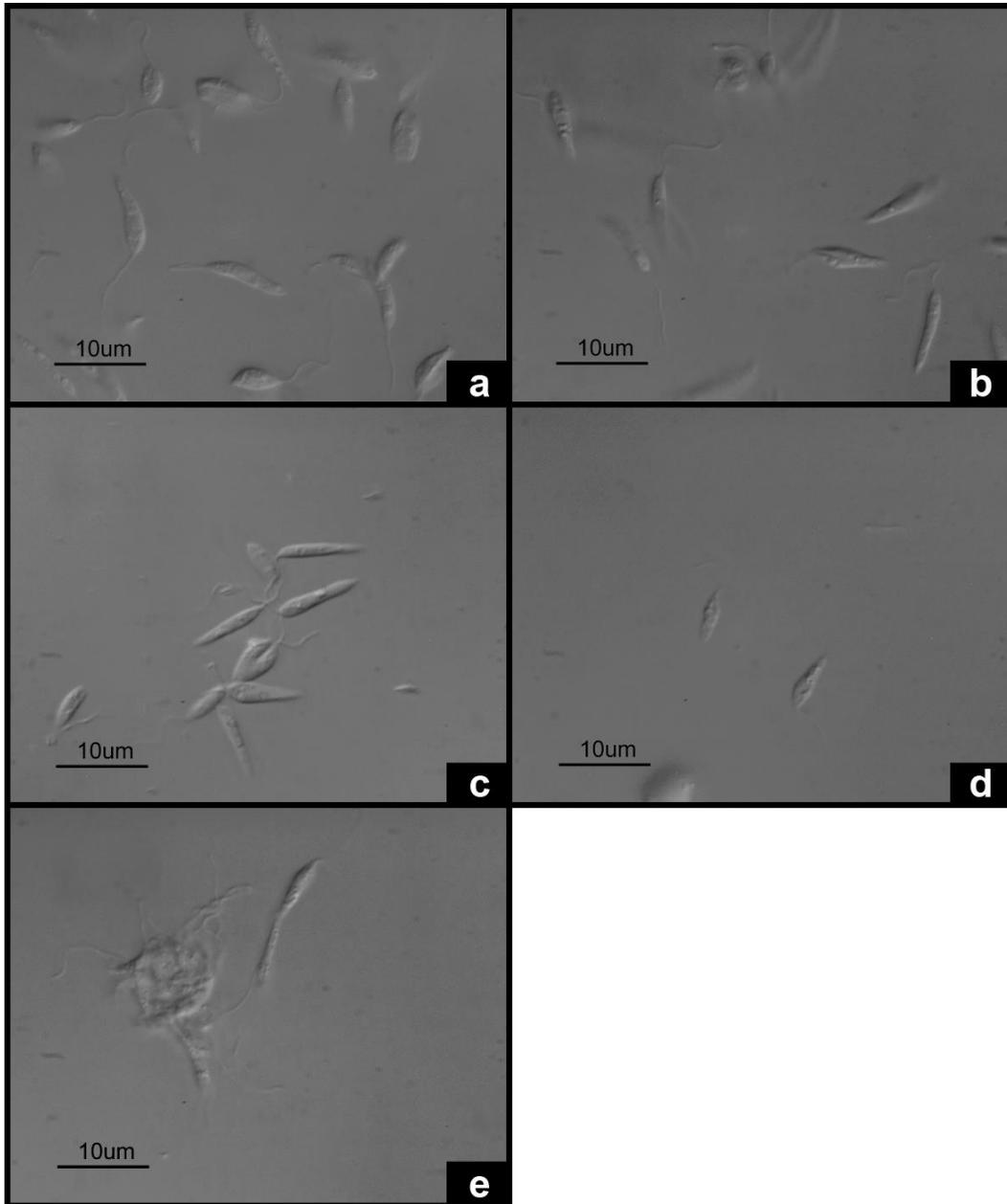


Figura 1.3 Morfología de los promastigotes de *L. major* en el día 3 de cultivo incubados con la sanguinarina. Micrografía de los promastigotes que fueron incubados con diferentes concentraciones de sanguinarina: **a)** sin inhibidor, **b)** metanol, **c)** 50, **d)** 100 **e)** 250 nM. Se incubaron 0.5×10^6 parásitos/mL inicialmente en un volumen final de 10 mL y se diluyeron con paraformaldehído utilizando una dilución 1:5 y se analizó su morfología mediante microscopía de contraste de fases.

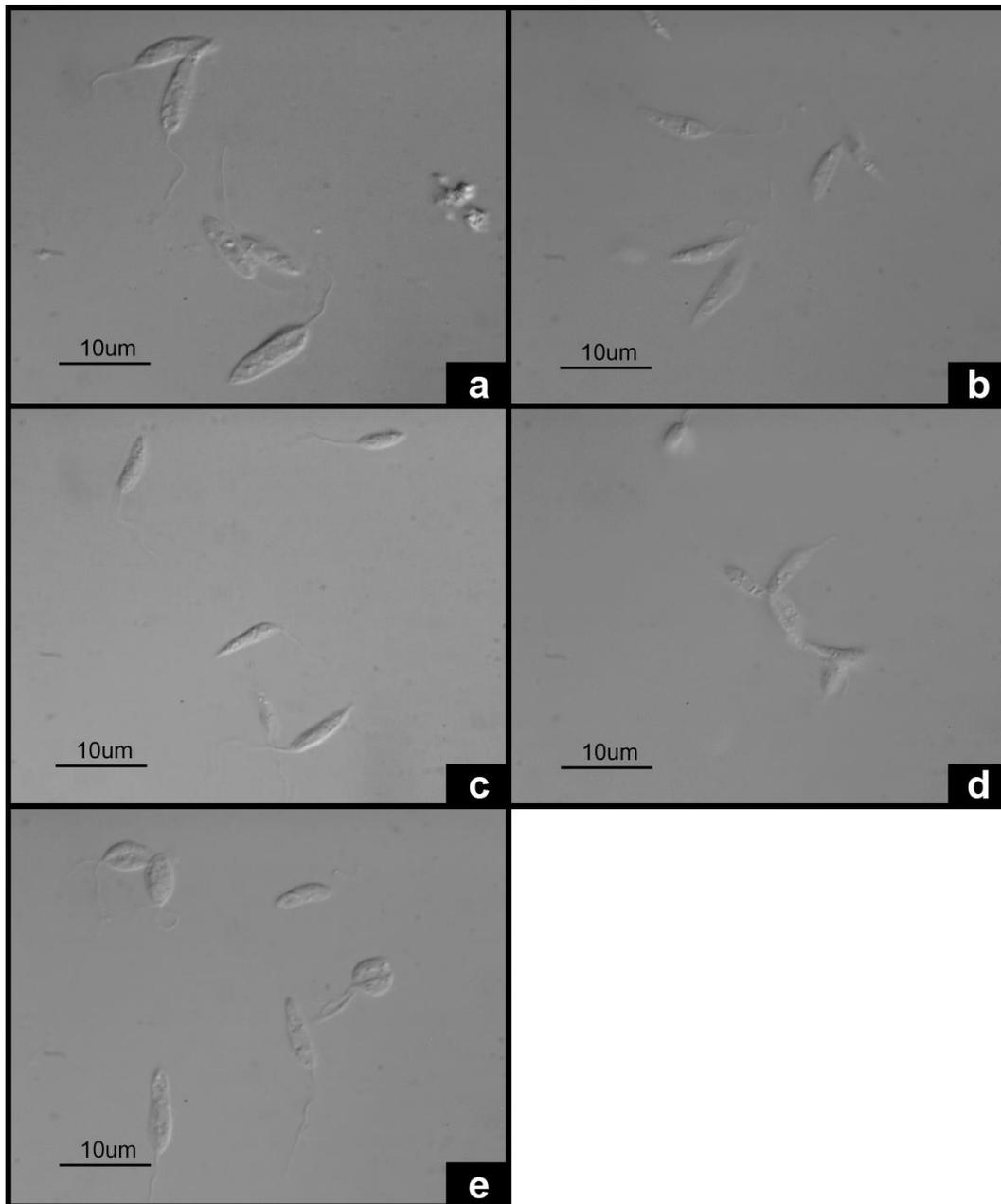


Figura 1.4 Morfología de los promastigotes de *L. mexicana* en el día 1 de cultivo incubados con la sanguinarina. Micrografía de los promastigotes que fueron incubados con diferentes concentraciones de sanguinarina: **a)** sin inhibidor, **b)** metanol, **c)** 50, **d)** 100 **e)** 250 nM. Se incubaron 0.5×10^6 parásitos/mL inicialmente en un volumen final de 10 mL y se diluyeron con paraformaldehído utilizando una dilución 1:5 y se analizó su morfología mediante microscopía de contraste de fases.

