



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio del efecto que ejercen proteínas fosfatasa secretadas por promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* en la activación de macrófagos humanos.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DALIA MARGARITA ORTIZ LOZANO



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos

1. Datos del alumno

Ortiz lozano Dalia Margarita (dalis.mgy@gmail.com)

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

306223084

2. Datos del Tutor

Dra. María Magdalena Aguirre García (maguirre@unam.mx)

Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM

3. Datos del sinodal 1

Dra. Ana María Fernández Presas

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de medicina, UNAM

4. Datos del sinodal 2

M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán

Departamento de Biología Comparada, Facultad de ciencias, UNAM

5. Datos del sinodal 3

Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de medicina, UNAM

6. Datos del sinodal 4

Dr. Armando Pérez Torres

Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de medicina, UNAM

7. Datos del trabajo escrito

Estudio del efecto que ejercen proteínas fosfatasa secretadas por promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* en la activación de macrófagos humanos

80 p.

2016

DEDICADA A:

Mi padre Eduardo Jesús Ortiz Solís y a mi madre Esperanza Lozano Covarrubias, por su paciencia cuando me porté mal, por sus consejos cuando me sentía confundida, por su apoyo cuando más lo necesité y por todo el amor que me han dado. Les agradezco y los amo porque fueron y son los mejores padres que pude haber tenido.

« Some part of our being knows this is where we came from. We long to return. And we can. Because the cosmos is also within us. We're made of star-stuff. We are a way for the cosmos to know itself. »

Carl E. Sagan, 1990

Agradecimientos académicos

El presente trabajo fue elaborado gracias al apoyo IN218412 de DGAPA-PAPIIT (UNAM) y al apoyo 152433 de CONACyT.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Ciencias, por haberme permitido formarme en ella, a todo lo brindado durante mi paso y a todo lo que viene.

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

A la Dra. Ana María Fernández Presas, por el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis.

A la M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán, por el tiempo dedicado y por revisar a detalle mi trabajo, ayudando a su mejoría.

Al Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández por su apoyo y por el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo.

Al Dr. Armando Pérez Torres, por el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis.

A la M. en C. Alma Reyna Escalona Montaña por su gran apoyo y enseñanza en las técnicas de laboratorio.

A la Dra. Araceli Rojas Bernabé por su gran apoyo y enseñanza en la técnica de purificación y ELISA.

Al Biól. Arturo Wilkins Rodríguez, por el cultivo de los promastigotes de *Leishmania mexicana*.

A todos los integrantes del laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por haberme dado la oportunidad de ingresar al taller “Bases moleculares de la infección de la célula hospedera por el parásito *Leishmania*” y realizar mis experimentos en su laboratorio.

Al Q.F.B. Lázaro Alfredo Aburto Fierro, quien fue mi profesor de Química en el CCH-SUR y que sin saberlo me motivo a seguir, uno de los mejores profesores que pude haber conocido.

Agradecimientos personales

A la Dra. María Magdalena Aguirre García, porque a lo largo de este proceso ha sido una madre académica y como tal me ha enseñado que soy capaz, me ha exigido, ha confiado en mí, ha sido comprensiva y siempre me ha brindado su apoyo, le agradezco infinitamente por su paciencia y porque por fin lo hemos logrado.

A Alma Reyna Escalona Montaña, no tengo palabras para agradecerte, me has enseñado prácticamente todo lo que sé en el laboratorio y sin ti este trabajo no hubiera sido posible, gracias por el tiempo que has dedicado a mi trabajo y porque me has apoyado en muchas ocasiones, espero poder devolverte de algún modo todo lo que tú me has brindado. Infinitas gracias.

A Araceli Rojas Bernabé, porque sin tu ayuda y apoyo esto no se hubiera logrado, gracias por ayudarme tanto, por la disposición que tuviste y el tiempo que invertiste en la elaboración de este trabajo, te agradezco infinitamente.

A Arturo Wilkins, por todo tu apoyo, las pláticas en el laboratorio, las risas y por las cosas nuevas aprendidas.

A la Dra. Berenice Martínez, por ser siempre el aire fresco del laboratorio, por hacer más ameno el tiempo, por sus críticas constructivas y el tiempo compartido en el laboratorio.

A Armando Arias López, por caminar conmigo hasta estas alturas de la vida, por ser siempre tan sensible y comprensivo, por todo lo que hemos compartido y el apoyo que me has brindado, por las tardes de helado y por tantas, tantas cosas más. Te amo.

A David Julián (III) Arias Chaves y a Hugo Alfredo Molina Obregón, porque han sido la parte más divertida de mi camino por la facultad, por todo el apoyo que me han dado, por todos los días en que conquistábamos la ciudad, por los buenos y los malos tiempos vívidos, por todas las experiencias compartidas, porque risas no faltaron. Les amo.

A Estefanía Grostieta Rojas y Maritza Orozco Pantoja, las chicas de mi vida. Les agradezco las interminables pláticas, las risas, los cafés, las críticas, el apoyo, el cariño, los consejos, lo bueno y lo tan bueno. Las adoro.

A Marco David Ornelas Cruces y a Carlos Cervantes Montes, ¡¡¡amixes!! Por los largos ratos de café en esa esquina de división del norte, por las risas, los consejos, los desahogos, las buenas fiestas, por ser siempre tan frescos y auténticos. Porque me ha hecho muy feliz tenerlos en mi vida. Les amo.

A Samanta Contreras a Pablo Colunga y a Mayarí Aguilar, me encantó conocerlos en esta etapa de mi vida, les agradezco las risas, las pláticas y lo que hemos vivido juntos. Los quiero mucho.

A Iliana Bayarte, porque eres una persona honesta y divertida, gracias por las risas y las pláticas. Te quiero mucho

A Gustavo Tapia porque nos conocimos desde el primer semestre y desde entonces hemos estado de alguna manera presentes, me da gusto que ya no pienses que la vida retoña. Te quiero, tonto.

A Gethsemany Guerrero, por su simpática risa y divertidas pláticas en la facultad.

A Ignacio Alberto Pérez Olan, por tu apoyo, por tu comprensión, por motivarme y regañarme, porque tú más que nadie ha sufrido el proceso de estrés y negación. Porque eres un pilar en mi vida, por ser mi amigo, por todas las carcajadas, por lo bueno y lo tan bueno, por caminar conmigo en este momento de mi vida, por el amor que me tienes y por dejar que yo te ame.

A mis hermanas Carolina y Noemi Ortiz, porque han contribuido en gran medida a ser la persona que ahora soy, por lo que hemos vivido y por lo que me han compartido. Las amo.

Al resto de mi familia por su apoyo y por estar pendiente de mi progreso en esta etapa.

A todos los que no pude mencionar por falta de memoria y que han sido parte de mi vida y este proceso.

Abreviaturas

LC	Leishmaniasis cutánea
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LV	Leishmaniasis visceral
LM	Leishmaniasis mucocutánea
ROI	Intermediarios reactivos del oxígeno
RIN	Intermediarios reactivos del nitrógeno
NO	Óxido nítrico
pH	Potencial de hidrógeno
µm	Micrómetros
TLR	Toll-like Receptor
Mφ	Macrófagos
CD	Células dendríticas
NK	Natural killer
LPG	Lipofosfoglicano
gp 63	Glicoproteína 63
CPA	Célula presentadora de antígeno
PPGs	Proteofosfoglicanos
RE	Retículo endoplásmico
AG	Aparato de Golgi
MVBs	Cuerpos multivesiculares
MET	Microscopía electrónica de transmisión
HSP	Heat shock protein

kDa	Kilo Daltones
Tyr	Tirosina
Ser	Serina
Thr	Treonina
PTP	Proteínas tirosina fosfatasas
PSTP	Proteínas serina/treonina fosfatasas
DSP	Fosfatasas de especificidad dual
LMW	Bajo peso molecular
PPP	Fosfoproteínas fosfatasas
PPM	Proteínas fosfatasas dependientes de metal
FCP/SCP	Fosfatasa del dominio carboxilo-terminal (CDT) del componente TFIIF asociado a la RNA polimerasa II/ pequeñas fosfatasas del CTD
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
MUP	4-metilumberiferil fosfato
<i>p</i> -NPP	Para-Nitrofenilfosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ITS	Espaciador transcrito interno
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MnCl ₂	Cloruro de Manganeso
MSP	Medios secretados por promastigotes
MSA	Medios secretados por amastigotes
SFB	Suero fetal bovino
mL	Mililitros
199MD	Medio 199 modificado

SDMM	Schneider's Drosophila Medio Modificado
μL	Microlitros
μg	Microgramos
M	Molar
mM	Mili molar
h	hora
N	Normal
nm	Nanómetros
pmol	Picomoles
μM	Micromolar
V	Volts
min	Minutos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
ET	Extracto total
FC	Fracción citosólica
FM	Fracción membranal
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
TBST	Solución amortiguadora de Tris-Tween
ng	Nanogramos
pg	Picogramos
SEM	Error estándar de la media
Mg^{2+}	Ion magnesio
Mn^{2+}	Ion manganeso
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica

Índice

1	Introducción	19
1.1	Leishmaniasis	19
1.1.1	Leishmaniasis cutánea	19
1.2	El parásito <i>Leishmania</i> spp.	20
1.2.1	Morfología	20
1.2.2	El promastigotes	21
1.2.3	El amastigotes	21
1.3	Algunas células involucradas en la leishmaniasis	22
1.3.1	Neutrófilos	23
1.3.2	Células Dendríticas	23
1.3.3	Células asesinas naturales	24
1.3.4	Macrófagos	25
1.4	Respuesta inmune en la Leishmaniasis	25
1.4.1	Respuesta inmune innata	26
1.4.2	Respuesta inmune adaptativa	27
1.5	Moléculas involucradas en la patogenicidad de <i>Leishmania</i> spp.	28
1.6	Vías de secreción en <i>Leishmania</i> spp.	29
1.6.1	Vía de secreción clásica	31
1.6.2	Vía de secreción no clásica	31
1.6.3	Vía de secreción mediada por vesículas	32
1.7	Secreción de proteínas por <i>Leishmania</i> spp.	34
1.8	Proteínas fosfatasas	36
1.8.1	Fosfatasas de secreción en <i>Leishmania</i> spp.	36

1.7.2	Fosfatasa secretada por <i>Leishmania mexicana</i>	38
2	Justificación	40
3	Hipótesis	40
4	Objetivos	42
4.1	General	41
4.1.1	Particulares	41
5	Materiales y métodos	43
5.1	Ensayos de secreción	43
5.1.1	Obtención de las proteínas secretadas al medio de cultivo por los promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	43
5.1.2	Obtención de las proteínas secretadas al medio de cultivo por los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	44
5.2	Prueba de viabilidad de los promastigotes y los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	44
5.3	Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford	45
5.4	Determinación de la actividad enzimática de fosfatasa en los MSP y MSA	45
5.4.1	Determinación de la actividad enzimática de fosfatasa	45
5.4.2	Determinación de la actividad específica de PTP y PSTP en los sobrenadantes secretados por los promastigotes y los amastigotes	46
5.4.3	Determinación del efecto de cationes divalente	46
5.4.4	Efecto de inhibidores específicos de PTP y PSTP sobre la actividad de los MSP y MSA	47
5.5	Análisis del perfil electroforético de los MSP y MSA	47
5.6	Obtención de los extractos totales de los promastigotes y los amastigotes después de la secreción de proteínas al medio de cultivo	48
5.7	Identificación de las proteínas fosfatasa PP2C en los sobrenadantes secretados, así como en los extractos totales, la fracción citosólica y la fracción membranal de los promastigotes y los amastigotes	49

5.8	Purificación de monocitos de sangre periférica humana	50
5.9	Ensayos de citocinas	51
5.9.1	Producción de citocinas en los macrófagos estimulados con sobrenadantes secretados por los promastigotes y los amastigotes	51
5.9.2	Inmunoensayo enzimático estándar sándwich (ELISA)	51
5.10	Análisis estadístico	52
6	Resultados	53
6.1	Secreción de fosfatasas por promastigotes y amastigotes de <i>L. mexicana</i> MHOM/MX/92/UADY 68 al medio de cultivo a diferentes tiempos	53
6.2	Viabilidad de los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i> MHOM/MX/2011/Lacandona	54
6.3	Análisis de la actividad enzimática de las proteínas secretadas por los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i>	55
6.3.1	Actividad general de fosfatasa	55
6.3.2	Especificidad de sustrato de las proteínas fosfatasas secretadas por los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i>	55
6.3.3	Actividad de fosfatasa en presencia de cationes	57
6.4	Análisis del efecto de inhibidores específicos de PTP y PSTP sobre la actividad de los MSP y MSA	59
6.5	Perfil de proteínas secretadas por los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i>	61
6.6	Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en sobrenadantes secretados, y fracciones subcelulares de los promastigotes y los amastigotes	63
6.7	Producción de citocinas por los macrófagos humanos	64
7	Discusión	66
8	Conclusiones	74
9	Perspectivas	75
10	Referencias	76

Índice de figuras y tablas

Figura A	Microscopía electrónica de barrido	22
Figura B	Vías de secreción en <i>Leishmania</i> spp.	30
Figura C	Parásitos de <i>L. mexicana</i>	33
Figura 1	Secreción de fosfatasas por promastigotes y amastigotes de <i>L. mexicana</i> MHOM/MX/92/UADY 68 a diferentes tiempos	53
Figura 2	Viabilidad de los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i>	54
Figura 3	Actividad de fosfatasa en MSP y MSA de <i>L. mexicana</i> con diferentes sustratos	56
Figura 4	Actividad de fosfatasa en MSP y MSA de <i>L. mexicana</i> en presencia de cationes	58
Figura 5	Efecto de inhibidores específicos de PTP y PSTP en la actividad de fosfatasa en MSP y MSA de <i>L. mexicana</i> .	60
Figura 6	Perfil de proteínas de los sobrenadantes secretados por los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i>	62
Figura 7	Inmunodetección de una proteína fosfatasa PP2C secretada al medio de cultivo y en fracciones subcelulares de promastigotes y amastigotes de <i>L. mexicana</i>	63
Figura 8	Producción de citocinas por los macrófagos humanos estimulados con MSP y MSA de <i>L. mexicana</i>	65
Tabla 1	Análisis de moléculas con diferentes pesos moleculares en geles SDS-PAGE al 10%.	62