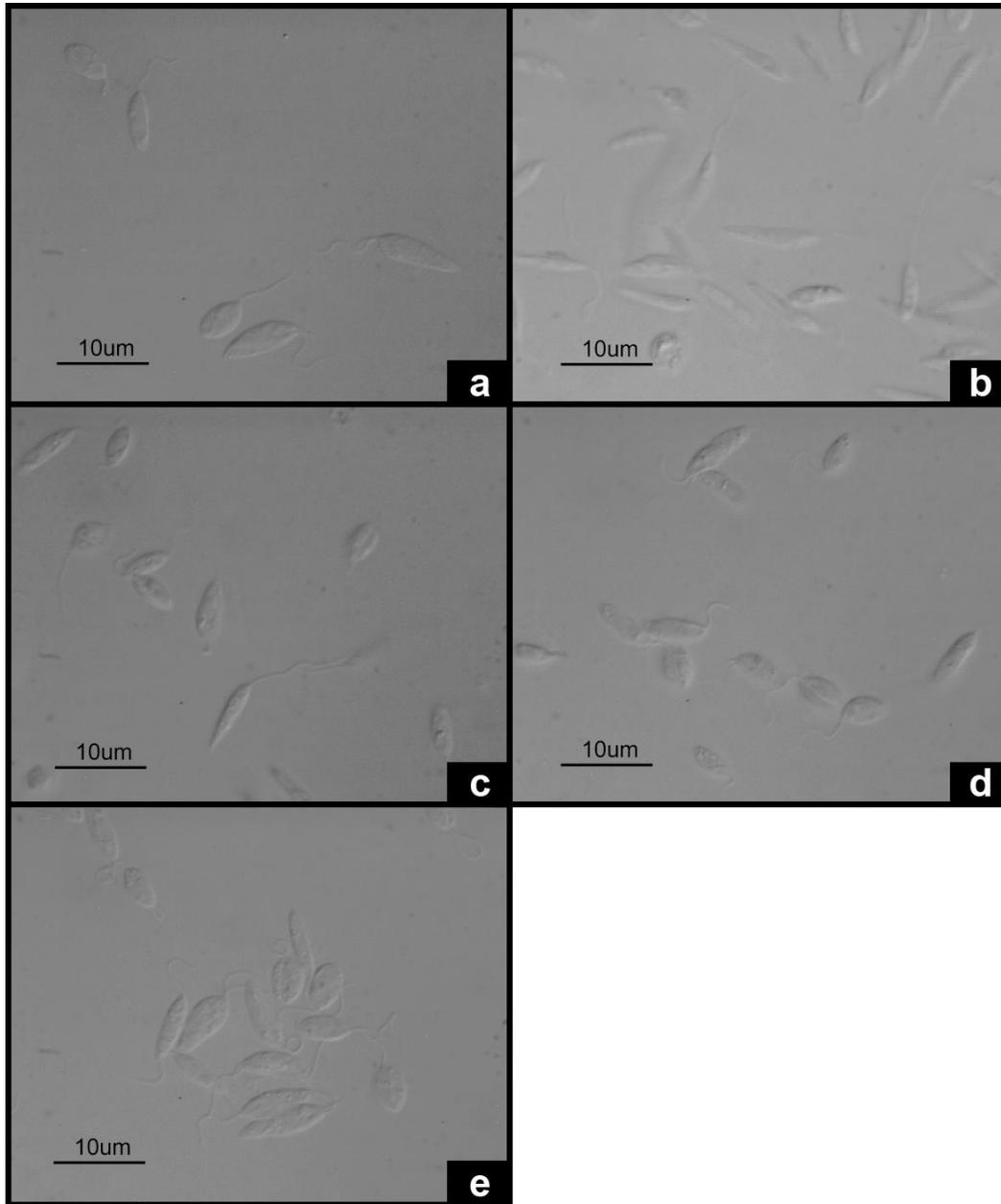


Figura 1.5 Morfología de los promastigotes de *L. mexicana* en el día 2 de cultivo incubados con la sanguinarina. Micrografía de los promastigotes que fueron incubados con diferentes concentraciones de sanguinarina: **a)** sin inhibidor, **b)** metanol, **c)** 50, **d)** 100 **e)** 250 nM. Se incubaron 0.5×10^6 parásitos/mL inicialmente en un volumen final de 10 mL y se diluyeron con paraformaldehído utilizando una dilución 1:5 y se analizó su morfología mediante microscopía de contraste de fases.

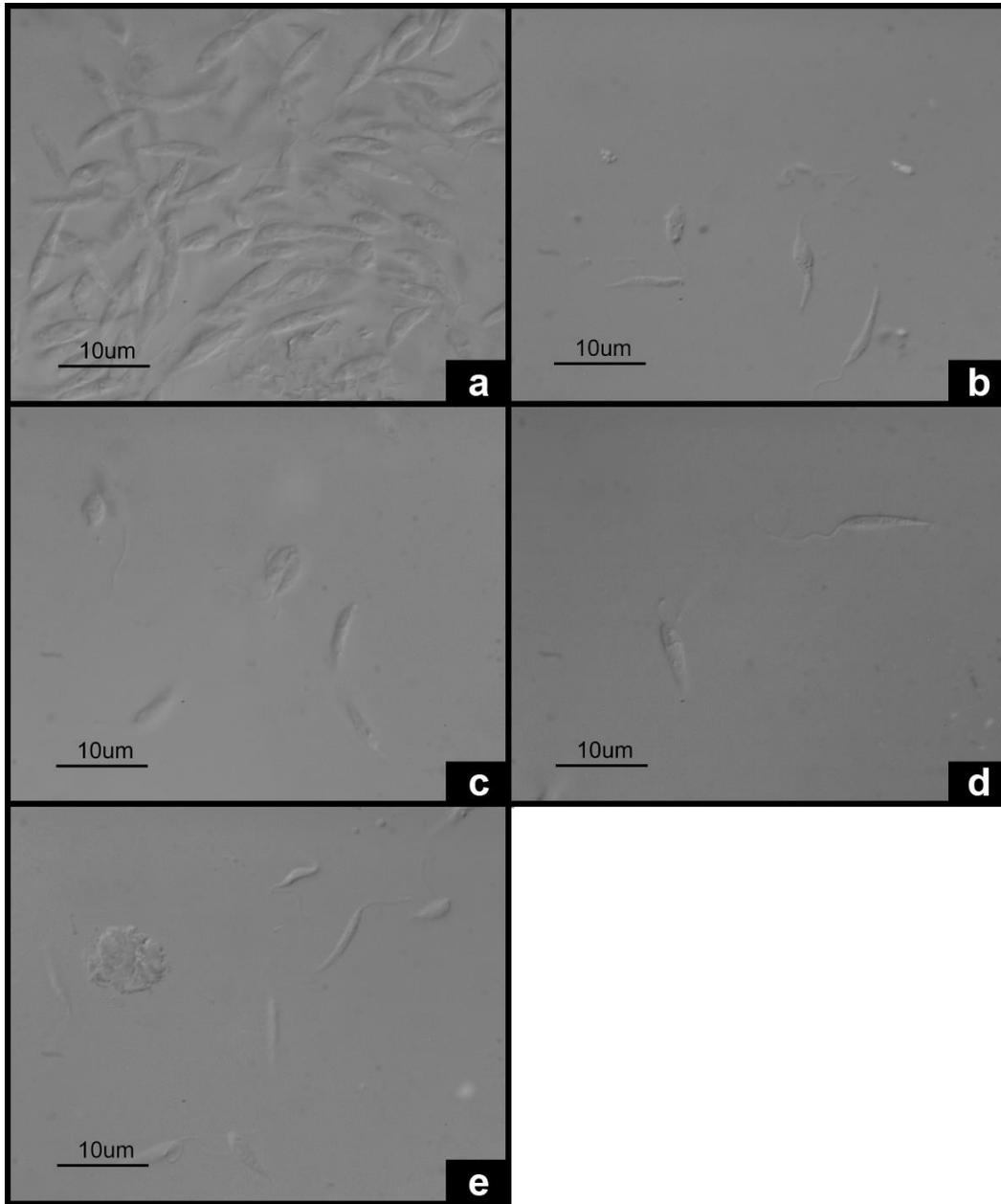
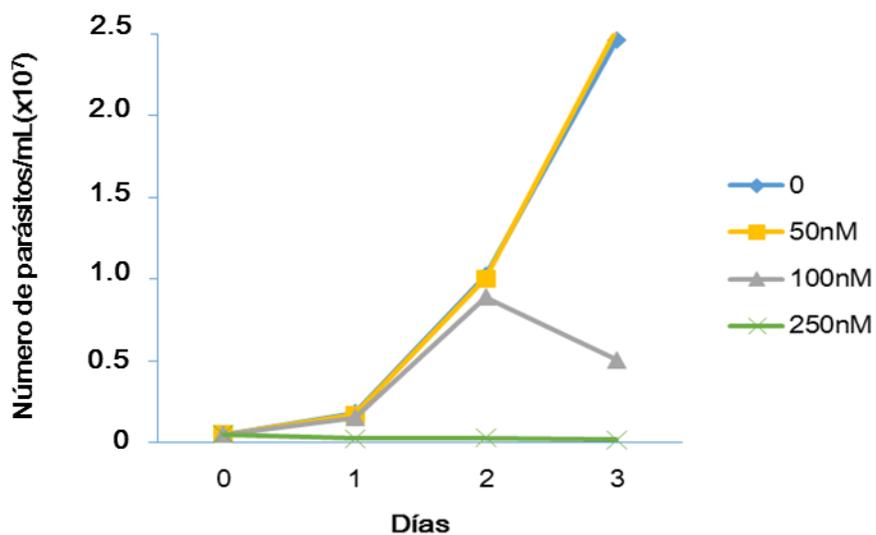


Figura 1.6 Morfología de los promastigotes de *L. mexicana* en el día 3 de cultivo incubados con la sanguinarina. Micrografía de los promastigotes que fueron incubados con diferentes concentraciones de sanguinarina: **a)** sin inhibidor, **b)** metanol, **c)** 50, **d)** 100 **e)** 250 nM. Se incubaron 0.5×10^6 parásitos/mL inicialmente en un volumen final de 10 mL y se diluyeron con paraformaldehído utilizando una dilución 1:5 y se analizó su morfología mediante microscopía de contraste de fases.

6.2 Crecimiento de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* en presencia de la sanguinarina. Se analizó el crecimiento de los promastigotes de *L. major* en ausencia y presencia de la sanguinarina. Se encontró que presentan un crecimiento óptimo a la concentración 50 nM de sanguinarina durante los tres días de cultivo, al igual que los promastigotes a los que no se les añadió el inhibidor. Sin embargo, en la concentración 100 nM de sanguinarina se observó una disminución de aproximadamente 50% en el día 2 y una disminución de un 80% en el día 3 de cultivo con respecto a los parásitos que no fueron incubados con el inhibidor. Para la concentración de 250 nM de sanguinarina, los promastigotes de *L. major* no presentaron crecimiento desde el inicio (Fig 2 A). Al analizar los promastigotes de *L. mexicana* se encontró que el crecimiento fue muy similar en ausencia y presencia de 50 nM de sanguinarina. Sin embargo, a la concentración de 100 nM el número de parásitos disminuyó un 60% en el día 2 de cultivo y un 65% aproximadamente en el día 3 de cultivo comparado con el control de parásitos donde no se incubaron con el inhibidor. A la concentración 250 nM no se observó crecimiento de los parásitos desde el inicio (Fig. 3 B)

A)



B)

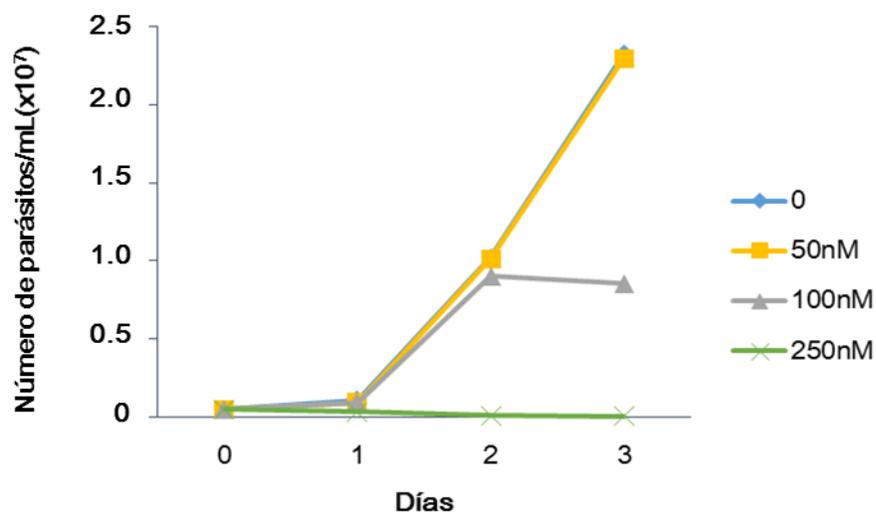


Figura 2. Curvas de crecimiento de los promastigotes de *Leishmania* incubados con la sanguinarina durante 3 días de cultivo. Promastigotes de *L. major* (A) y de *L. mexicana* (B). Se incubaron 0.5×10^6 parásitos/mL inicialmente en un volumen final de 10 mL, los parásitos se diluyeron con paraformaldehído utilizando una dilución 1:5 y se contaron durante 3 días utilizando la cámara de Neubauer

6.3 Actividad enzimática de la fosfatasa en los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* en presencia de la sanguinarina En la Fig.3 se muestra el efecto de la sanguinarina en la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C presente en extractos totales de *L. major* y *L. mexicana*. Se encontró una inhibición dosis-dependiente, es decir, a mayor concentración de sanguinarina, mayor inhibición de la actividad enzimática de fosfatasa, siendo ligeramente mayor en *L. mexicana* con respecto a *L. major*.

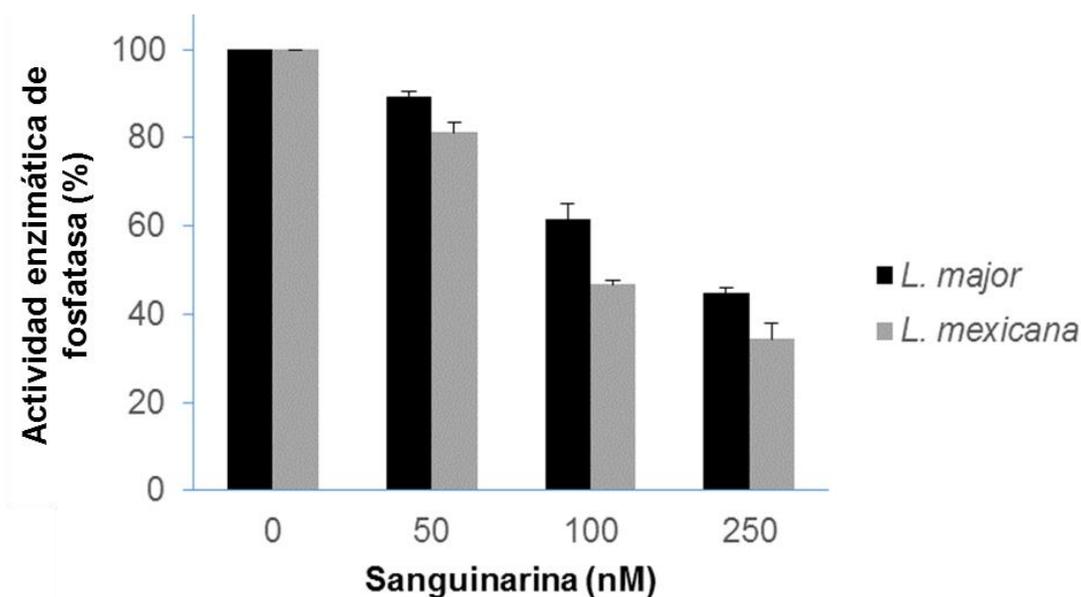


Figura 3. Actividad enzimática de fosfatasa en los extractos totales de *L. major* y *L. mexicana*. Efecto de la sanguinarina (50, 100 y 250 nM) en la actividad de fosfatasa presente en los extractos totales de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* obtenidos por sonicación, ajustados a 10 μ g de proteína. Gráfica representativa de tres experimentos independientes.

6.4 Análisis de la fragmentación del DNA de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* incubados con la sanguinarina. En la Fig. 4.1 se analizó por la técnica de TUNEL la fragmentación del DNA en los promastigotes de *L. major* incubados a diferentes concentraciones de sanguinarina (50, 100 y 250nM). En los promastigotes de *L. major* se observó que en ausencia del inhibidor y con el control metanol (paneles A, B y F) existe aproximadamente un 30% de parásitos en apoptosis basal. En la concentración 50nM de sanguinarina se observó cerca de un 65% de parásitos en apoptosis (paneles C y F). A partir de la concentración 100nM de sanguinarina se observó un 80% de parásitos en apoptosis, aproximadamente (paneles D y F). En la concentración 250nM de sanguinarina se observó un 90% de parásitos en apoptosis (paneles E y F).

En la Fig. 4.2 se analizó por la técnica de TUNEL la fragmentación del DNA en los promastigotes de *L. mexicana* incubados a diferentes concentraciones de sanguinarina (50, 100 y 250nM). En los promastigotes de *L. mexicana* se observó que en ausencia del inhibidor y con el control metanol existe aproximadamente un 35% de parásitos en apoptosis (paneles G, H y L). En la concentración 50nM de sanguinarina se observó cerca de un 70-75% de parásitos en apoptosis (paneles I y L). A partir de la concentración 100nM de sanguinarina se observó un 80% de parásitos en apoptosis, aproximadamente (paneles J y L). En la concentración 250nM de sanguinarina se observó un 95-100% de parásitos en apoptosis (paneles K y L).