Resumen

Los parásitos del género *Leishmania* son el agente causal de una enfermedad infecciosa llamada leishmaniasis. Este parásito existe en su forma flagelada como promastigote móvil, en el tubo digestivo del vector artrópodo o como su forma no flagelada de amastigote en el hospedero mamífero. Es sabido que la respuesta inmune innata del hospedero es regulada por varias estrategias y factores de virulencia que alteran la señalización del macrófago, favoreciendo la supervivencia del parásito. Además de los factores de virulencia clásicos de este parásito como el LPG (Lipofosfoglicano) y la gp63 o leishmanolisina en algunos estudios del secretoma de *L. donovani* se ha visto que el parásito cuenta con moléculas que son secretadas y que podrían jugar un papel importante en la virulencia del parásito. Entre las proteínas secretadas se ha identificado una proteína fosfatasa (PTP). Por otro lado en promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* se ha encontrado que secretan una proteína con actividad de PTPasa al medio, siendo para el caso de promastigotes 7 horas el tiempo óptimo de secreción y 1 hora para los amastigotes. En este estudio se demostró que los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/2011/Lacandona secretan proteínas con actividad de fosfatasas al medio de cultivo y que esta actividad es diferente entre una y otra fase del parásito, siendo más elevada en las proteínas de secreción de los promastigotes, además, la caracterización de estas proteínas presentes en MSP y MSA mostró que las fosfatasas presentes en las proteínas de secreción son de tipo PTP y que tanto promastigotes como amastigotes secretan una amplia variedad de proteínas con pesos moleculares de 10 a 150 kDa. Interesantemente, también se demostró que en los MSP y MSA existe una proteína PP2C que fue reconocida por un anticuerpo α -PP2C de *L. mexicana*, sin embargo, esta no presentó actividad catalítica en los ensayos de

caracterización. Finalmente, también se obtuvo evidencia de que las proteínas secretadas por promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* inducen la producción de citocinas inflamatorias en macrófagos humanos. Todos estos resultados nos aportan importante información sobre la biología del parásito y además expone blancos de investigación nuevos para el desarrollo de terapias más efectivas e incluso la generación de una vacuna.

1 Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria infecciosa cuyo agente causal son los parásitos del género *Leishmania spp.* presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas: **a)** la leishmaniasis cutánea (LC), la cual se puede presentar en dos formas, localizada (LCL) y difusa (LCD), **b)** la leishmaniasis visceral (LV) y **c)** la leishmaniasis mucocutánea (LM). Estas manifestaciones pueden ser causadas por aproximadamente 21 especies de *Leishmania* (Herwaldt, 1999). De acuerdo a la localización geográfica, la leishmaniasis puede ser transmitida por dos géneros del vector artrópodo hematófago; *Phlebotomus* en el viejo continente y *Lutzomyia* en el nuevo continente (Santarém *et al.*, 2007). Según la Organización Mundial de la Salud la enfermedad afecta a las poblaciones más pobres del planeta, asociada principalmente a la malnutrición, a los desplazamientos de población, a las malas condiciones de vivienda y a la debilidad del sistema inmunitario. Además, de otros factores como los cambios ambientales, la deforestación, la construcción de presas, los sistemas de riego y la urbanización. Se estima que cada año se originan alrededor de 1,3 millones de casos nuevos y entre 20 y 30 mil defunciones (WHO, 2016).

1.1 Leishmaniasis

1.1.1 Leishmaniasis cutánea (LC)

La LC en el viejo continente es causada por *Leishmania major* y/o *Leishmania tropica*, tiende a ser menos agresiva, se cura rápidamente, y por lo tanto, tiene un curso relativamente benigno (Goto & Lindoso, 2012). En el nuevo continente la LC es causada

por una variedad de especies pertenecientes a los subgéneros; a) *Leishmania* como *Leishmania mexicana* y b) *viannia* como *Leishmania viannia braziliensis* que producen diferentes manifestaciones clínicas. Sin embargo, una parte de la población tiene infecciones subclínicas. Aunque la forma clínica más frecuente de la LC se presenta como lesiones únicas o múltiples, también se pueden observar como lesiones diseminadas. Las lesiones pueden presentarse en cualquier parte del cuerpo y suele originarse en el sitio de la inoculación, donde inicialmente se forma una lesión macular, seguido por una pápula y luego por un nódulo que progresivamente aumenta de tamaño y se convierte en úlcera. Estas lesiones se pueden desarrollar en semanas, meses o años después de la infección. Por ejemplo, las lesiones causadas por *L. mexicana* pueden curar espontáneamente o bien en un plazo promedio de 4 meses, no obstante, esta especie así como *Leishmania amazonensis*, *Leishmania venezuelensis* y *Leishmania pifanoi*, pueden causar LCD. Este cuadro clínico se considerada una forma grave y crónica de la enfermedad. Por lo que la respuesta al primer esquema terapéutico es con frecuencia insatisfactoria, debido a los cambios en las condiciones inmunológicas, las características fisiológicas y nutricionales de los pacientes así como la administración de fármacos (Grimaldi & Tesh 1993; Silveira *et al.*, 2004; Reithinger *et al.* 2007; WHO 2010; Reveiz *et al.*, 2013).

1.2 El parásito *Leishmania spp.*

1.2.1 Morfología

En su ciclo de vida, *Leishmania spp.* Presenta dos formas principales: el promastigote que ocupa un nicho extracelular en el vector hematófago y el amastigote que se localiza de

forma intracelular en el hospedero mamífero. La diferenciación del promastigote a amastigote es una de las transiciones más grandes en el desarrollo del ciclo de vida de *Leishmania spp.* y un evento clave en el establecimiento de la infección en el hospedero mamífero. Existen dos factores ambientales que son suficientes para inducir la diferenciación de los promastigotes a amastigotes; un aumento de la temperatura que va desde 33 a 37 °C y la disminución en el pH, de neutro (en el vector) a pH 5 en el fagolisosoma del macrófago (McConville & Handman 2007).

1.2.2 El promastigote

Es la forma flagelada, extracelular y móvil del parásito, pasa por dos fases: la procíclica (logarítmica o de crecimiento) y la metacíclica (estacionaria e infectiva). Su tamaño varía entre los 10 y 30 µm de largo y 1 a 5 µm de diámetro, mientras que el flagelo posee una longitud de aproximadamente 15 a 18 µm. Presenta un núcleo ubicado en el centro del cuerpo y un cinetoplasto cercano a la parte anterior del mismo. El flagelo se localiza en la parte anterior y nace de un cuerpo basal, emergiendo de un bolsillo o *pocket* flagelar (Figura A, panel a) (Pearson *et al.*, 1981).

1.2.3 El amastigote

Es la forma intracelular del parásito y durante este estadio se ubica y prolifera dentro del fagolisosoma del macrófago del hospedero mamífero. Los amastigotes son inmóviles, ovoides y con una longitud de entre 3 a 5 µm y un diámetro que oscila entre 1.5 a 2.5 µm. Su núcleo es excéntrico y tienen un cinetoplasto alargado de donde sale un pequeño flagelo intracelular (Figura A, panel b) (Pearson *et al.*, 1981).

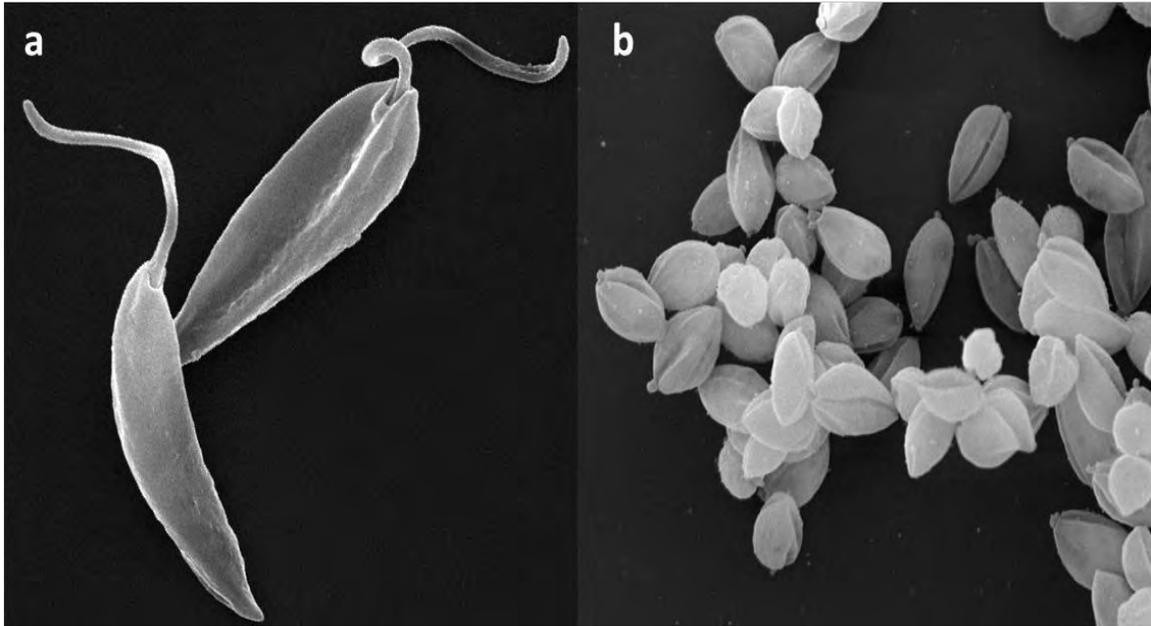


Figura A. Microscopía electrónica de barrido. a Promastigotes, b Amastigotes. Tomado y modificado de WHO, 2016

1.3 Algunas células involucradas en la leishmaniasis

Todas las infecciones provocadas por *Leishmania spp.* se inician cuando se inoculan promastigotes en la dermis de la piel de los seres humanos y otros mamíferos. Para sobrevivir, el parásito debe resistir la exposición a las células inmunes innatas presentes o rápidamente reclutadas en la piel. La piel es un órgano inmunológico complejo en el que funcionan múltiples células de la respuesta inmune innata para proteger al hospedero de agentes patógenos infecciosos (Clark *et al.*, 2006).

1.3.1 Neutrófilos

Los neutrófilos son las células efectoras primarias antimicrobianas, con la función principal de fagocitar y destruir patógenos invasores. Los neutrófilos son reclutados rápidamente a los sitios del cuerpo donde se ha dañado el tejido, como el sitio de una picadura. La mayoría de los microorganismos mueren rápidamente a causa de los neutrófilos, pero algunos patógenos, intracelulares en su mayoría, pueden sobrevivir el medio destructivo de estas células (Nylen & Gautam, 2010). Los neutrófilos, pueden actuar como "caballos de Troya" en esta infección al no desencadenar la activación de los macrófagos (Laskay *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando se activan apropiadamente, los neutrófilos pueden matar patógenos intracelulares tales como *Leishmania spp.* (Pearson & Steigbigel, 1981) y hay varios informes que sugieren que los neutrófilos desempeñan un papel en la protección temprana contra la enfermedad Leishmania (Lima *et al.*, 1998; McFarlane *et al.*, 2008; Rousseau *et al.*, 2001).

1.3.2 Células Dendríticas

Existen varios tipos diferentes de células dendríticas (CD) con diferente ubicación y función en la piel. Los primeros estudios de CD en la piel murina indican que las células de epidérmicas de Langerhans (LC) son importantes para la detección, la absorción y el transporte de *Leishmania spp.* a los ganglios linfáticos (Moll *et al.*, 1993). Los estudios más recientes han demostrado que las CD dérmicas están implicadas en el reconocimiento temprano del parásito. Las CD dérmicas pueden fagocitar de manera eficiente a los parásitos e incorporarlos en las vacuolas (Ng *et al.*, 2008) y se han sugerido como principales células presentadoras de antígeno en la leishmaniasis (Ritter *et al.*, 2004). La

producción de IL-12 por las CD, es esencial para la iniciación de una respuesta inmune protectora en ratones (y probablemente también en los seres humanos) (McDowell *et al.*, 2002).

1.3.3 Células asesinas naturales

Junto con los macrófagos, las células asesinas naturales (NK) representan la primera línea de defensa contra los patógenos mediante dos mecanismos principales, la destrucción lítica de las células infectadas y la secreción de citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ y el TNF- α (Nylen & Gautam, 2010).

Los primeros estudios de leishmaniasis experimental en ratones C3H/HeN indican que la producción de IFN- γ por las células NK era importante para la generación de una respuesta inmune de protección y control de la infección. Estudios posteriores, en ratones C57BL/6 demostraron, sin embargo, que no se requieren las células NK para la generación de una adecuada respuesta de tipo Th1. Sin embargo, su presencia puede retrasar la aparición de la enfermedad. En ratones Balb/c que carecen de células NK desarrollaron lesiones más rápidamente y contenían más parásitos (Laurenti *et al.*, 1999). Por lo tanto, las células NK pueden tener una función en el control de la carga parasitaria durante las primeras fases de la infección a través de su capacidad para responder rápidamente a la producción de IFN- γ (Nylen *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2003).

1.3.4 Monocitos/Macrófagos

De los diferentes tipos celulares que intervienen en la respuesta inmune ante la infección por *Leishmania spp.*, todas las especies de este parásito (independientemente del cuadro clínico resultante), parasitan principalmente células del sistema fagocítico mononuclear tales como los macrófagos (Alexander, 1992). Éstos cubren un papel triple en la enfermedad: 1) es una célula hospedera, 2) célula presentadora de antígenos que activan las células T específicas y 3) célula efectora cuya eficacia leishmanicida depende de la activación por parte de las citocinas IFN- γ y TNF- α (Ruiz & Becker, 2007; Gallego *et al.*, 2011). Entre los mecanismos efectores más importante del macrófago se encuentra la generación de intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) y del nitrógeno (RIN) entre los cuales el óxido nítrico durante el estallido respiratorio tiene un papel fundamental en la eliminación de *Leishmania spp.* (Hibbs *et al.*, 1988).