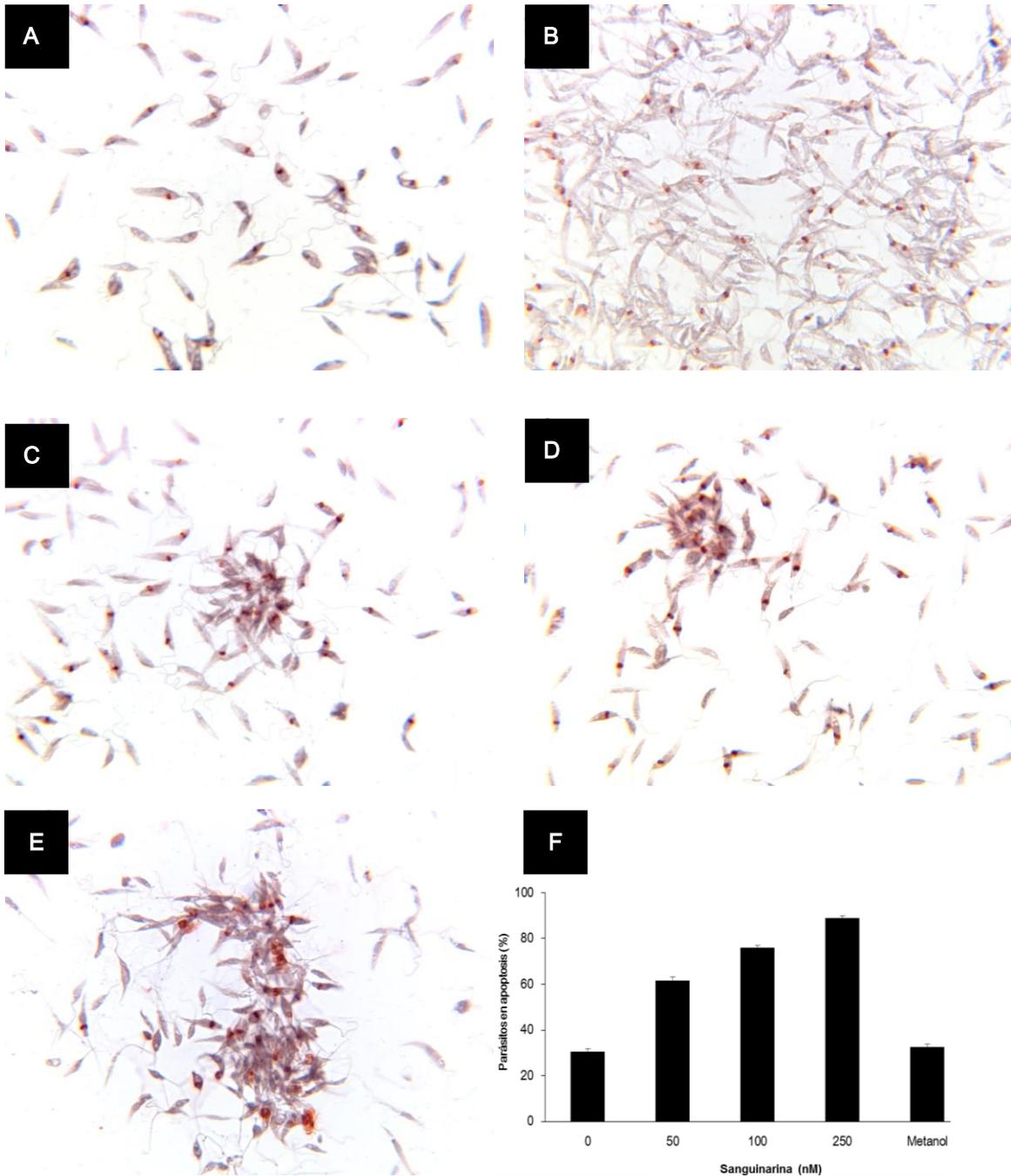


Figura 4.1 Micrografías de los promastigotes de *Leishmania major* donde se muestra la fragmentación del DNA analizada por la técnica de TUNEL. Se muestran los núcleos teñidos de los promastigotes de *L. major* bajo las diferentes condiciones experimentales: **A)** sin inhibidor, **B)** metanol, **C)** 50, **D)** 100, **E)** 250 nM. Asimismo, la gráfica muestra el porcentaje de apoptosis en los promastigotes de *L. major* (**F**). De 100 parásitos se contaron aquellos que presentaron el núcleo teñido de marrón.

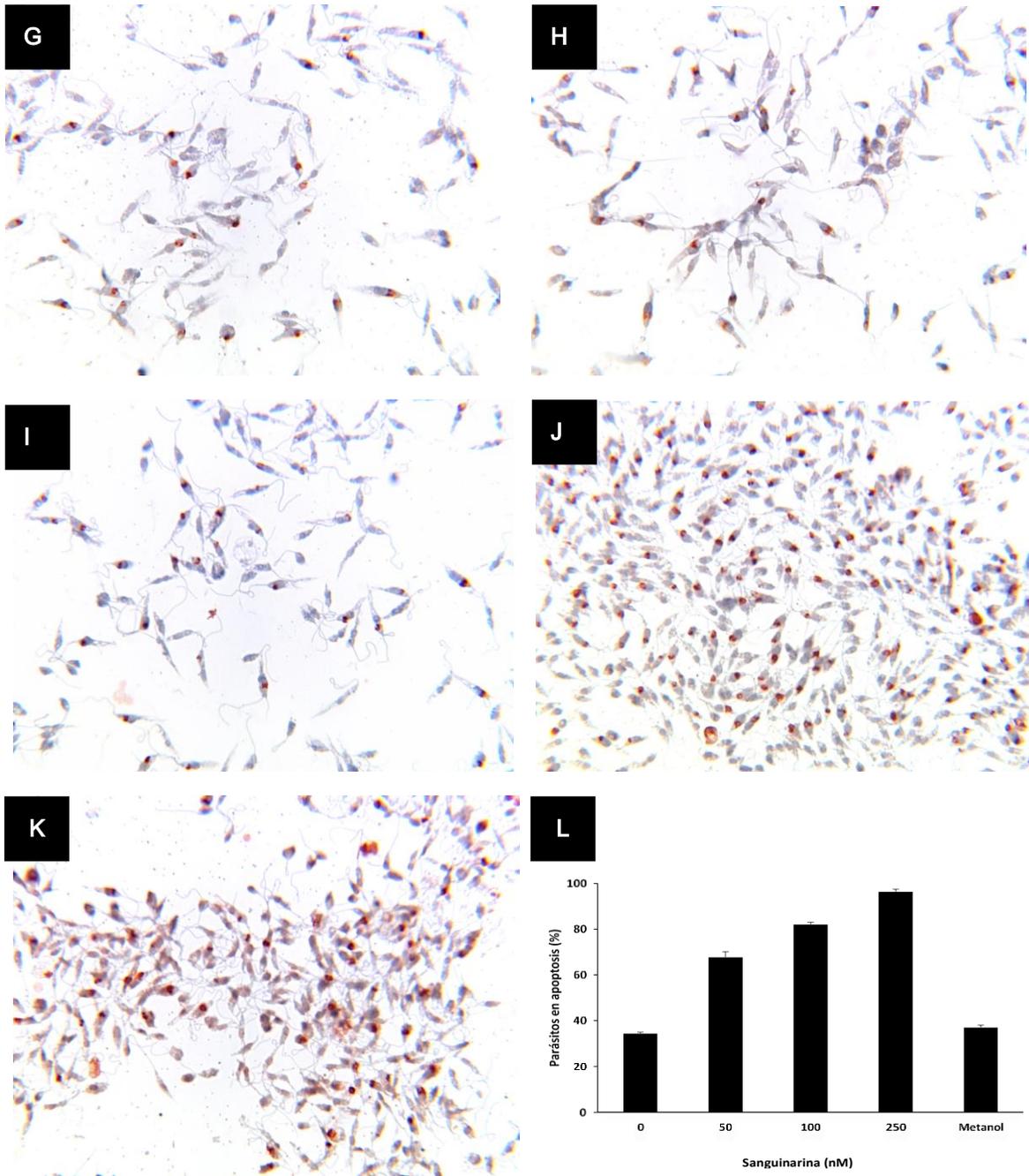
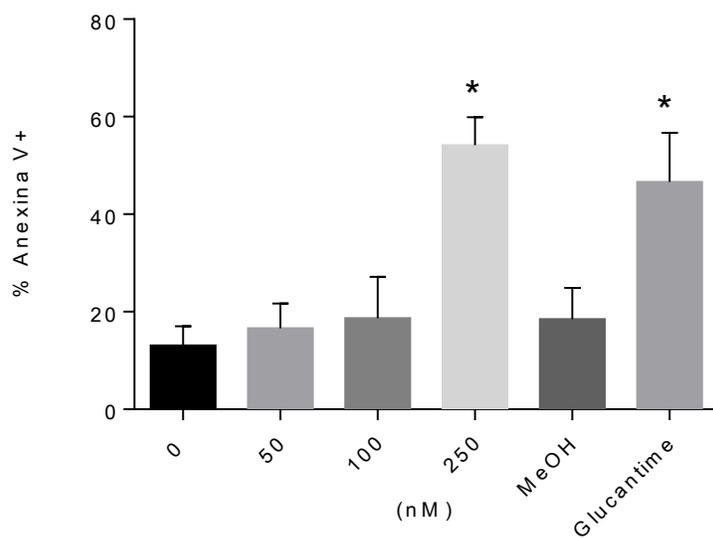


Figura 4.2 Micrografías de los promastigotes de *Leishmania mexicana* donde se muestra la fragmentación del DNA analizada por la técnica de TUNEL. Se muestran los núcleos teñidos de los promastigotes de *L. mexicana* bajo las diferentes condiciones experimentales: **G)** sin inhibidor, **H)** 50nM, **I)** 100nM, **J)** 250nM, **K)** metanol. Asimismo, la gráfica muestra el porcentaje de apoptosis en los promastigotes de *L. major* (**L**). De 100 parásitos se contaron aquellos que presentaron el núcleo teñido de marrón.

6.5 Análisis de la traslocación de fosfatidilserina por citometría de flujo en los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*. En la Fig. 5 A se encontró que los promastigotes de *L. major* presentan traslocación de fosfatidilserina basal de aproximadamente 20% en ausencia del inhibidor. Cuando se incubaron los parásitos con las concentraciones 50, 100 y 250 nM de sanguinarina se notó un incremento del 20, 30 y 60%, respectivamente, en comparación con los promastigotes que no fueron incubados con el inhibidor, siendo ésta mayor en los parásitos incubados con 250 nM de sanguinarina y con el control positivo glucantime, cuyos valores se acercan al 60% y al 50%, respectivamente.

En la Fig. 5 B se encontró que los promastigotes de *L. mexicana* presentan traslocación de fosfatidilserina basal de aproximadamente 10% en ausencia del inhibidor. Cuando se incubaron los parásitos con la concentración 50 nM no hubo incremento en la traslocación de fosfatidilserina en comparación con los promastigotes que no fueron incubados con el inhibidor. Sin embargo, con las concentraciones 100 y 250 nM de sanguinarina se notó que un incremento del 2 y 20% en la traslocación de fosfatidilserina, en comparación con los promastigotes que no fueron incubados con el inhibidor.

A) *L. major*



B) *L. mexicana*

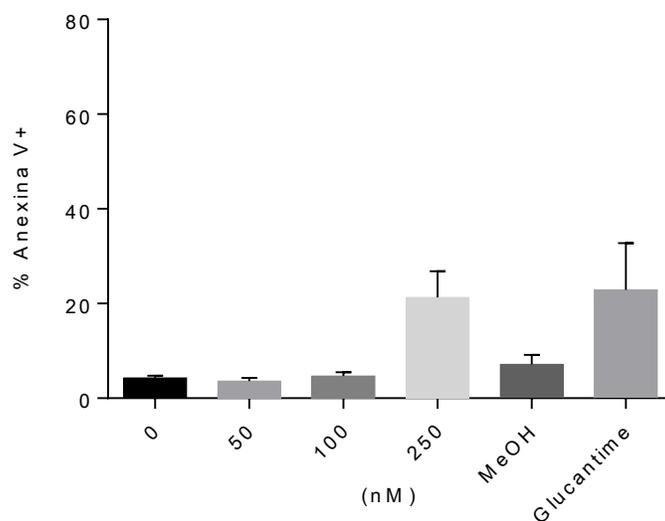


Figura 5. Traslocación de la fosfatidilserina en los promastigotes de *L. major* (A) y *L. mexicana* (B) incubados tres días con el compuesto sanguinarina. Gráfica en porcentaje de promastigotes positivos para Annexina-V mediante la técnica de citometría de flujo de tres experimentos independientes. La traslocación de la fosfatidilserina en los promastigotes de ambas especies de *Leishmania* se determinó con Annexina-V bajo las diferentes condiciones: 0, 50, 100, 250nM, metanol y control positivo de glucantime a una concentración de 2mg/mL. Los datos fueron analizados con la prueba ANOVA, (*) = $p < 0.05$.

6.6 Identificación del marcador de apoptosis PARP en los extractos totales de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*. Se identificó la PARP en los extractos totales de los promastigotes de *L. major* que fueron incubados con 50, 100 y 250 nM de sanguinarina. Se observó que la presencia de esta proteína en todas las concentraciones de sanguinarina, sin embargo, fue mayor en los extractos totales de promastigotes incubados con 250 nM de sanguinarina pero no en los promastigotes que no fueron incubados con el inhibidor (Fig. 6, panel A). En los extractos totales de los promastigotes de *L. mexicana* se encontró la proteína PARP en las concentraciones 50, 100 y 250 nM de sanguinarina, asimismo en los promastigotes no incubados con el inhibidor (panel B). Como control de carga se utilizó la α - y la β -tubulina.

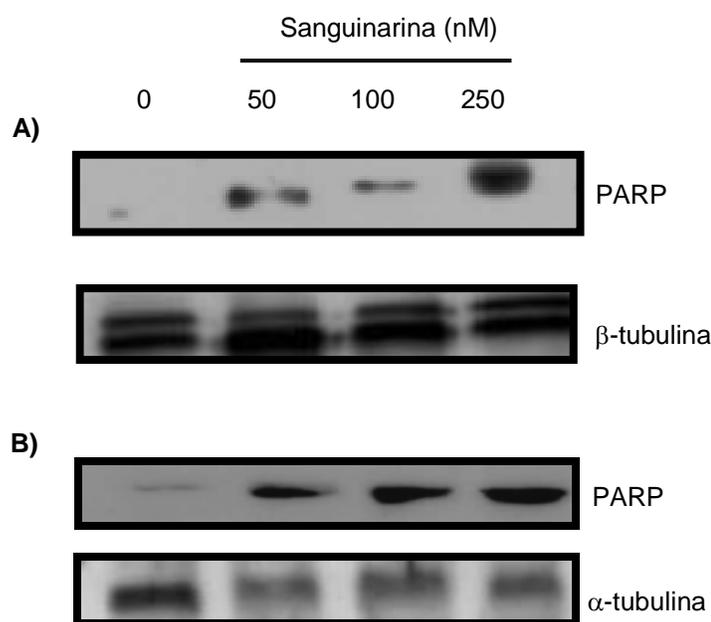


Figura 6. Identificación del marcador PARP en los extractos totales de promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*. Extractos totales (40 μ g de proteína) de promastigotes de *L. major* (A) y *L. mexicana* (B) previamente incubados con la sanguinarina a diferentes concentraciones: 50, 100 y 250nM. Como control de carga se utilizó la α - y la β -tubulina.

6.7 Identificación de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en extractos totales de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*. En la Fig. 8 se identificó la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en los extractos totales de promastigotes de *L. major* que no fueron incubados con el inhibidor, en las concentraciones 50 y 100 nM y en el control de macrófagos no estimulados. Sin embargo, esta proteína no fue identificada en los extractos totales de promastigotes incubados con 250nM de sanguinarina (panel A). Para el caso de los extractos totales de los promastigotes de *L. mexicana* no se reconoció la proteína anti-apoptótica Bcl-2, sólo en el control de macrófagos no estimulados (panel B). Como control de carga se utilizó la α -tubulina.

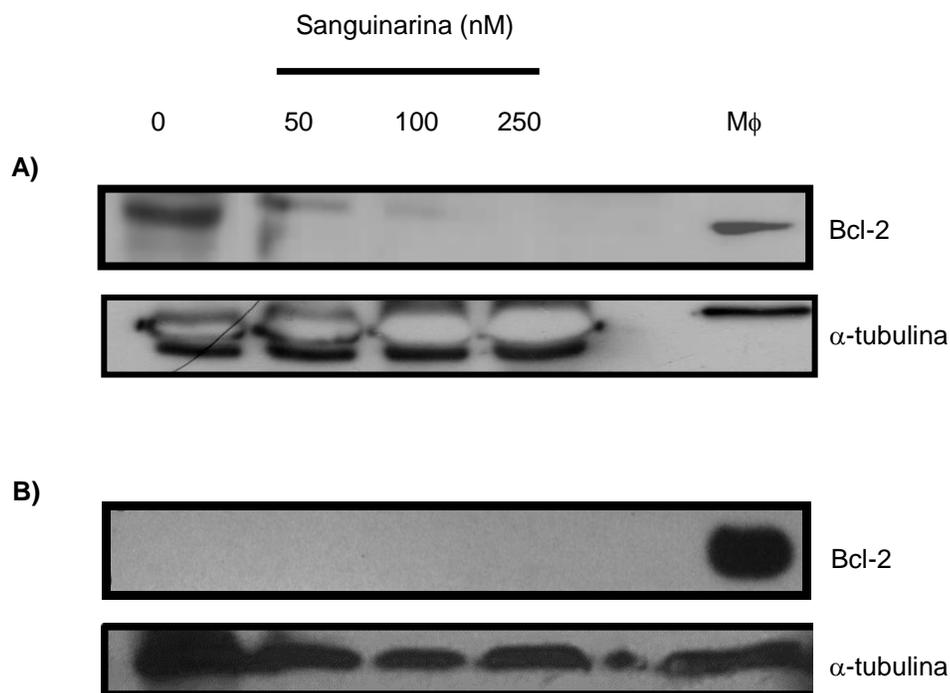
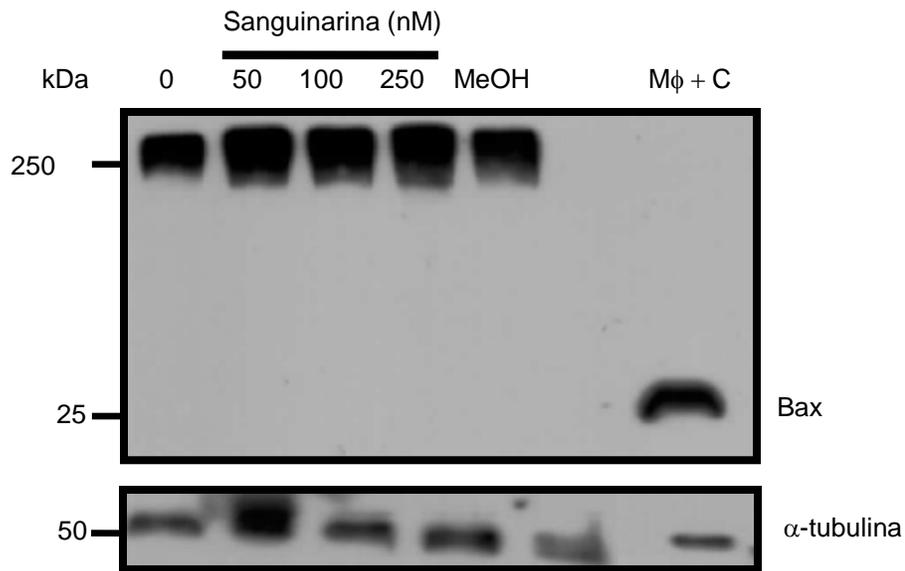


Figura 7. Identificación de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en extractos totales de los promastigotes de *L. major* incubados con el compuesto sanguinarina. Extractos totales (40 μ g de proteína) de los promastigotes de *L. major* (A) y *L. mexicana* (B) incubados con diferentes concentraciones de sanguinarina: 50, 100 y 250 nM. Como control de carga se utilizó la α -tubulina. M ϕ : Extracto total de macrófagos no estimulados

6.8 Identificación de la proteína pro-apoptótica Bax en extractos totales de los promastigotes de ambas especies de *Leishmania*. En la Fig. 9A se encontró un reconocimiento del anticuerpo α -Bax en un peso molecular de aproximadamente 250kDa en todos los extractos totales de promastigotes de *L. major* previamente incubados con la sanguinarina y en aquellos en donde los promastigotes no fueron incubados con el inhibidor. Sin embargo, el control de macrófagos con camptotecina (un inductor de apoptosis) se observó un reconocimiento 25kDa que corresponde al peso molecular esperado para la proteína Bax. En el panel inferior se muestra el control de α -tubulina. Por otro lado, cuando se analizó Bax en los extractos totales de promastigotes de *L. mexicana* previamente incubados con 50, 100 y 250 nM de sanguinarina, hubo reconocimiento únicamente en el extracto total de los promastigotes a los que no se les añadió el inhibidor a un peso molecular de aproximadamente 250kDa. Del mismo modo, se observó una molécula de 25kDa que corresponde al peso molecular esperado para la proteína Bax en los macrófagos con camptotecina. En el panel inferior de cada western blot se muestra el control de α -tubulina.