1.4 Respuesta inmune en la leishmaniasis

La evolución clínica de la infección por *Leishmania spp.* en los seres humanos varía de una forma benigna que puede llegar a la forma crónica y en algunos casos puede ser mortal. Uno de los factores principales involucrados es la especie de *Leishmania spp.* Se sabe que una sola cepa puede dar lugar a más de una forma clínica, aunque estas diferencias también pueden estar relacionadas con la respuesta inmune del hospedero (Liew & O'Donnell, 1993). En esta enfermedad tanto la respuesta inmune innata como la respuesta inmune adaptativa pueden ser inducidas (Sadick & Raff 1985).

1.4.1 Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata ante la infección por *Leishmania spp.* se inicia con el reconocimiento de parásitos por los receptores tipo Toll (TLRs). Estos receptores se encuentran presentes en macrófagos (M ϕ), células dendríticas (CD) y células asesinas naturales (NK) que reconocen moléculas de la superficie del parásito, tales como el lipofosfoglicano (LPG) o la glicoproteína de 63 kDa (gp 63). Los TLRs inducen la producción de citocinas proinflamatorias como: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el interferon gamma (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12) y además moléculas coestimuladoras que favorecen la activación de células como M ϕ o células NK, importantes para la eliminación de parásitos en la primera fase de la infección (Ruiz & Becker, 2007).

En el caso de la leishmaniasis experimental en el modelo murino, la activación de los macrófagos por citocinas como el IFN- γ constituye un mecanismo efector importante para la eliminación de parásitos intracelulares mediante la producción de NO (Williams *et al.*, 1991; Starke-Reed *et al.*, 1993). El efecto leishmanicida del NO en el modelo murino se ha demostrado por el bloqueo de la vía L-arginina a NO *in vitro* y este bloqueo impide la eliminación de los parásitos intracelulares (Peters *et al.*, 1990).

Por otro lado las células NK, pueden controlar localmente la diseminación del parásito mediante la producción de IFN- γ activando al macrófago, participando de esta manera en la eliminación de los parásitos o bien, la célula NK elimina las células infectadas con el parásito o bien a los parásitos que aún no han entrado al macrófago (Ridel *et al.*, 1988; Vargas-Inchaustegui *et al.*, 2009).

Sin embargo, *Leishmania spp.*, ya sea como promastigotes o amastigotes modula la respuesta Th1 y evade algunos mecanismos microbicidas como el superóxido y el NO,

además de la inhibición de la secreción de IL-12. Por otro lado, la secreción de citocinas tales como IL-10 y TGF- β favorecen una respuesta Th2 lo que conduce a una exacerbación de la enfermedad (Blackwell et al., 2004).

1.4.2 Respuesta inmune adaptativa

La respuesta inmune adaptativa se desarrolla con la presentación de los antígenos de *Leishmania spp.* por la célula presentadora de antígeno (CPA) a los linfocitos T, desarrollándose la respuesta inmune celular. En el modelo murino, linfocitos T CD4⁺ se diferencian en subpoblaciones productoras de citocinas que pueden favorecer o no la resolución de la enfermedad. Las células T CD8⁺ también se encuentran involucradas en la respuesta de memoria y resistencia a la reinfección por *Leishmania spp.*, caracterizada por una producción alta y rápida de IFN- γ (Müller et al., 2010).

Las citocinas que se asocian con el control y la eliminación del parásito en los ratones resistentes C57BL/6 son el IFN- γ , el TNF- α e IL-12, que son citocinas de la respuesta Th1. Por el contrario, las citocinas que promueven la progresión o exacerbación de la enfermedad en los ratones resistentes son de tipo Th2, tales como IL-4, IL-5, IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Williams et al., 1991; Scott, 1991; Ruiz & Becker, 2007; Sakai et al., 2010).

Sin embargo, en la leishmaniasis humana no existe un patrón claro en la producción de citocinas en las diferentes formas clínicas de la enfermedad (Lenis, 1998). Aunque en pacientes que resuelven la enfermedad presentan una respuesta tipo Th1, en pacientes con mucocutánea una mezcla de Th1 y Th2, y en pacientes con formas crónicas frecuentemente es una respuesta Th2 (Agudelo & Robledo, 2000).

1.5 Moléculas involucradas en la patogenicidad de *Leishmania* spp.

Diferentes autores han demostrado que algunas moléculas, participan en la virulencia de varias especies de *Leishmania*. El incremento en la expresión de estas moléculas está involucrado con el proceso de infección, la prolongación del tiempo de vida de la célula hospedera, la producción de energía, la respuesta al estrés y la sobrevivencia del parásito (Carnielli *et al.*, 2014). El lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína 63 (gp63) son las dos moléculas más estudiadas y que están relacionadas con la virulencia del parásito; ambas participan en la unión del parásito a la célula fagocítica. El glicoconjugado de superficie más estudiado es el LPG, que forma un denso glicocalix que cubre la superficie del parásito y el flagelo. El mayor número de moléculas de LPG se expresa en los promastigotes y en menor medida en los amastigotes (de Assis *et al.*, 2012). Por otro lado, la gp63 degrada al complemento e inhibe algunas acciones antimicrobianas de la célula hospedera (Handman, 2000). Además de estas dos moléculas se ha reportado que los proteofosfoglicanos (PPGs) son especialmente importantes en especies de *Leishmania* deficientes de LPG. En *L. amazonensis* una molécula heparina vinculante y esfingolípidos específicos de los amastigotes, están vinculados con el proceso de invasión (Handman & Bullen, 2002). En un estudio de proteómica de dos cepas de *Leishmania infantum* con diferente virulencia se encontraron 20 posibles proteínas de las cuales 16 habían sido anteriormente asociadas con la virulencia del parásito; en este estudio sugieren que el fenotipo de virulencia de *L. infantum* podría estar inicialmente asociado al aumento en la expresión de la proteína de membrana del kinetoplasto 11 (KMP-11), involucrada en la interacción con la célula hospedera y su expresión aumenta en la forma de amastigote. Adicionalmente, se demostró que la KMP-11 y el LPG se encuentran en asociación y cuando se expresaban en cantidades

similares, en ensayos *in vitro* los anticuerpos anti-KMP-11 L98 y L157 dirigidos a dos sitios distintos de unión, no reconocieron la KMP-11 (Jardim *et al.*, 1995). En 2014, en un estudio realizado con promastigotes de *L. infantum* se analizó el proteoma soluble resistente a miltefosina y el proteoma soluble sensible a miltefosina, se observó que la mayor parte de las proteínas reguladas se asociaron con la homeostasis, la respuesta al estrés, la protección a la apoptosis, y la translocación de moléculas. Estas proteínas expresadas diferencialmente probablemente están implicadas en la resistencia natural a la miltefosina y sugieren que el mecanismo miltefosina-resistente en *Leishmania* es multifactorial (Carnielli *et al.*, 2014).

1.6 Vías de secreción en *Leishmania* spp.

En el hospedero mamífero, el amastigote sobrevive dentro los macrófagos en los fagolisosomas maduros (Kima *et al.*, 2007), resistiendo condiciones de pH ácido y ataque de enzimas lisosomales, en respuesta a esto el amastigote secreta proteasas de cisteína o metaloproteasas que se cree participan en la manipulación de la respuesta inmune del hospedero mamífero (Olivier *et al.*, 2005; Santarem *et al.*, 2007). *Leishmania* spp, al igual que otros tripanosomátidos, son auxótrofos de purina (Ortiz *et al.*, 2007), por lo que para satisfacer sus requisitos esenciales de purina, *Leishmania* secreta una nucleasa que puede funcionar externamente del parásito para hidrolizar y obtener ácidos nucleicos del hospedero. Por otra parte, existe una creciente evidencia de que algunas proteínas de amastigotes se pueden exportar al citoplasma de la célula hospedera y modular directamente la señalización de esta (Mottram *et al.*, 2004; Naderer & McConville, 2008). Sin embargo, los mecanismos que subyacen en este proceso no están definidos. Es por esto que los parásitos de *Leishmania* spp. han evolucionado para ser capaces de secretar

proteínas o moléculas en todos los estadios de su ciclo de vida, ya sea dentro del vector o dentro del hospedero mamífero. Interessantemente, se ha visto en diversos estudios que estas proteínas pueden ser secretadas por tres vías de secreción: la clásica, no clásica y a través de exosomas (Figura B).

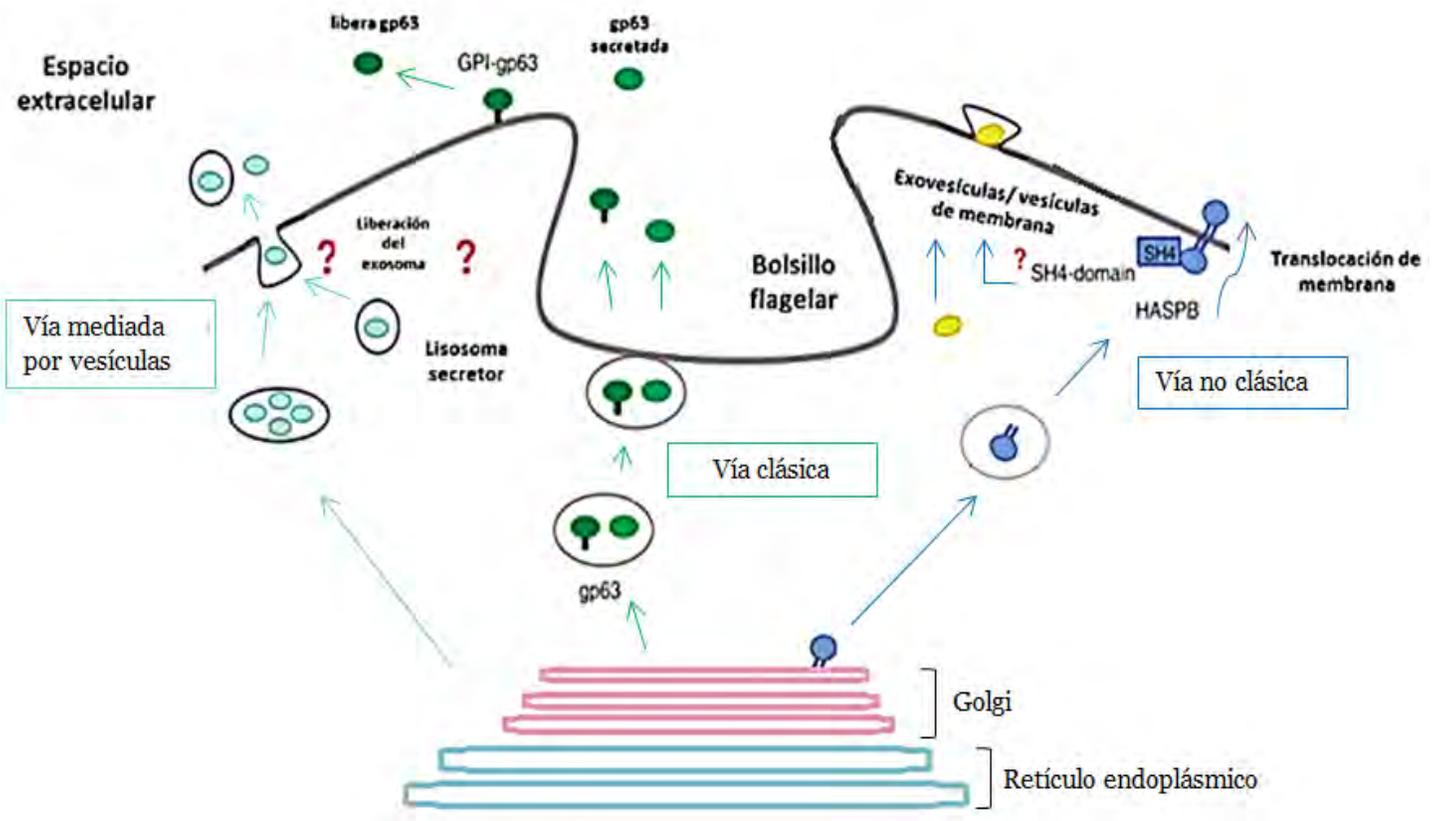


Figura B. Vías de secreción en *Leishmania* spp. (Verde) proteínas secretadas por vía clásica, (azul oscuro) proteínas secretadas por vía no clásica, (azul claro) proteínas secretadas a través de exosomas, (amarillo) exovesículas de membrana de la vía no clásica. Modificado de Corrales *et al.*, 2010.

1.6.1 Vía de secreción clásica

Las proteínas normalmente secretadas contienen un péptido señal N-terminal que las dirige al retículo endoplásmico (RE). La secuencia primaria del péptido señal no se conserva entre las proteínas, pero posee una estructura conservada de tres dominios: un dominio N básico, un dominio H hidrófobo y un dominio C polar. La translocación es mediada por el reconocimiento del péptido señal N-terminal y por una partícula de reconocimiento de señal, que lleva la cadena de péptido nascente al complejo translocón Sec61 dentro de la membrana del RE a través del cual tiene lugar el transporte. Después de la translocación al RE, el péptido señal normalmente es removido de la proteína madura por una peptidasa señal; esta vía de exportación de proteínas de las células eucariotas se conoce como la vía clásica o la vía del RE. Las proteínas procesadas en esta vía se denominan comúnmente como proteínas secretadas clásicamente y son transportadas a través del aparato de Golgi (AG) y exportadas por vesículas secretoras. Anteriormente, Schatz & Dobberstein (1996) habían reportado que *Leishmania spp.* utiliza la vía de secreción clásica. Un ejemplo de proteínas secretadas por esta vía es la gp63 y algunos PPGs (Corrales *et al.*, 2010) (Imagen B, verde).

1.6.2 Vía de secreción no clásica

Las proteínas secretadas que carecen de un péptido señal pueden ser exportadas de células eucariotas sin ayuda RE o el AG (Figura B, azul oscuro). Las características principales de la secreción no clásica son las siguientes: (1) la falta de señal de péptidos convencionales (N-terminal), (2) la exclusión de estas proteínas de organelos secretores clásicos, tales como el RE y el AG y (3) la secreción que es resistente a brefeldin A, un inhibidor

específico de la vía de secreción clásica (Seelenmeyer, S., & Nickel, 2003). Hasta la fecha, en los tripanosomátidos, la única proteína reportada que utiliza la vía secretora no clásica es la proteína hidrófila de superficie acilado B (HASPB) de *L. major*. Esta proteína está asociada con la cara externa de la membrana plasmática en los promastigote metacíclicos y en la fase de amastigotes (Denny *et al.*, 2000).

1.6.3 Secreción mediada por vesículas

Otra vía para la secreción de proteínas en eucariotas es a través de la liberación de los exosomas en el medio extracelular (Figura B, azul claro). Los exosomas son pequeñas microvesículas liberadas de las células por la fusión de cualquiera de los cuerpos multivesiculares o lisosomas secretores con la membrana plasmática (Simpson *et al.*, 2008). A diferencia de la vía secretora clásica, la secreción por exosomas surge directamente de la vía endocítica. Silverman y colaboradores en 2010, identificaron exosomas de *L. donovani* y proteínas exosomales en el compartimento citosólico de los macrófagos. Estos hallazgos sugieren que, al igual que los exosomas de mamíferos, *Leishmania* spp. utiliza esta vía de secreción para comunicarse con la célula (Silverman *et al.*, 2010; Corrales *et al.*, 2010). En otro estudio reportaron que en los primeros momentos de interacción con los macrófagos del hospedero mamífero, *L. mexicana* sintetiza rápidamente proteínas y exovesículas que podrían modular la señalización y función del macrófago, además, la producción de estas exovesículas y proteínas está relacionada con un aumento de la temperatura, tal como sucede al entrar en el hospedero mamífero (Figura C). Esta modulación podría resultar en una atenuación de la respuesta inflamatoria e inactivación de los macrófagos, ayudando al parásito en el establecimiento de la infección (Hassani *et al.*, 2011). Adicionalmente, en un

estudio de exosomas de *L. infantum* y *L. major* se encontró evidencia de que los exosomas liberados por *Leishmania* son parte del inoculo al momento de la picadura por el vector. Aunque hubo algunas diferencias, los exosomas derivados de ambas especies compartieron una serie de moléculas proinflamatorias, lo que podría ser responsable de su efecto sobre el desarrollo de la lesión. Los promastigotes de ambas especies secretan exosomas a través de tres vías diferentes: 1) cuerpos multivesiculares MVBs mediante un mecanismo similar al de células de mamíferos; 2) a través del saco flagelar y 3) vesículas que salen de la superficie de membranas discontinuas, a pesar de la red de microtúbulos que rodean el cuerpo celular de *Leishmania*. Curiosamente, se observó que MVBs se fusionaban directamente con la membrana del saco flagelar, lo que podría ser otra forma de liberación de exosomas al medio extracelular. Se ha mostrado que estas vesículas son secretadas por diferentes rutas y mostraron una estructura similar en la microscopía electrónica de transmisión (MET) (Atayde *et al.*, 2015).

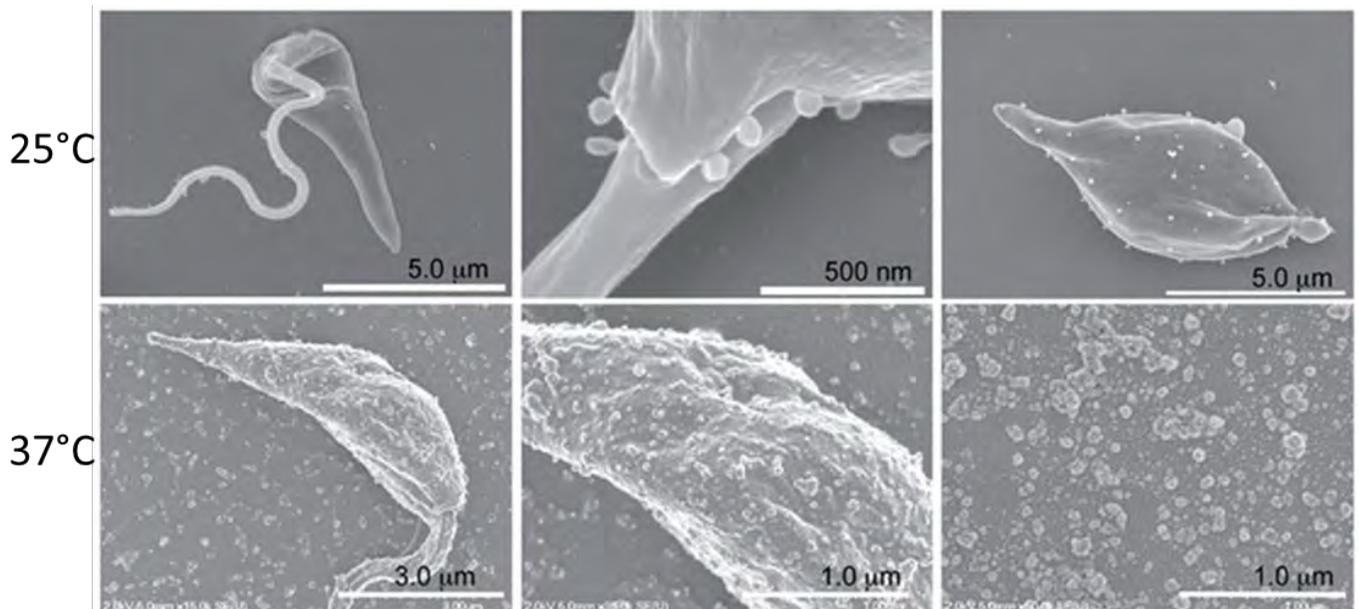


Figura C. Parásitos de *L. mexicana*. Incubados a 25 °C y 37 °C. Modificado de Silverman *et al.*, 2012

1.7 Secreción de proteínas por *Leishmania* spp.

Las proteínas de superficie del parásito tienen una importancia biológica fundamental, sin embargo, estas proteínas no sólo se localizan en la superficie celular sino que pueden llegar a ser secretadas (Martinez-Velasco & Espinoza, 2009; Silverman *et al.*, 2008). Mediante estudios de proteómica se observó que *L. donovani* secreta una gran cantidad de proteínas al medio, de las cuales se identificaron 151, de ellas, se observó que sólo unas pocas proteínas son secretadas mediante mecanismos clásicos, tal es el caso de las dos proteínas de superficie más abundantes: la proteasa gp63 y el proteofosfoglicano. Sin embargo, se han encontrado una gran cantidad de proteínas secretadas mediante un sistema de vesículas; entre las proteínas que se identificaron predominan aquellas que tienen un papel importante en la sobrevivencia del parásito dentro del fagolisosoma al ayudarlo a salir antes de ser eliminado. De las proteínas consideradas como factores de virulencia se identificaron algunas proteasas chaperonas como proteínas de choque térmico (HSP) 60 y 70 además de las proteínas involucradas en la formación de vesículas de transporte (Silverman *et al.*, 2008). En otro estudio utilizando proteínas secretadas por los promastigotes de *L. donovani* encontraron que estas proteínas inducen la producción de citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-12 en macrófagos murinos RAW 264.7, así como la activación de mecanismos efectores del macrófago (Gour *et al.*, 2012).

Son varios los estudios de proteómica en *Leishmania* spp. En *L. viannia braziliensis*, se identificaron proteínas secretadas por los promastigotes que tienen un peso molecular de 25 a 100 kDa. La electroforesis de dos dimensiones reveló un conjunto de 270 manchas de proteínas secretadas a partir de las cuales fueron identificadas con seguridad 42 proteínas. Los datos mostraron que \sim 5% de las proteínas identificadas presentan una señal de

secreción clásica, mientras que ~57% eran secretada a través de mecanismos de secreción eucarióticas de mamíferos o procariotas no clásicos de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Esto indica que la exportación de proteínas en este parásito podría proceder principalmente por vías no convencionales. Entre las proteínas identificadas de acuerdo a una clasificación funcional, se encontraron la HSP 70, la Ciclofilin A (relacionada con el plegamiento de proteínas), las enolasas e incluso una proteína ácido fosfatasa, entre muchas otras (Cuervo *et al.*, 2009).

En el análisis del exoproteoma de *L. infantum* observaron que la composición del contenido de proteínas y exovesículas de los parásitos variaba en las diferentes fases de su crecimiento. Aunque la proteína más abundante era la gp63. El exoproteoma de vesículas derivado de los parásitos en la fase logarítmica fue significativamente enriquecido en proteínas ribosomales, lo que indica un papel potencial de estas vesículas en el recambio de proteínas. Además, observaron un enriquecimiento específico de vesículas con propiedades similares a vesículas apoptóticas en los parásitos en fase estacionaria. Por otro lado observaron un aumento en la liberación de vesículas en respuesta a la miltefosina, un fármaco utilizado en el tratamiento de la leishmaniasis visceral (Santarém *et al.* 2013).

Otro estudio ha demostrado que los promastigotes de *L. mexicana* secretan una proteína de unión al plasminógeno que está relacionada con las primeras etapas de infección. Esta proteína es secretada en vesículas derivadas de la membrana del parásito (Figuera *et al.*, 2013). Otra proteína que es secretada por *L. mexicana* es la fosfatasa ácida en su forma de fosfoglicoproteína de 100 kDa y un fosfoglicano de alto peso. Estas moléculas forman una red que se ha observado *in vitro* (Wiese *et al.*, 1995).

1.8 Proteínas fosfatasas

Algunas proteínas que se ha reportado pueden ser secretadas a través de la vía clásica son las proteínas fosfatasas. Estas son enzimas que se encargan de desfosforilar residuos de aminoácidos fosforilados en tirosina (Tyr), serina (Ser) y treonina (Thr) (Szöör, 2010).

Se han reportado diferentes clasificaciones de las proteínas fosfatasas. Una de ellas con base al dominio catalítico y al residuo que desfosforilan en proteínas tirosina fosfatasas (PTP) y proteínas serina/treonina fosfatasa (PSTP). Las PTP comprenden cinco clases que incluyen a las PTP clásicas, PTPs de especificidad dual (DSP), PTP Cdc25, PTP de bajo peso molecular (PTPs-LMW) y las PTP EyA (basadas en Aspartato). Las PSTP se clasifican en tres familias tales como las fosfoproteínas fosfatasas (PPP), las proteínas fosfatasas dependientes de metal (PPM) cuyo representante es la proteína PP2C y las fosfatasas FCP/SCP (fosfatasa del dominio carboxilo-terminal (CTD) del componente TFIIF asociado a la RNA polimerasa II/pequeñas fosfatasas de CTD) (Moorhead *et al.*, 2007).

1.8.1 Fosfatasas de secreción en *Leishmania* spp.

Se sabe que en varias especies de *Leishmania* están presentes proteínas que tienen la habilidad de hidrolizar organofosfatos. Esta reacción es catalizada por diferentes proteínas fosfatasas que, además de estar dentro del parásito, también pueden estar presentes en la membrana e incluso ser secretadas al medio extracelular (Aguirre-García *et al.*, 2006; Szöör, 2010; Paletta-Silva *et al.*, 2012). Estas proteínas fosfatasas son secretadas constitutivamente por todas las especies de *Leishmania* y su función podría estar

relacionada con la sobrevivencia del parásito dentro de la célula hospedera (Barbieri *et al.*, 1998).

Se ha reportado que promastigotes de *L. donovani* sintetizan y secretan al medio de cultivo fosfatasa ácida y que éstas forman parte del proceso de secreción de manera constante y abundante. Estas fosfatasas secretadas por *L. donovani*, están compuestas por dos bandas heterodispersas de aproximadamente 110 y 130 kDa en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y los precursores intracelulares presentaron una disminución en el peso molecular (92.5 y 107 kDa, respectivamente) durante su biosíntesis. Esto fue demostrado por la adición de tunicamicina al cultivo de los parásitos, cuya acción es inhibir la glicosilación de las proteínas en el AG, lo que sugiere que esta proteína es secretada por la vía clásica (Bates & Dwyer, 1987). Por otro lado, datos comparativos entre diferentes cepas de promastigotes de *L. donovani* que presentaban actividad de fosfatasa ácida, indicaron que esta actividad podría estar correlacionada con el grado de virulencia, es decir, a mayor actividad de fosfatasa mayor grado de virulencia (Singla *et al.*, 1992).

Estudios realizados en una cepa de *L. amazonensis* revelaron que las proteínas fosfatasas participan en el proceso de fagocitosis, maduración de la vacuola parasitófora dentro de la célula hospedera y la sobrevivencia de los amastigotes. En este estudio analizaron la infección de macrófagos de ratones hembra BALB/c con promastigotes metacíclicos. Demostraron que el número de parásitos disminuyó cuando se preincubaron con ortovanadato de sodio, que es un inhibidor de fosfatasa. Los autores concluyeron que debido a la inhibición, algunos parásitos murieron y los que fueron internalizados no se multiplicaron dentro de la vacuola parasitófora. No obstante, el índice de fagocitosis aumentó con respecto al control en presencia del sobrenadante que contenía fosfatasas secretadas por los promastigotes metacíclicos y posteriormente parásitos (Fernandes *et al.*, 2013).

Otro estudio, ha demostrado que *L. major* es capaz de secretar fosfatasa y que esta enzima es capaz de desfosforilar el 4-metilumbiferil fosfato (MUP). Esta actividad de fosfatasa se inhibe con bajas concentraciones de tartrato de sodio (Shakarian & Dwyer, 2000).

1.8.2 Fosfatasa secretada por *Leishmania mexicana*

Son pocos los estudios realizados en la caracterización de estas proteínas en *L. mexicana*. A partir de promastigotes se purificó una proteína fosfatasa con un peso molecular resultante de 100 kDa que presentaba una compleja composición: 13.3% proteína, 74.4% carbohidratos y 12.3% fosfatos. Además, por la microscopía electrónica se observaron largos filamentos de proteofosfoglicano que son resistentes a detergentes (Ilg *et al.*, 1991). Estudios realizados por Overath y colaboradores en 1997, encontraron que promastigotes de *L. mexicana* secretaban a través del saco flagelar filamentos que contienen fosfatasa, sin aplicar factores específicos para su secreción.