A) *L. major*



B) *L. mexicana*

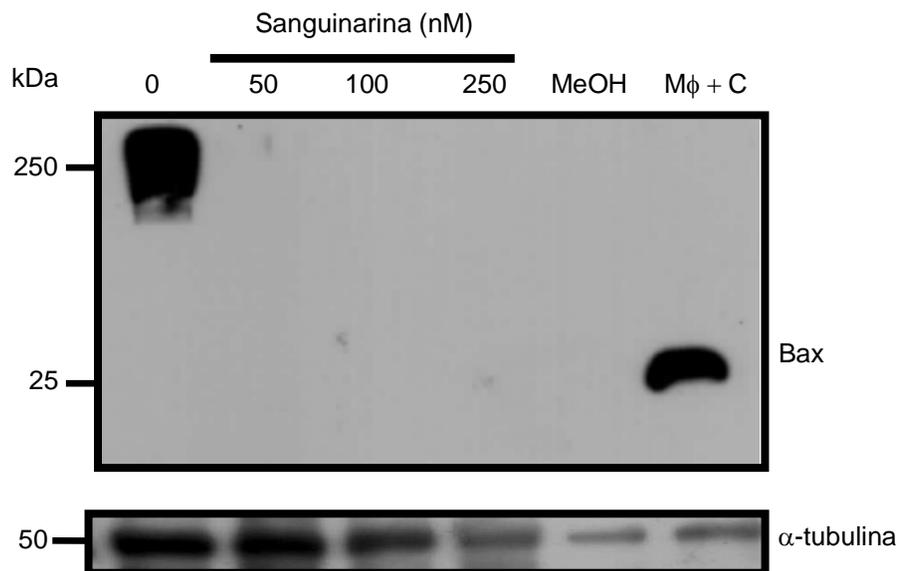


Figura 8. Identificación de la proteína pro-apoptótica Bax en los extractos totales de los promastigotes de ambas especies de *Leishmania* incubados con el compuesto sanguinarina. Extractos totales de promastigotes (40 μ g de proteína) de *L. major* (A) y *L. mexicana* (B) incubados previamente con la sanguinarina a diferentes concentraciones: 50, 100, 250nM. Como control de carga se utilizó la α -tubulina. M ϕ + C: macrófagos estimulados con camptotecina.

6.9 Análisis de la fosforilación de la cinasa MAPp38 en los extractos totales de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* incubados durante tres días con la sanguinarina. En la Fig. 7 se analizó la fosforilación de la cinasa MAPp38 en los extractos totales de los promastigotes de *L. major* incubados con 250nM de sanguinarina y se encontró la fosforilación de la cinasa MAPp38, lo cual no se observó en el extracto total de los promastigotes que no fueron incubados con la sanguinarina. Sin embargo, en los promastigotes de *L. mexicana* que se incubaron con 250nM de sanguinarina no se presentó la fosforilación de la cinasa MAPp38, pero los promastigotes que no fueron incubados con el inhibidor presentaron la fosforilación de esta enzima. Como control de carga se utilizó la α -tubulina.

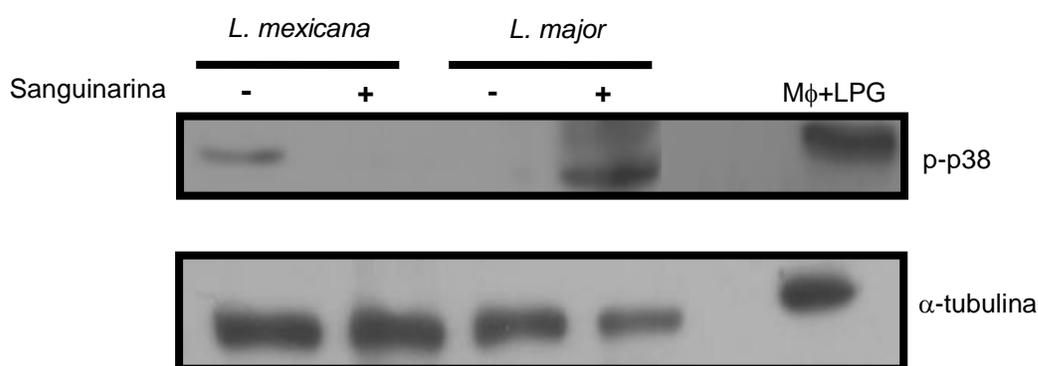


Figura 9. Fosforilación diferencial de la cinasa MAPp38 en promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* en presencia y ausencia del compuesto sanguinarina. Extractos totales de los promastigotes (40 μ g de proteína) de *L. major* y *L. mexicana* incubados previamente con la sanguinarina a una concentración de 250nM (+) y en ausencia del inhibidor (-) (panel superior). Como control de carga se utilizó la α -tubulina (panel inferior).

VII. Discusión

A mediados de los años 90, se describió una muerte de tipo apoptótica en tres diferentes especies de trypanosomatidos: *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania amazonensis*. Estos reportes fueron seguidos por un gran número de descripciones de muerte celular programada, muerte de tipo apoptótica o apoptosis en organismos unicelulares. Muchas preguntas acerca de la maquinaria bioquímica que se encarga de ejecutar y controlar dichos eventos apoptóticos aún no está muy estudiada. Sin embargo, la disponibilidad de herramientas bioquímicas que identifican los componentes de este tipo de muerte, disminuye progresivamente la brecha en el conocimiento acerca de la muerte de los parásitos protozoarios (El-Hani *et al.*, 2012; Smirlis *et al.*, 2010). La sanguinarina, un alcaloide extraído de la planta *Sanguinaria canadensis* ha sido reportado como un inductor de la apoptosis a través de la inhibición de la proteína fosfatasa PP2C. Aunque el mecanismo todavía es desconocido, se ha propuesto un modelo de inducción de la apoptosis a través de la fosforilación de la cinasa MAPp38 (Aburai *et al.*, 2010). Si bien está descrito que la PP2C de *L. major* y *L. mexicana* posee las mismas características que la PP2C de mamíferos, también se ha demostrado que la actividad enzimática de fosfatasa de esta PP2C es inhibida por el compuesto sanguinarina (Escalona-Montaño, 2007; Zuñiga-Fabian, 2014).

La exposición de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* a un compuesto inductor de apoptosis como lo es la sanguinarina (Aburai *et al.*, 2010; Hossain *et al.*, 2011; Malikova *et al.*, 2006) demostró características clásicas de la apoptosis en mamíferos. La primera característica observada fue la contracción celular durante el día 2 de cultivo con las concentraciones 50, 100 y 250nM de sanguinarina (Fig. 1.2; 1.5). La segunda característica representativa de muerte celular programada observada en este trabajo fue la morfología redondeada, la cual fue evidente en el día 3 de cultivo con las

concentraciones de 50 y 100nM de sanguinarina (Fig. 1.3, paneles c y d; Fig. 1.6, paneles c y d). La tercera característica observada fue la notable presencia de detritos con la concentración 250nM de sanguinarina en el día 3 de cultivo (Fig. 1.3, panel e; Fig. 1.6, panel e). Estos datos consolidan la información existente de muerte celular de tipo apoptótica en los promastigotes de otras especies del género *Leishmania* expuestos a agentes pro-apoptóticos como el medicamento antiprotozoario miltefosine (Paris *et al.*, 2004) y a derivados de ROS, como el H₂O₂ (Das *et al.*, 2001) donde también se observaron estas tres características clásicas de la apoptosis: la contracción celular, el redondeamiento celular y la presencia de detrito celular.

Dado que el compuesto sanguinarina ha sido reportado como un inhibidor del crecimiento celular (Ahmad *et al.*, 2000) se prosiguió a analizar el crecimiento de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* incubados con dicho compuesto donde se observó una reducción del crecimiento en el día 3 de cultivo con la concentración 100nM de sanguinarina y una ausencia total del crecimiento con la concentración 250nM de sanguinarina (Fig. 2). En nuestro laboratorio se está estudiando la ausencia del crecimiento de los promastigotes de *L. major* al ser incubados con la sanguinarina a concentraciones muy altas (250nM – 1µM) (Escalona-Montaña, en preparación). Asimismo, el uso de otros extractos de plantas, como la diospirina, ha demostrado tener efectos anti-proliferativos en promastigotes de *L. donovani* (Mukherjee *et al.*, 2009). Los datos descritos en el presente trabajo con respecto al crecimiento de los promastigotes de ambas especies demostraron otra característica esencial de la apoptosis, la inhibición de crecimiento celular.

Por otro lado, la participación de las proteínas fosfatasa en la vía de muerte celular de mamíferos ha sido ampliamente estudiada demostrando que éstas tienen un

papel determinante para la supervivencia y muerte de la célula (García *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2012; Van Hoof *et al.*, 2003). En parásitos protozoarios, la participación de las proteínas fosfatasas y en particular de la PP2C ha sido poco estudiada. Hasta el momento, sólo se ha estudiado que la actividad enzimática de fosfatasa de la PP2C recombinante de *L. major* y *L. mexicana* es inhibida por el compuesto sanguinarina (Escalona-Montaño, en preparación; Zuñiga-Fabian, 2014). Ahora bien, recientemente se ha reportado que la sanguinarina (cuyos efectos anti-proliferativos ya han sido mencionados anteriormente) tiene un efecto inhibitorio de la actividad enzimática de la PP2C en células tumorales HL60 (Aburai *et al.*, 2010). Es por esto que se utilizó la sanguinarina a diferentes concentraciones en un cultivo *in vitro* y en los extractos totales de esos parásitos la actividad enzimática de fosfatasa fue inhibida de manera dosis-dependiente (Fig. 3).

Hasta este momento, en el presente trabajo, se ha demostrado que la sanguinarina induce una muerte celular programada de tipo apoptótica en los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* y además se ha comprobado que existe inhibición de la actividad enzimática de fosfatasa de la PP2C en los extractos totales de estos parásitos.