Adicionalmente, en nuestro laboratorio se observó que los promastigotes y los amastigotes de la cepa MHO/MX/92UADY 68 secretaron al medio de cultivo proteínas con actividad de fosfatasa, en donde el tiempo óptimo de secreción depende de la fase del parásito. Para los promastigotes el tiempo óptimo de secreción fue de siete horas (Pardavé, 2008) y para los amastigotes fue de una hora (Ramírez-Álvarez, 2011), para ambos casos la viabilidad de los parásitos fue de 99%. Posiblemente, estas diferencias en las fosfatasa se relacionan con la supervivencia del parásito, ya que como anteriormente se mencionó está expuesto a diferentes ambientes que son agresivos, además pueden participar en regulación de la respuesta inmune del hospedero.

La cepa MHOM/MX/2011/Lacandona fue usada para los experimentos mostrados en este estudio. Fue aislada de un paciente Mexicano diagnosticado con LCL después de regresar de un viaje a la región de la selva Lacandona del estado de Chiapas. La cepa aislada fue identificado como *L. mexicana* mediante amplificación por PCR de una secuencia *L. mexicana*-específica del espaciador transcrito interno (ITS) del gen ribosomal RNA (rRNA), como se informó anteriormente (Berzunza-Cruz *et al.*, 2008). La infectividad de la cepa se mantuvo por el paso regular a través de los ratones BALB / c.

2 Justificación

Debido a los antecedentes que se tienen de que *Leishmania* spp. puede secretar proteínas al medio de cultivo, que éstas se han encontrado localizadas dentro del macrófago y que las proteínas fosfatasas secretadas presentan diferencias en cada fase del parásito, en este estudio realizado con promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/2011/Lacandona, la cual es una cepa altamente invasiva y patogénica en ratones BALB/c, caracterizamos estas enzimas y analizamos su efecto en la secreción de citocinas inflamatorias en macrófagos humanos.

3 Hipótesis

Los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/2011/Lacandona secretan proteínas fosfatasas al medio de cultivo y la incubación de estas proteínas con macrófagos humanos activa la secreción de citocinas inflamatorias.

4 Objetivos

4.1 General

- Identificar y caracterizar las proteínas fosfatasa secretadas al medio de cultivo por los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/2011/Lacandona y analizar la modulación que ejercen en la producción de citocinas por los macrófagos humanos.

4.1.1 Particulares

1. Obtener y concentrar las proteínas secretadas al medio de cultivo por los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana*.
2. Analizar la viabilidad de los promastigotes y de los amastigotes después del tiempo de secreción.
3. Caracterizar las proteínas presentes en los medios secretados por los promastigotes (MSP) y amastigotes (MSA)
 - a) Concentración de proteína
 - b) Actividad de fosfatasa
 - i. Diferentes sustratos: *p*-NPP, Tyr y Ser
 - ii. En presencia de cationes: MgCl₂ y MnCl₂
 - iii. Inhibidores específicos de PTP y PSTP
4. Analizar las proteínas presentes en los MSP y MSA en geles SDS-PAGE.

5. Identificar las proteínas fosfatasa en los MSP y MSA utilizando anticuerpos α -PP2C mediante Western blot.
6. Analizar la producción de las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-12p70 e IL-10 después de incubar macrófagos humanos con MSP y MSA.

5 Materiales y métodos

5.1 Ensayos de secreción

5.1.1 Obtención de las proteínas secretadas al medio de cultivo por los promastigotes de *Leishmania mexicana*

Los promastigotes obtenidos del quinto día de cultivo se lavaron dos veces en medio 199 modificado (199MD), el medio 199 no contiene SFB, fosfatos, ni L-tirosina. Se resuspendieron en aproximadamente 13 mL de 199MD, luego se separó una alícuota de parásitos de 1 mL, se contaron en cámara de Neubauer y se calculó el volumen total de medio para obtener una concentración final de 50×10^6 parásitos por mL. Los parásitos se incubaron por 7 horas a 26°C. Después se centrifugó a $2000 \times g$ durante 10 minutos para obtener el sobrenadante. El precipitado de parásitos se utilizó para analizar su viabilidad y para los posteriores ensayos de inmunoelectro transferencia (Western-blot). El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 4000 rpm durante 30 minutos y se pasó por un filtro de amicon (millipore) de 10 kDa de tamaño de poro, se concentró aproximadamente 10 veces y se guardó a -20 °C. Los sobrenadantes representan al medio 199MD que contiene las moléculas secretadas por los promastigotes (MSP) de *L. mexicana*. Como control negativo de los experimentos realizados se utilizó el medio 199MD solo.

5.1.2 Obtención de las proteínas secretadas al medio de cultivo por los amastigotes de *Leishmania mexicana*

Los amastigotes obtenidos al séptimo día de cultivo se lavaron dos veces en medio Schneider's Drosophila Medio Modificado (SDMM), el medio SDMM no contiene SFB, fosfato, ni algún aminoácido como: L-tirosina y L-treonina. Se resuspendieron en aproximadamente 13 mL de (SDMM), luego se separó una alícuota de parásitos de 1 mL y se pasó por jeringa para disgregar los conglomerados (clusters), se contaron en cámara de Neubauer y se calculó el volumen total de medio para obtener una concentración final de 50×10^6 parásitos por cada 0.5 mL. Los parásitos se incubaron por 1 hora a 33°C. Después se centrifugó a $2000 \times g$ durante 10 minutos para obtener el sobrenadante. La pastilla de parásitos se utilizó para analizar su viabilidad y para los posteriores ensayos de inmunoelectro transferencia (Western-blot). El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 4000 rpm durante 30 minutos y se pasó por un filtro de amicon (millipore) de 10 kDa de tamaño de poro, se concentró aproximadamente 10 veces su volumen y se guardó a -20 °C. Los sobrenadantes representan al medio SDMM que contiene las moléculas secretadas por los amastigotes (MSA) de *L. mexicana*. Como control negativo de los experimentos realizados se utilizó el medio SDMM solo.

5.2 Prueba de viabilidad de los promastigotes y los amastigotes de *Leishmania mexicana*

Las pastillas de parásitos después de los ensayos de secreción se resuspendieron en 1 mL de PBS, se tomaron de éste 20 μ L y se le agregaron 20 μ L de eritrosina B completando un

volumen de 100 μL con PBS, se homogeneizó bien y de esta dilución se tomaron 20 μL y se agregaron 180 μL de PBS, finalmente para contar en cámara de Neubauer se tomaron 10 μL . Los parásitos que estén teñidos de rosa se cuentan como muertos, con base en esto se calcula el porcentaje de viabilidad de los parásitos.

5.3 Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford

Las muestras (MSP, MSA, y los extractos totales), se cuantificaron por el método de Bradford. En una placa de 96 pozos se realizó una curva estándar de 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 por separado 100 μL de SSP, 100 μL de SSA y 5 μL de los extractos totales y las fracciones 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®, μQuant , Winooski, VT, EUA) con un programa KC4. Todo lo anterior se realizó por duplicado.

5.4 Determinación de la actividad enzimática de fosfatasa en los MSP y MSA

5.4.1 Determinación de la actividad enzimática de fosfatasas

En una placa de 96 pozos se añadió amortiguador acetato de sodio 0.2 M, 1 μg de proteína para el caso de MSP o 2 μg de proteína para el caso de MSA, 10 μL del sustrato de

fosfatasa *p*-NPP 0.1 M en un volumen final de 100 μ L. La reacción se incubó por 1 h a 37 °C y se detuvo con 20 μ L de hidróxido de sodio 2 N para analizarse en un espectrofotómetro (Biotek®, μ Quant) a una longitud de onda de 405 nm.

5.4.2 Determinación del efecto de cationes divalente

Se añadió amortiguador acetato de sodio 0.2 M pH 5, 1 μ g de proteína para el caso de MSP y 2 μ g para el caso de MSA en una placa de 96 pozos en las tres condiciones experimentales: 1) sin cationes, 2) agregando $MgCl_2$ a una concentración final 10 mM y 3) agregando $MnCl_2$ a una concentración final 1 mM. Posteriormente, a cada condición se le agregó 10 μ L del sustrato de fosfatasa *p*-NPP 0.1 M en un volumen final de 100 μ L. La reacción se incubó por 1 h a 37 °C y se detuvo con 20 μ L de hidróxido de sodio 2 N para analizarse en un espectrofotómetro (Biotek®, μ Quant) a una longitud de onda de 405 nm. Se realizó lo mismo utilizando como amortiguador HEPES 50 mM pH 7.

5.4.3 Determinación de la actividad específica de PTP y PSTP en los sobrenadantes secretados por los promastigotes y los amastigotes

En los medios secretados se analizó la actividad específica de PTP y PSTP, utilizando en cada caso el kit de “Ser/Thr” o “Tyrosine Phosphatase Assay System” (Promega) que contiene como sustratos, péptidos específicos con un sitio de fosforilación, (END (pY) INASL) y (RRA(pT) VA), respectivamente. Este sistema determina la cantidad de fosfato libre generado en la reacción por la acción de la fosfatasa correspondiente. La actividad se analizó en un amortiguador de acetato a pH 5.0 (descrito en la sección 4.4), se realizó una

curva patrón utilizando un estándar de fosfatos 1mM que se diluyó para obtener diferentes concentraciones (50, 100, 200, 500 y 1000 pmol). Se incubó el volumen correspondiente a 1 µg de proteína para ambos casos con 50 µM del sustrato en un volumen total de 100 µL, la reacción se paró con la adición de 50 µL de “Dye/additive” y la absorbancia se registró en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 630 nm.

5.5 Efecto de inhibidores específicos de PTP y PSTP sobre la actividad de los MSP y MSA

La actividad enzimática de fosfatasa se realizó con acetato de sodio 0.2 M pH 5 con inhibidores de la actividad de PTP (ortovanadato de sodio y molibdato de amonio a 200 µM y Tungstato de sodio a 100 µM), inhibidores de PSTP (ácido okadaico a 1 µM y Trifluoperazina a 100 µM) y sanguinarina el inhibidor específico de PP2C (20 µM). Posteriormente a cada condición se le agregó 10 µL del sustrato de fosfatasa *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®, µQuant) a una longitud de onda de 405 nm.

5.6 Análisis del perfil electroforético de los MSP y MSA

Las proteínas secretadas al medio 199MD y SDMM de los promastigotes y los amastigotes respectivamente, fueron precipitadas con acetona en una proporción 1:10 y ajustadas a 5 µg

de proteína. Como control se corrieron además, muestras precipitadas de medio de cultivo de los promastigotes y los amastigotes sólo en las mismas condiciones (concentrado, utilizando el mismo volumen correspondiente a la cantidad de proteína de los sobrenadantes secretados y precipitado). Posteriormente se analizaron mediante electroforesis en los geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10 % y se tiñeron con reactivos para tinción de plata (Silverplate, Bio-Rad). Para la electroforesis se aplicó un voltaje de 70 V por 30 min y después a 120 V hasta finalizar.

5.7 Obtención de los extractos totales de los promastigotes y los amastigotes después de la secreción de proteínas al medio de cultivo

Transcurrido el tiempo de secreción de los promastigotes y los amastigotes, siete horas y una hora, respectivamente, los parásitos se centrifugaron y posteriormente resuspendieron en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X, la suspensión 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 con los siguientes reactivos: amortiguador Tris-HCL 50 mM pH 7.4 estéril y un cóctel de inhibidores de proteasas compuesto por leupetin 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 %. Se verificó la lisis de los parásitos al microscopio. Posteriormente se tomó una alícuota que representa el extracto total de parásitos (ET), el resto se centrifugó a 13000 rpm x 10 min y se obtuvieron dos

fracciones más, la fracción citosólica (FC) y la fracción membranal (FM). Los extractos totales y las fracciones fueron almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

5.8 Identificación de las proteínas fosfatasas PP2C en los sobrenadantes secretados, así como en los extractos totales, la fracción citosólica y la fracción membranal de los promastigotes y los amastigotes

Para el análisis de la PP2C secretada en los MSP y MSA, los sobrenadantes fueron precipitados con acetona en una proporción 1:10 y ajustadas a $10\text{ }\mu\text{g}$ de proteína. Fue realizada una electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10 %. Para la electroforesis se aplicó un voltaje de 70 V por 30 min y después a 120 V hasta finalizar. Transcurrido el tiempo, el gel fue equilibrado en un buffer de transferencia por 10 min y las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF Immobilon-P, (Millipore) previamente activada en metanol por 3 min y lavada con agua desionizada tres veces cada 5 min para después equilibrarla en buffer de transferencia, la membrana PVDF fue colocada en una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad Laboratories) a 20 V durante 45 min. La membrana fue bloqueada con leche en polvo (Bio-Rad) al 5 % en TBST 1X, fue lavada con solución amortiguadora de Tris-Tween (TBST) 1X seis veces cada 10 min y fue incubada con el anticuerpo primario α -PP2C policlonal de *L. mexicana* en una concentración 1:1000 (obtenido en el laboratorio) y fue colocada en agitación constante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La membrana fue lavada nuevamente con TBST 1X, seis veces, cada 10 min. La membrana fue incubada una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG diluido 1:5000 en leche al 5 % en TBST 1X. Después de lavar seis veces con TBST 1X

cada 10 min, la membrana fue revelada usando un sustrato quimioluminiscente (Millipore) y fue expuesta a películas para rayos X (Kodak BioMax, MR).

5.9 Purificación de monocitos de sangre periférica humana

A partir de sangre periférica humana de sujetos sanos, se obtuvieron paquetes celulares o “buffy coats” del Banco de sangre del Hospital General de México. Se separaron células mononucleares de la sangre total utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque centrifugando a 2000 rpm por 20 min a 20 °C. De las fases obtenidas se separó la interfase densa (mononucleares) por aspiración y se colocó en un tubo limpio. Las células se lavaron una vez con PBS 1X y se centrifugaron a 1200 rpm por 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en solución lítica (NH_4 0.1 M, KHCO_3 1 M, Na_2 EDTA 0.1 M), para lisar los eritrocitos. Posteriormente se agregó PBS frío para lavar. Se centrifugó 1200 rpm a 4 °C durante 10 min. El paquete celular fue resuspendió en plasma y se centrifugó a 800 rpm por 10 min a 20 °C para eliminar las plaquetas. Se retiró el sobrenadante y para lavar las células se resuspendió el paquete celular en PBS 1X. Se tomó una alícuota de la suspensión para contar las células y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min a 4 °C.

Para separar los monocitos se utilizó un KIT MACS. Se resuspendió el paquete celular en 20 μL de CD14 Microbeads MACS. Se mezcló y se incubó durante 15 minutos a 4 °C. Transcurrido el tiempo se adicionó 1 o 2 mL de PBS 1X y se centrifugó a 1200 rpm por 10 min a 4 °C. Después se resuspendió en 3 mL de PBS 1X y se procedió a la separación magnética por selección positiva. Se colocó la columna (LS) en el separador MACS, se lavó con 3X3 mL de PBS, y se colocó la suspensión de células. Las células de nuestro

interés quedaron adheridas a la columna. Posteriormente, la columna fue retirada del magneto y fue lavada con PBS, se colectaron las células y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min a 4 °C. Se tomó una alícuota y se contaron las células. La pastilla que se obtuvo se resuspendió en medio RPMI-1640 (GIBCO) estéril y se colocó un millón de células por mililitro en cajas de baja adherencia (Costar) y se dejó para que los monocitos maduraran a macrófagos en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 5 días. La viabilidad celular se evaluó mediante azul de tripano.

5.10 Ensayos de citocinas

5.10.1 Producción de citocinas en los macrófagos estimulados con sobrenadantes secretados por los promastigotes y los amastigotes

Un total de 1×10^6 macrófagos obtenidos de la purificación se estimularon con 1 µg/mL de sobrenadante secretado por promastigotes y amastigotes de manera independiente. Como control positivo las células se incubaron con 10 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) durante 24 h. Transcurrido el tiempo se cuantificó la producción de las citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-12p70 como se indica en la sección siguiente.

5.10.2 Inmunoensayo enzimático estándar sándwich (ELISA)

Las concentraciones de citocinas se determinaron de acuerdo a BD-Pharmlingen como se indica a continuación. Para este ensayo se utilizaron placas de 96 pozos (Costar) de fondo plano tratadas para ELISA. El anticuerpo de captura se colocó en la placa. Previamente se

diluyó cada citocina en un regulador de unión (regulador de fosfato dibásico de sodio 0.1M a pH 9.0 (Na₂HPO₄) o PBS pH 7.4 según sea el caso para cada citocina. El volumen se calculó de acuerdo a la citocina a determinar. Se colocaron 50 µL de cada stock de citocinas por pozo, la caja se tapó y se dejó a 4 °C por un mínimo de 10 h. Posteriormente se lavó la placa en un lavador de ELISA con una solución compuesta por PBS y 0.01% de tween 80. Se bloqueó la placa con solución bloqueadora (NaOH 0.1 N, caseína y PBS pH 7.4), se agregaron 200 µL por pozo y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. Se lavó la placa y se colocaron 100 µL de cada una de las concentraciones de la curva estándar y de las muestras, se dejó toda una noche a 4 °C. Se colocaron 100 µL por pozo del anticuerpo de detección (según la citocina) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó la placa y se agregó Estreptavidina fosfata alcalina (GIBCO BRL), se incubó durante 30 min. Después la placa se lavó y se colocó la solución reveladora compuesta por regulador de sustrato y *p*-NPP, se agregaron 100 µL y se dejó interaccionar a temperatura ambiente y protegido de la luz de 15 a 60 min. La placa se leyó por 1 h en intervalos de 5 min aproximadamente en un espectrofotómetro (Biotek®, Quant) a 405 nm con la ayuda de un programa KC4 para analizar los datos que proporciona las concentraciones de las citocinas en las muestras. Finalmente las concentraciones de cada citocina se expresan en pg/mL y se graficaron en barras. Los resultados se expresan como la media del error estándar de al menos tres experimentos realizados por separado.

5.11 Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media \pm SEM (Error estándar de la media). Los resultados de las concentraciones de citocinas se analizaron mediante la prueba de U Mann-Whitney. Se consideraron las diferencias significativas cuando $P < 0,05$.

6 Resultados

6.1 Secreción de fosfatasa por promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/92/UADY 68 al medio de cultivo a diferentes tiempos

Se analizó la actividad de fosfatasa con la cepa de *L. mexicana*. Los promastigotes presentaron la secreción óptima de la actividad de la fosfatasa a las 7 h de incubación, donde se observó a una alta actividad de la fosfatasa. También se analizó la actividad de la fosfatasa secretada por amastigotes la cual mostró que esta actividad fue óptima a 1 h de incubación, pero en contraste con lo observado con promastigotes, la actividad fue baja.

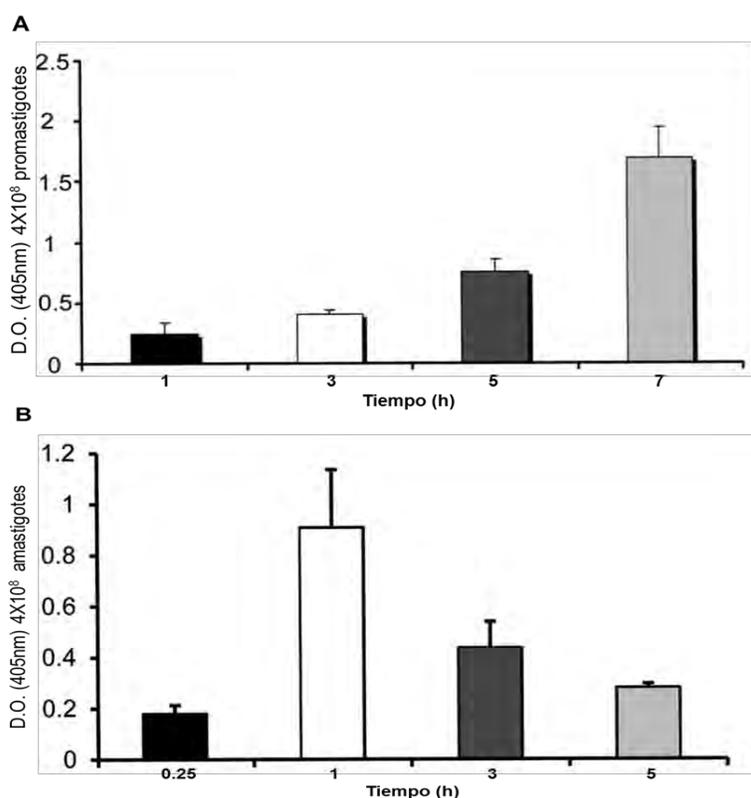


Figura 1. Secreción de fosfatasa por promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/92/UADY 68 a diferentes tiempos. A) Medio de cultivo secretado por promastigotes (MSP) a diferentes tiempos (1, 3, 5 y 7 h); B) Medio de cultivo secretado por amastigotes (MSA) a diferentes tiempos (0.25, 1, 3 y 5 h). Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM.

6.2 Viabilidad de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/2011/Lacandona

Posterior al tiempo de secreción a los promastigotes y a los amastigotes se les analizó la viabilidad utilizando eritrosina b, el cual es un colorante de viabilidad celular. Como se muestra en la figura 3, la viabilidad de los promastigotes y los amastigotes fue de un 98 % después de la secreción.

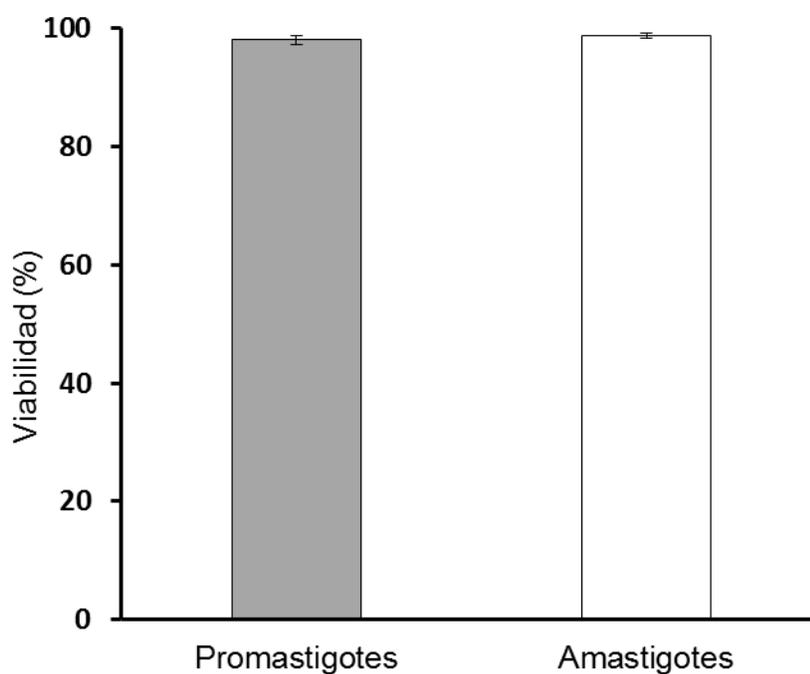


Figura 2. Viabilidad de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* después del tiempo de secreción. Las columnas representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras representan la desviación estándar. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM.

6.3 Análisis de la actividad enzimática de las proteínas secretadas por los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana*

6.3.1 Actividad general de fosfatasa

Se analizó la actividad de fosfatasa presente en MSP y MSA de la cepa MHOM/MX/2011/Lacandona después de 7 h y 1 h respectivamente. Se observó que la actividad de la fosfatasa de MSP fue mayor en comparación con la actividad de fosfatasa observada en MSA (Figura 3, panel A).

6.3.2 Especificidad de sustrato de las proteínas fosfatasas secretadas por los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana*

Las fosfatasas presentes en los MSP desfosforilan aproximadamente 55 pmol del sustrato de fosfotirosina (ENDpYINASL) por minuto, mientras que para el sustrato de fosfotreonina (RRApTVA) hubo una defosforilación de 13 pmol por minuto. Por otro lado los MSA desfosforilan aproximadamente 7 pmol del sustrato de fosfotirosina (ENDpYINASL) (Figura 3, panel B), mientras que para el sustrato de fosfotreonina (RRApTVA) hubo una defosforilación de 0.9 pmol (Figura 3, panel C).

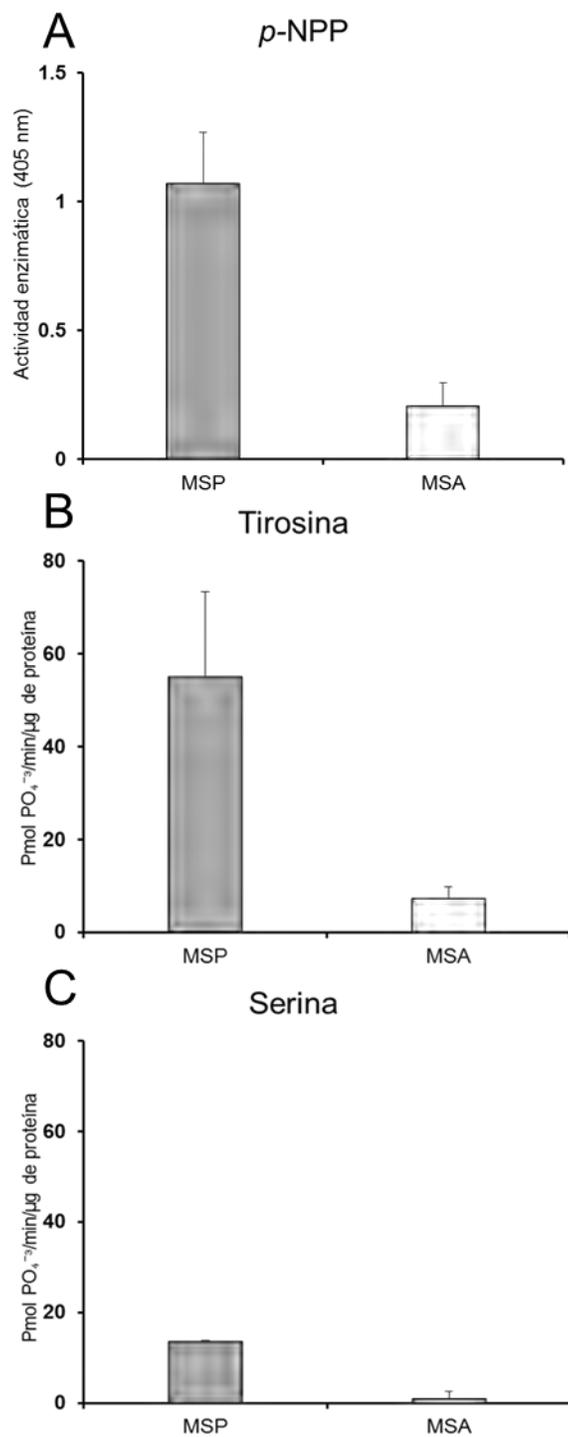


Figura 3. Actividad de fosfatasa en MSP y MSA de *L. mexicana* con diferentes sustratos. A) sustrato *p*-NPP; B) sustrato péptidos fosforilados sintéticos de fosfotirosina (END (pY) INASL) y C) sustrato péptidos fosforilados sintéticos de fosfoserina (RRA(pS)VA). Para cada condición se utilizó como blanco el mismo volumen de medio de cultivo solo, respectivamente. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM.