Se ha mencionado con anterioridad que la sanguinarina es un inductor de la apoptosis, también ha sido descrito que este compuesto alcaloide inhibe la actividad enzimática de fosfatasa de la PP2C induciendo apoptosis en células tumorales (Aburai *et al.*, 2010). Dados estos reportes y los antecedentes de fragmentación nuclear en células tumorales a través de la incubación con sanguinarina (Malikova *et al.*, 2006) se prosiguió a analizar la fragmentación del DNA (otra característica típica de la apoptosis) por medio de la técnica de TUNEL en los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*. Si bien se

observó una tinción en los promastigotes de ambas especies que no fueron incubados con la sanguinarina, ésta se incrementó conforme a las diferentes 50, 100 y 250nM de sanguinarina (Fig. 4.1; 4.2). La fragmentación nuclear ha sido descrita con anterioridad en otros parásitos protozoarios, como *Toxoplasma gondii*, en donde también se observó una muerte basal y un incremento en la tinción de acuerdo a las diferentes condiciones a las que fueron sometidos (Ni Nyoman, 2013).

Otra característica importante de la apoptosis es la traslocación de fosfatidilserina (Sun *et al.*, 2012). Para comprobar la muerte celular de los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* al estar incubados con el compuesto sanguinarina y habiendo demostrado la inhibición de la actividad enzimática de la PP2C por este alcaloide, se analizó por citometría de flujo la traslocación de fosfatidilserina y se demostró que en la concentración 250nM y con el control positivo de glucantime (Fig. 5) hubo mayor traslocación. No sólo los parásitos protozoarios del género *Leishmania* han demostrado tener traslocación de fosfatidilserina, también lo ha hecho *T. gondii* (Ni Nyoman, 2013) al estar en contacto con otros compuestos apoptogénicos. Esto revela que, aunque *Leishmania* utiliza este mecanismo para ser fagocitado por el macrófago, también da paso a tener una característica más que fortalece la hipótesis de una apoptosis en organismos protozoarios unicelulares.

Es en este punto del trabajo en donde una vez demostrada la inhibición de la PP2C mediante el compuesto sanguinarina y dado que está reportado que dicha inhibición induce la muerte celular se prosiguió a analizar marcadores más específicos de la apoptosis en los promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*. Sin embargo, es aquí donde se comienzan a observar diferencias interespecíficas que serán discutidas más adelante. Uno de los marcadores moleculares clásico de la apoptosis es la PARP, la cual se

demonstró que está presente en los extractos totales de *L. major*, lo cual indica que existe fragmentación del DNA del parásito (Fig. 6). Sin embargo, en los extractos totales de *L. mexicana* se identificó esta proteína en todas las condiciones. Lo reportado hasta el momento es una inhibición de la expresión génica del mRNA de la PARP en un lapso de 6-48h con miltefosina en los promastigotes de *L. infantum* (Khademvatan *et al.*, 2011).

En mamíferos, la regulación de la vía apoptótica intrínseca se da por la proteína Bcl-2 (anti-apoptótica) y en la familia Trypanosomatidae no se ha reportado la presencia de dicha proteína (Smirlis, 2011) y, al menos en los extractos totales de los promastigotes de *L. major* se identificó dicha proteína en el peso referido de 24kDa en la literatura (Fig. 8), en cambio, para los extractos totales de los promastigotes de *L. mexicana* esta proteína anti-apoptótica no es reconocida por el anticuerpo α -Bcl-2. Es por esto que se prosiguió a realizar un BLAST con la base de datos NCBI y con la secuencia del anticuerpo utilizado en este experimento. Esta proteína Bcl-2 está reportada como la isoforma β de *Homo sapiens* (Fig. 10). Se realizó el BLAST en la base de datos NCBI y se obtuvieron alineamientos para proteínas hipotéticas conservadas (Fig. 11), una de ellas con una longitud de 233 aminoácidos resultó ser la que el anticuerpo reconoció, pues su peso aproximado fue de 25.63 kDa.

[Display Settings:](#) FASTA

apoptosis regulator Bcl-2 beta isoform [Homo sapiens]

NCBI Reference Sequence: NP_000648.2

[GenPept](#) [Graphics](#)

```
>gi|72198346|ref|NP_000648.2| apoptosis regulator Bcl-2 beta isoform [Homo sapiens]
MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAAGDVGAAAPGGAAPAPGIFSSQPGHTPHPAASRDPVARTS
PLQTPAAPGAAAGPALSPPVPPVHLLTRQAGDDFSRRYRRDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRD
GVNWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRRHLHTWIQDNGGWVGALGDVSLG
```

Figura 10. Secuencia de aminoácidos 1-205 del anticuerpo Bcl-2.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
conserved hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin]	30.8	30.8	44%	0.28	29%	XP_001686721.1
conserved hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin]	27.7	27.7	30%	2.8	40%	XP_001684453.1
putative serine/threonine-protein kinase [Leishmania major strain Friedlin]	27.7	27.7	42%	2.8	30%	XP_001683115.1
conserved hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin]	26.6	26.6	15%	4.5	41%	XP_001681045.1
RecName: Full=RNA 2'-O-methyltransferase fibritin; AltName: Full=Histone-gutamine methyltransferase [Leishmania major]	26.2	26.2	25%	6.3	31%	P35549.1
conserved hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin]	26.6	26.6	21%	6.8	34%	XP_001682725.1
conserved hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin]	26.2	26.2	20%	7.8	35%	XP_001681091.1
conserved hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin]	26.2	26.2	18%	8.0	37%	XP_001685342.1
putative serine/threonine protein kinase [Leishmania major strain Friedlin]	25.8	25.8	33%	9.3	32%	XP_003722285.1

Figura 11. Alineamientos representativos de *L. major* para la isoforma β de la proteína Bcl-2 de *Homo sapiens*

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001A/1103]	30.8	30.8	20%	0.25	35%	XP_003877644.1
conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001A/1103]	28.5	28.5	15%	1.2	44%	XP_003872579.1
putative kinesin [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001A/1103]	27.3	27.3	17%	3.9	38%	XP_003873058.1
conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001A/1103]	26.9	26.9	54%	4.0	28%	XP_003876727.1
phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-like protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001A/1103]	26.9	26.9	40%	4.4	28%	XP_003877788.1
conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001A/1103]	26.6	26.6	22%	4.9	40%	XP_003874064.1
conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001A/1103]	26.6	26.6	16%	5.5	44%	XP_003877839.1
conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001A/1103]	26.2	26.2	22%	7.3	35%	XP_003879370.1
putative kinesin [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001A/1103]	26.2	26.2	15%	8.4	41%	XP_003878745.1
conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001A/1103]	25.8	77.4	33%	9.9	32%	XP_003878654.1

Figura 12. Alineamientos representativos de *L. mexicana* para la isoforma b de la proteína Bcl-2 de *Homo sapiens*

En contraparte, la ausencia de reconocimiento del anticuerpo en los extractos totales de *L. mexicana* está determinado por la presencia de proteínas hipotéticas de altos pesos moleculares obtenidas en los alineamientos de la proteína Bcl-2 isoforma β de *Homo sapiens* (Fig. 12).

Como proteína antagonista de la vía apoptótica en mamíferos, se encuentra la proteína pro-apoptótica Bax. En este trabajo se encontró que esta proteína se presenta en los extractos totales de los promastigotes de ambas especies de *Leishmania* pero en un peso molecular de aproximadamente 250kDa, paralelamente se observó el control positivo en donde la literatura le refiere (Fig. 9). Sin embargo, en los extractos totales de los promastigotes de *L. major* se identificó esta proteína en todas las condiciones experimentales, mientras que en los extractos totales de los promastigotes de *L. mexicana* esta proteína se identificó en aquellos extractos totales de promastigotes a los que no se les añadió el inhibidor. Esta proteína Bax no se ha reportado en los tripanosomátidos (Smirlis, 2011), sin embargo el único antecedente más cercano es la participación del parásito *L. major* con la proteína Bax de humano (Arnoult *et al.*, 2002).

Continuando con lo reportado a través de la inhibición de la PP2C con sanguinarina en células tumorales HL60 y la inducción de apoptosis a través de la fosforilación de la cinasa MAPp38 (Aburai *et al.*, 2010) se encontró de manera contundente una fosforilación diferencial en la cinasa MAPp38 (Fig. 7) bajo diferentes condiciones, con lo cual se incrementan las diferencias entre las especies de los promastigotes de *Leishmania* y según con lo reportado, esta cinasa MAPp38 está involucrada en la muerte y la supervivencia celular (Koul *et al.*, 2013).

La vía apoptótica de los miembros de la familia Trypanosomatidae ha sido poco estudiada y los reportes son escasos (Smirlis, 2010). Sin embargo, se han identificado algunas moléculas que sugieren que la ruta sigue los pasos de la vía intrínseca en mamíferos. La participación de la proteína fosfatasa PP2C sugiere una relevancia específica en los eventos relacionados a la apoptosis. El estudio de esta ruta, a través de las proteínas descritas en este trabajo, proporcionará un gran avance en las cascadas de señalización involucradas en la apoptosis de la familia Trypanosomatidae, en especial, del género *Leishmania*.

VIII. Conclusiones

- La sanguinarina inhibe el crecimiento y la actividad de fosfatasa en ambas especies de *Leishmania*.
- La sanguinarina induce la fragmentación nuclear y la traslocación de fosfatidilserina en ambas especies de *Leishmania*.
- Se encontraron diferentemente expresadas en *L. major* y *L. mexicana* las proteínas Bcl-2 y Bax reportadas en mamíferos.
- La sanguinarina induce la fosforilación de la cinasa MAPp38 y la apoptosis en los promastigotes de *L. major*.

IX. Perspectivas

Este es el primer estudio de muerte tipo apoptótica que se realiza en dos especies del género *Leishmania* y donde se demuestra la presencia de marcadores apoptóticos de tipo 'canónicos' de mamíferos. Estudios más específicos como inmunoprecipitaciones podrían develar la ruta y la participación de las proteínas identificadas en este trabajo así como determinar si la PP2C es una proteína reguladora de esta muerte de tipo apoptótica.