6.3.3 Actividad de fosfatasa en presencia de cationes

Se analizó la actividad de fosfatasa presente en MSP y MSA a dos diferentes pHs: 5 y 7, en presencia de dos cationes: $MgCl_2$ y $MnCl_2$ y sin cationes. Los MSP presentan una mayor actividad de fosfatasa a pH 5 y esta fue ligeramente mayor en presencia del catión $MgCl_2$, al analizar esta actividad de fosfatasa a un pH 7 los MSP pierden la actividad prácticamente en su totalidad. Por otro lado los MSA presentan actividad de fosfatasa aproximadamente 20 % más alta a pH de 7 comparada con la que presentan a pH 5 y al igual que en los MSP la adición de cationes tampoco incrementa de manera importante su actividad (Figura 3, panel B y C).

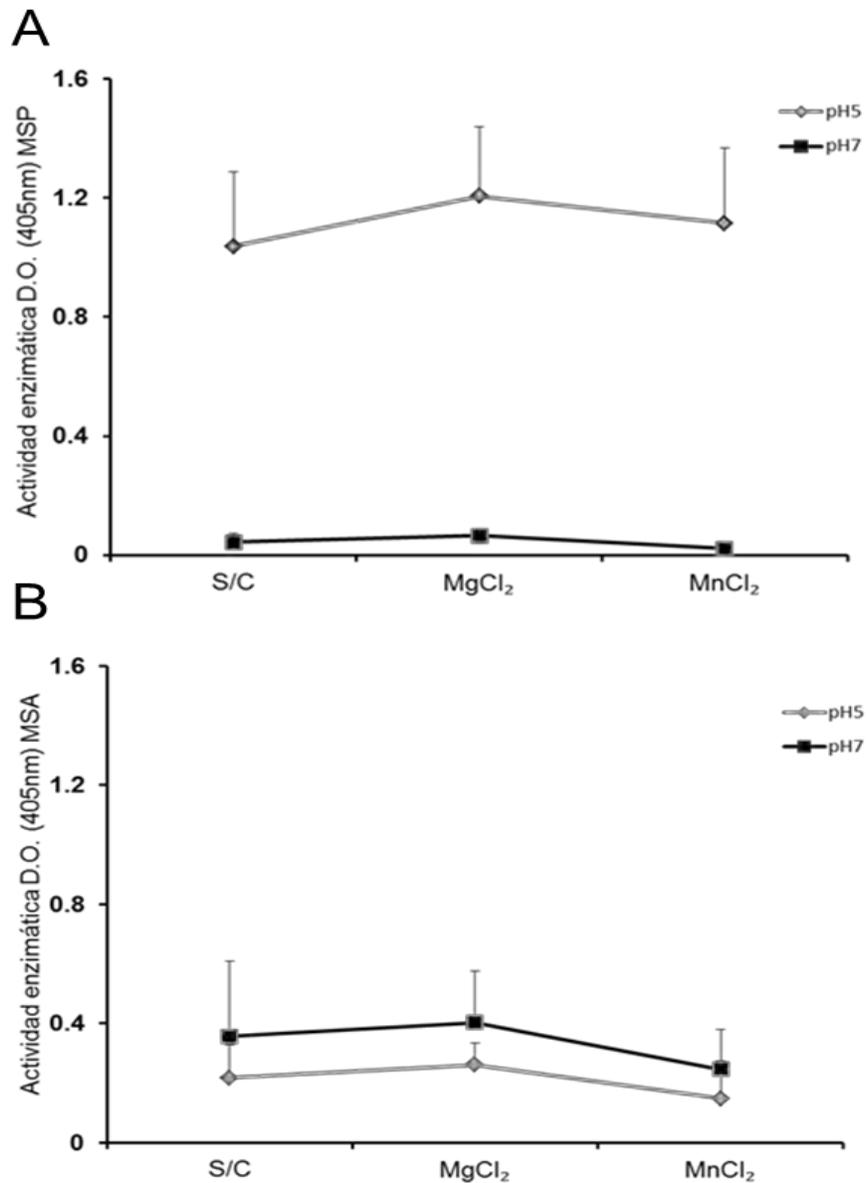


Figura 4. Actividad de fosfatasa en MSP y MSA de *L. mexicana* en presencia de cationes. A) Actividad enzimática de MSP en amortiguador de acetato pH 5 y amortiguador HEPES pH 7; B) Actividad enzimática de MSA en amortiguador de acetato pH 5 y amortiguador HEPES pH 7. Sin cationes (S/C). Cloruro de Magnesio (MgCl₂). Cloruro de Manganeso (MnCl₂). Para cada condición se utilizó como blanco el mismo volumen de medio de cultivo solo, respectivamente. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes ± SEM.

6.3.4 Análisis del efecto de inhibidores específicos de PTP y PSTP sobre la actividad de los MSP y MSA

Se analizó el efecto de inhibidores específicos de PTP y PSTP en MSP y MSA. Las fosfatasas presentes en MSP fueron inhibidas por ortovanadato de sodio (95 %), tungstato de sodio (95 %) y molibdato de amonio (98 %), los cuales son inhibidores específicos de PTP, por otro lado la actividad de fosfatasa resultó insensible al ácido okadáico y la trifluoperazina los cuales son inhibidores de PSTP, así como a la sanguinarina, el inhibidor específico de PP2C. En el caso de las fosfatasas presentes en MSA el efecto observado con los inhibidores específicos de PTP fue el siguiente: para el ortovanadato de sodio el porcentaje de inhibición fue de 45 %, tungstato de sodio 23 % y molibdato de amonio 26 % adicionalmente, las fosfatasas presentes en MSA resultaron sensibles a los inhibidores de PSTP aunque en un porcentaje muy bajo: ácido okadáico 4.3 %, trifluoperazina 5 % y a la sanguinarina 2 % (Figura 5, panel A y B).

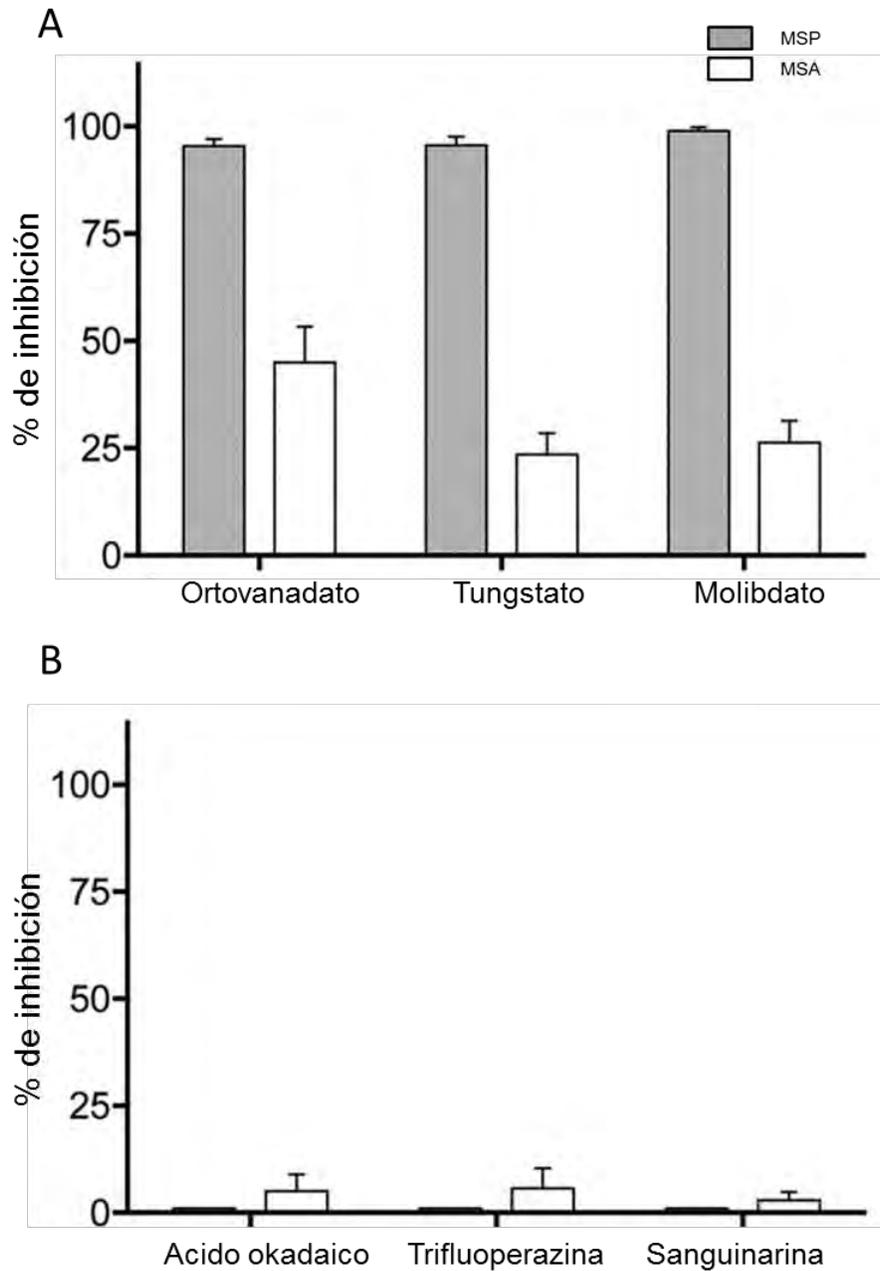


Figura 5. Efecto de inhibidores específicos de PTP y PSTP en la actividad de fosfatasa en MSP y MSA de *L. mexicana*. A) Efecto de diferentes inhibidores de PTP en la actividad de fosfatasa; B) Efecto de diferentes inhibidores de PSTP en la actividad de fosfatasa. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM.

6.4 Perfil de proteínas secretadas por los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana*

Con el fin de conocer el perfil de las proteínas secretadas, se analizaron en geles SDS-PAGE los MSP y MSA ajustados a 5 µg de proteína. En el carril 1 se muestran los marcadores de peso molecular. El carril 2, correspondiente a MSP, se observó un amplio patrón de proteínas con el predominio de una molécula de aproximadamente 72 kDa. El carril 3, el MSA, se observó nuevamente un amplio patrón de proteínas con el enriquecimiento de una molécula de aproximadamente 72 kDa (Figura 6). En la Tabla 1, se muestran los pesos moleculares observados en 4 geles donde fueron analizados los MSP y MSA, en intervalos expresados en kDa. Las proteínas secretadas en MSP presentan un rango de 16 hasta 151 kDa. Además, se observó siempre una proteína de 72 kDa. En MSA, las proteínas secretadas presentan un rango de 15 hasta 104 kDa, donde también se observó el enriquecimiento de una proteína de 72 kDa.

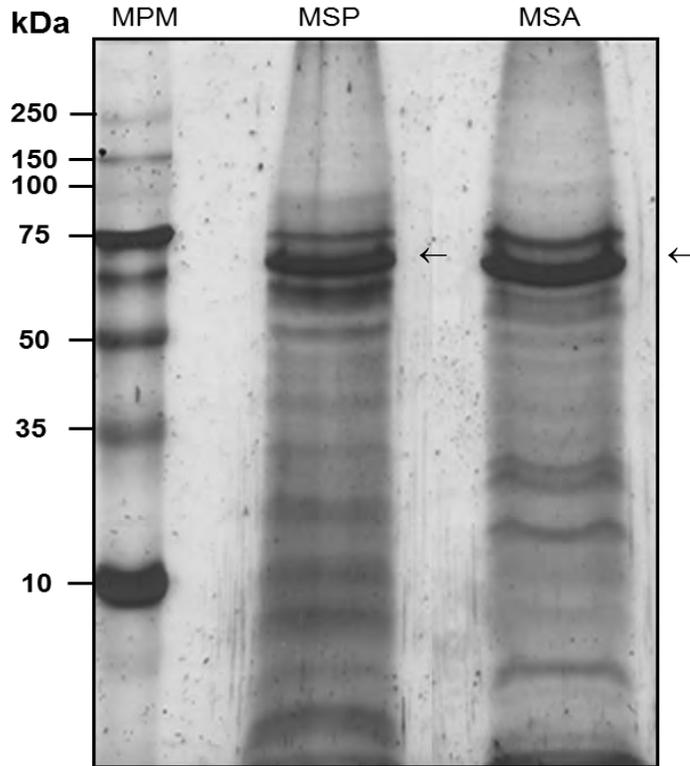


Figura 6. Perfil de proteínas de los sobrenadantes secretados por los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana*. (MPM) Marcadores de peso molecular; (MSP) sobrenadante secretado por promastigotes; (MSA) medio secretado de amastigotes. ← Enriquecimiento de banda de 72 kDa.

Tabla 1. Análisis de moléculas con diferentes pesos moleculares en geles SDS-PAGE al 10%.

Intervalos (kDa)	MSP				MSA			
	Geles							
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1-10								
11-20			*	*			**	**
21-30	*			*	*	*	*	*
31-40				*		*	**	*
41-50		*	*	*		*	**	*
51-60	**	*	*				*	*
61-70		*		*	*	**	**	
71-80	*	*	*	*	*	**	*	*
81-90	*	*	*	*	*		*	*
91-100		*		*	*			
101-151	*	*					*	*

Tabla 1. La tabla muestra la presencia de bandas en 4 geles de MSP y MSA de *L. mexicana* en intervalos expresados en kDa. Banda observada (*). Enriquecimiento de banda en 75 kDa (Amarillo).

6.5 Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en sobrenadantes secretados, y fracciones subcelulares de los promastigotes y los amastigotes

Se obtuvieron fracciones subcelulares de los promastigotes y los amastigotes después del tiempo de secreción (7 y 1 h respectivamente). Extracto total (ET), fracción citosólica (FC), fracción membranal (FM), MSP y MSA se corrieron en geles SDS-PAGE y se analizaron mediante Western blot utilizando un anticuerpo α -PP2C de *L. mexicana*. Se observó el reconocimiento de una molécula de aproximadamente 45 kDa en ET y FC de promastigotes y amastigotes, mientras que en los MSP y MSA el anticuerpo reconoció una molécula de aproximadamente 72 kDa, sin embargo, en la FM de los promastigotes y los amastigotes el anticuerpo α PP2C no detectó ninguna molécula (Figura 7).