X. Referencias

1. <http://www.who.int>
2. Aburai, N., Yoshida, M., Ohnishi, M., & Kimura, K.-i. (2010). Sanguinarine as a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 2C in vitro and induces apoptosis via phosphorylation of p38 in HL60 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74 (3), 548-552.
3. Ahmad, N., Gupta, S., Husain, M. M., Heiskanen, K. M., & Mukhtar, H. (2000). Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clinical Cancer Research*, 6 (4), 1524-1528.
4. Al-Mutairi, M. S., Cadalbert, L. C., McGachy, H. A., Shweash, M., Schroeder, J., Kurnik, M., Sloss, C. M., Bryant, C. E., Alexander, J., & Plevin, R. (2010). MAP kinase phosphatase-2 plays a critical role in response to infection by leishmania mexicana. *PLoS pathogens*, 6 (11).
5. Andrade-Narvaez, F.J.; Medina-Peralta, S.; Vargas-Gonzalez, A.; Canto-Lara, S.B. & Estrada-Parra, S. (2005). The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 47 (4):191-194.
6. Arnoult, D., Akarid, K., Grodet, A., Petit, P. X., Estaquier, J., & Ameisen, J. C. (2002). On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell death and differentiation*, 9 (1), 65-81.
7. Ashutosh, Garg, M., Sundar, S., Duncan, R., Nakhasi, H. L., & Goyal, N. (2012). Downregulation of Mitogen-Activated protein kinase 1 of *Leishmania donovani* field isolates is associated with antimony resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (1), 518-525.

8. Bengs, F., Scholz, A., Kuhn, D., & Wiese, M. (2005). LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *Molecular Microbiology*, 55 (5), 1606-1615.
9. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
10. Brumlik, M. J., Pandeswara, S., Ludwig, S. M., Murthy, K., & Curiel, T. J. (2011). Parasite Mitogen-Activated protein kinases as drug discovery targets to treat human protozoan pathogens. *Journal of Signal Transduction*, 2011, 1-16.
11. Córdova, C., Albertos, N. E., Andrade, F. J., & Canto, S. B. (1993). Leishmaniasis: Estudio epidemiológico preliminar en una localidad de la zona endémica del estado de Tabasco. *Salud Pública de México*, 35, 345-350.
12. Das, M., Mukherjee, S. B., & Shaha, C. (2001). Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Cell Science*, 114 (Pt 13), 2461-2469.
13. David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy*, 22 (6), 491-502.
14. El-Hani, C. N., Borges, V. M., Wanderley, J. L., & Barcinski, M. A. (2012). Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2.
15. Escalona-Montaño, A. R. (2007). Clonación y purificación de la proteína fosfatasa PP2C de *Leishmania major*. Tesis. Posgrado en Ciencias Biológicas (Biología Experimental). UNAM.
16. Escalona-Montaño, A. R. (en preparación). Estudio funcional de la proteína fosfatasa de *Leishmania* y análisis de su participación en la infección de

macrófagos. Tesis. Posgrado en Ciencias Biológicas (Biología Experimental). UNAM.

17. Garcia, A., Cayla, X., Guernon, J., Dessauge, F., Hospital, V., Rebollo, M. P. P., Fleischer, A., & Rebollo, A. (2003). Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie*, 85 (8), 721-726.
18. Gómez-Sandoval, J., Talamás-Rohana, P., & Aguirre-García, M. M. (2014). Proteínas fosfatasa de parásitos: Más allá de una función. *Revista de Educación Bioquímica*, 33 (1), 4-12.
19. González, C., Rebollar-Téllez, E. A., Ibáñez-Bernal, S., Becker-Fauser, I., Martínez-Meyer, E., Peterson, A. T., & Sánchez-Cordero, V. (2011). Current knowledge of *Leishmania* vectors in Mexico: How geographic distributions of species relate to transmission areas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85 (5), 839-846.
20. Goto, H., & Lindoso, J. A. L. A. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy*, 8 (4), 419-433.
21. Hart, D.T., K. Vickerman, G.H. Coombs (1981). A quick simple method for purifying *Leishmania mexicana* amastigotes.
22. Horjales, S., Schmidt-Arras, D., Limardo, R. R. R., Leclercq, O., Obal, G., Prina, E., Turjanski, A. G., Späth, G. F., & Buschiazzi, A. (2012). The crystal structure of the MAP kinase LmaMPK10 from *Leishmania major* reveals parasite-specific features and regulatory mechanisms. *Structure (London, England:1993)*, 20 (10), 1649-1660.
23. Hossain, M., Khan, A. Y., & Suresh Kumar, G. (2011). Interaction of the anticancer plant alkaloid sanguinarine with bovine serum albumin. *PLoS ONE*, 6 (4), e18333

24. Kar, S., Ukil, A., Sharma, G., & Das, P. K. (2010). MAPK-directed phosphatases preferentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in experimental visceral leishmaniasis: involvement of distinct protein kinase c isoforms. *Journal of Leukocyte Biology*, 88 (1), 9-20.
25. Khademvatan, S., Gharavi, M. J. J., & Saki, J. (2011). Miltefosine induces metacaspase and PARP genes expression in *Leishmania infantum*. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 15 (5), 442-448.
26. Kitada, S., Krajewska, M., Zhang, X., Scudiero, D., Zapata, J. M., Wang, H. G., Shabaik, A., Tudor, G., Krajewski, S., Myers, T. G., Johnson, G. S., Sausville, E. A., & Reed, J. C. (1998). Expression and location of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines. *The American journal of pathology*, 152 (1), 51-61.
27. Koul, H. K., Pal, M., & Koul, S. (2013). Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. *Genes & cancer*, 4 (9-10), 342-359.
28. Malikova, J., Zdarilova, A., & Hlobilkova, A. (2006). Effects of sanguinarine and chelerythrine on the cell cycle and apoptosis. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* , 150 (1), 5-12.
29. McCluskey, A., & Sakoff, J. A. (2001). Small molecule inhibitors of serine/threonine protein phosphatases. *Mini reviews in medicinal chemistry* , 1 (1), 43-55.
30. Mukherjee, P., Majee, S. B. B., Ghosh, S., & Hazra, B. (2009). Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by diospyrin and its ethanolamine derivative. *International journal of antimicrobial agents*, 34 (6), 596-601.
31. Munshi, A., & Ramesh, R. (2013). Mitogen-Activated protein kinases and their role in radiation response. *Genes & Cancer*, 4 (9-10), 401-408.

32. Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366 (9496), 1561-1577.
33. Ni Nyoman, A. D. D., & Lüder, C. G. (2013). Apoptosis-like cell death pathways in the unicellular parasite *Toxoplasma gondii* following treatment with apoptosis inducers and chemotherapeutic agents: a proof-of-concept study. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 18 (6), 664-680.
34. Ofek, P., Ben-Meir, D., Kariv-Inbal, Z., Oren, M., & Lavi, S. (2003). Cell cycle regulation and p53 activation by protein phosphatase 2C α . *Journal of Biological Chemistry*, 278 (16), 14299-14305.
35. Pavli, A., & Maltezou, H. C. (2010). Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases*, 14 (12), e1032-e1039.
36. Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C., & Bréard, J. (2004). Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48 (3), 852-859.
37. Saito, J.-i., Toriumi, S., Awano, K., Ichijo, H., Sasaki, K., Kobayashi, T., & Tamura, S. (2007). Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by protein phosphatase 2C ϵ . *The Biochemical journal*, 405 (3), 591-596.
38. Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of vector borne diseases*, 45 (4), 255-272.
39. Shi, Y. (2009). Serine/Threonine phosphatases: Mechanism through structure. *Cell*, 139 (3), 468-484.
40. Sim, A. T., Baldwin, M. L., Rostas, J. A., Holst, J., & Ludowyke, R. I. (2003). The role of serine/threonine protein phosphatases in exocytosis. *The Biochemical journal*, 373 (Pt 3), 641-659.

41. Smirlis, D., Duszenko, M., Ruiz, A., Scoulica, E., Bastien, P., Fasel, N., & Soteriadou, K. (2010). Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. *Parasites & Vectors*, 3 (1), 107
42. Smirlis, D., & Soteriadou, K. (2011). Trypanosomatid apoptosis: 'apoptosis' without the canonical regulators. *Virulence*, 2 (3), 253-256.
43. Sun, H., & Wang, Y. (2012). Novel Ser/Thr protein phosphatases in cell death regulation. *Physiology*, 27 (1), 43-52.
44. Szöör, B. (2010). Trypanosomatid protein phosphatases. *Molecular and biochemical parasitology*, 173 (2), 53-63.
45. Van Hoof, C., & Goris, J. (2003). Phosphatases in apoptosis: to be or not to be, PP2A is in the heart of the question. *Biochimica et biophysica acta*, 1640 (2-3), 97-104.
46. Vrba, J., Hrbáč, J., Ulrichová, J., & Modrianský, M. (2004). Sanguinarine is a potent inhibitor of oxidative burst in DMSO-differentiated HL-60 cells by a non-redox mechanism. *Chemico-biological interactions*, 147 (1), 35-47
47. Wheeler, R. J., Gluenz, E., & Gull, K. (2011). The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Molecular microbiology*, 79 (3), 647-662.
48. Wilkins-Rodríguez AA, Escalona-Montaño AR., Aguirre- García M., Becker I., Gutiérrez-Kobeh L., (2010). Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Experimental parasitology*, 26(3), 426-34.
49. Yang, Z., Zhang, X., Darrah, P. A., & Mosser, D. M. (2010). The regulation of Th1 responses by the p38 MAPK. *The Journal of Immunology*, 185 (10), 6205-6213.

50. Zuñiga-Fabian, M. (2014) Caracterización y purificación bioquímica de la proteína fosfatasa PP2C de *Leishmania mexicana*. Tesis. Licenciatura en Química. UNAM.