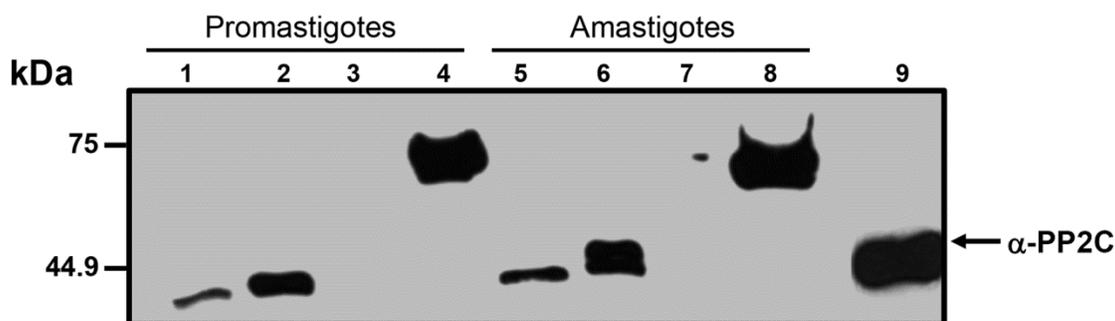


Figura 7. Inmunodetección de una proteína fosfatasa PP2C secretada al medio de cultivo y en fracciones subcelulares de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*. Extracto total (ET) de promastigotes y amastigotes (líneas 1 y 5), Fracción citosólica (FC) de promastigotes y amastigotes (líneas 2 y 6), Fracción membranal (FM) de promastigotes y amastigotes (líneas 3 y 7), MSP y MSA (líneas 4 y 8). Como control se utilizó una proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana* (línea 9)

6.6 Producción de citocinas por los macrófagos humanos

El efecto de MSP y MSA de *L. mexicana* lacandona fue analizado en la producción de las siguientes citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-12p70 e IL-10 en macrófagos humanos fueron incubados con los SSP y los SSA de *L. mexicana*, durante 24 horas. Para todos los casos se utilizó como control basal; a macrófagos sin estímulo (C) y como un control positivo; a macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS). La producción de TNF- α después de la estimulación con MSP incremento de 4 veces (212.16 pg/mL) comparado con los macrófagos no estimulados (50.5 pg/mL), el estímulo con MSA mostró también, un aumento de 3 veces (153.66 pg/mL) (Figura 8, panel A). La producción de IL-1 β después de la estimulación con MSP mostró un incremento de casi 3 veces (139.25 pg/mL) el valor observado en los macrófagos no estimulados (46.2 pg/mL), mientras que el estímulo con MSA incrementó de manera similar la producción de esta citocina (147.75 pg/mL) (Figura 8, panel B). La producción de IL-12p70 después del estímulo con MSP incrementó 2 veces (85.83 pg/mL) el valor observado en los macrófagos no estimulados (48 pg/mL), mientras que el estímulo con MSA mostro un incremento de poco más de 2 veces (113.75 pg/mL) (Figura 8, panel C). Finalmente, la producción de IL-10 después del estímulo con MSP incrementó aproximadamente 4 veces (219 pg/mL) el valor observado en los macrófagos no estimulados (58.1 pg/mL), mientras que el estímulo con MSA mostro un incremento de aproximadamente 3 veces (181.5 pg/mL) (Figura 8, panel D).

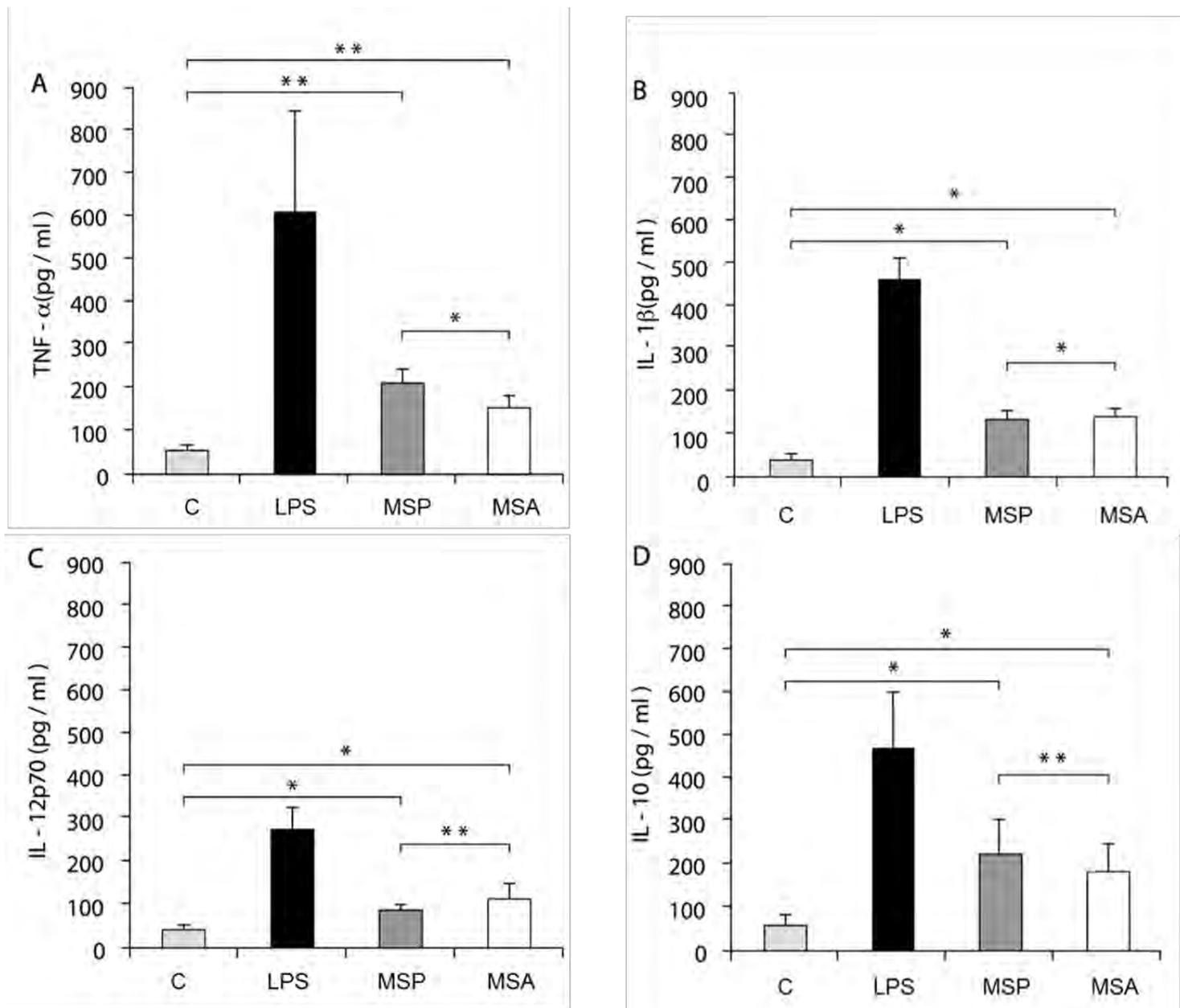


Figura 8. Producción de citocinas por los macrófagos humanos estimulados con MSP y MSA de *L. mexicana lacandona*. A) TNF- α ; B) IL-1 β ; C) IL-12p70; D) IL-10. Macrófagos basales (C), Macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS), Macrófagos estimulados con medio secretado de promastigotes (MSP), Macrófagos estimulados con medio secretado de amastigotes (MSA). La producción fue analizada por ELISA. Las barras representan el promedio \pm SEM de 4 experimentos diferentes. (*) indican diferencia significativa de $p < 0,05$ y (**) diferencia significativa de $p < 0,001$.

7 Discusión

La virulencia de los parásitos del género *Leishmania* spp. ha sido asociada a una gran cantidad de moléculas, entre las que destacan las de superficie del parásito. Sin embargo, debido a la persistencia de la enfermedad y a la progresiva resistencia del parásito a los fármacos, varios investigadores han dirigido su interés a moléculas que son secretadas por este parásito, con el fin de entender un poco más su biología y obtener nuevas moléculas blanco para desarrollar tratamientos y diagnósticos más efectivos así como la generación de una vacuna. Se sabe que durante la infección, *Leishmania* spp. tiene una gran capacidad adaptativa que le permite sobrevivir, debido a la diversidad de moléculas que han sido mencionadas como factores de virulencia. Además, las moléculas de superficie y las secretadas juegan un papel importante en la sobrevivencia del parásito (Santarém *et al.* 2007; Chang *et al.* 2003).

El objetivo de este trabajo fue analizar las proteínas que son secretadas al medio, por los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* lacandona, aislada de un paciente con una forma muy invasiva y patogénica de *Leishmania*. Principalmente, nos interesan las proteínas que son secretadas y presentan actividad de fosfatasa, debido a que los procesos de fosforilación y desfosforilación están presentes en todos los aspectos de la vida celular (Hunter 1995) y que por lo tanto podrían estar jugando un papel importante en el establecimiento y posterior desarrollo de la infección por *Leishmania*.

Anteriormente nuestro grupo reportó que efectivamente los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* cepa MHOM/MX/92/uady68 secretaban proteínas con actividad de

fosfatasa, con base en esos resultados, se utilizaron los tiempos óptimos de secreción para la actividad de fosfatasa ácida, la cual fue observada para promastigotes a las siete horas de incubación y una hora para los amastigotes (Pardavé 2008; Ramírez-Álvarez 2011). Se analizó la actividad de fosfatasa a estos tiempos para promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/2011/Lacandona, con la diferencia de que la actividad se realizó ajustando a proteína, 1 µg de MSP y 2 µg de MSA. Se analizó también la viabilidad de los promastigotes y los amastigotes después del tiempo de secreción y se observó que las fosfatasas secretadas al medio no eran resultado de daño celular. La actividad que presentaron las proteínas secretadas por los promastigotes fue más alta que la secretada por los amastigotes, lo cual, también se observó para la cepa MHOM/MX/92/uady68, además, esto resulta interesante ya que la actividad enzimática de fosfatasa para MSA se realizó con el doble de proteína que para el caso de MSP. Esta diferencia podría deberse a que los promastigotes secretan más proteínas fosfatasas o que éstas son más específicas. Adicionalmente, Fernandes y colaboradores reportaron que de manera similar a lo sucedido en este trabajo, las proteínas fosfatasas que secretan al medio los promastigotes de *L. amazonensis* presentan mayor actividad que los amastigotes (Fernandes *et al.*, 2013).

En el análisis de especificidad de sustrato de MSP y MSA se determinó que las fosfatasas secretadas defosforilan en residuos de tirosina (PTP) y serina/treonina (PSTP), sin embargo, ambos productos de secreción tienen preferencia por el sustrato de fosfotirosina. Información específica sobre las PTP de secreción de *Leishmania* no ha sido reportada hasta el momento, sin embargo, un análisis del genoma de tres tripanosomatidos: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *L. major* reveló que estos organismos no tienen tirosina cinasas, pero sí PTP, por lo que la determinación de las funciones que estas podrían

tener se ha vuelto más importante, dada su potencial participación en la regulación de la biología del parásito. En su análisis, no se identificó ningún receptor potencial de PTP, que es coherente con la falta de receptores tirosina cinasas. Además, las diferencias en las secuencias y la baja homología con PTP de humanos sugieren que estas fosfatasas pueden ser dianas adecuadas para el diseño de inhibidores específicos y selectivos contra la infección parasitaria y la transmisión (Brenchel *et al.*, 2007).

La fosforilación reversible es uno de los mecanismos biológicos más importantes para la regulación de señales intra- y extra-celulares en eucariontes y procariontes. Muchas vías de señalización celular son moduladas a través de la actividad antagonica de proteínas cinasas y proteínas fosfatasas, incluyendo rutas metabólicas, comunicación célula-célula, crecimiento y proliferación celular (Tonks, 2006). Además, mutaciones en estas proteínas pueden estar involucradas con enfermedades en mamíferos o resultar en una severa disminución en la virulencia e infección de bacterias patógenas. El papel específico de estas proteínas fosfatasas en protozoarios unicelulares como *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp. es poco entendido. Como bien se mencionó, las proteínas fosfatasas pueden ser clasificadas de acuerdo al dominio catalítico y al residuo que desfosforilan. Dentro de las PSTP, encontramos a las fosfatasas PPM que dependen de cationes como Mg^{2+} o Mn^{2+} para su actividad catalítica (Bork *et al.*, 1996). Una vez demostrado que los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* lacandona secretan proteínas fosfatasa al medio, proseguimos con la caracterización de éstas. Se realizó actividad de fosfatasa, en presencia y ausencia de cationes y a dos diferentes unidades de pH: 5 y 7, y utilizando *p*-NPP como sustrato. La actividad de fosfatasa en los MSP y MSA no mostró incremento cuando se adicionaron cationes. Sin embargo, el cambio en el pH afectó de manera importante las proteínas

fosfatasa presentes en MSP que tienen mayor actividad en pH 5, es decir, ácido. De manera contraria las proteínas fosfatasa presentes en MSA incrementaron su actividad cuando el pH fue de 7. Hasta el momento existen muy pocos reportes que caractericen bioquímicamente proteínas fosfatasa secretadas por *Leishmania* spp., sin embargo, se ha visto que proteínas fosfatasa secretadas por promastigotes metacíclicos de *L. amazonensis* tienen mayor actividad a pH 5 (Fernandes *et al.*, 2013). De estos datos en amastigotes hasta el momento no se tiene nada. Los promastigotes sobreviven y se multiplican en el tracto intestinal del vector, en donde el pH se alcaliniza después de que se alimenta con sangre (pH 8) y una vez digerida la sangre regresa a un pH 6, esta acidificación podría estar relacionada con la diferenciación de promastigotes procíclicos a metacíclicos (Santos *et al.*, 2008), sin embargo, en este estudio hemos visto que las proteínas fosfatasa secretadas por promastigotes pierden por completo su actividad, cuando el pH se alcaliniza. Nosotros proponemos que estas fosfatasa podrían participar cuando los promastigotes se encuentran dentro del fagolisosoma del macrófago, en donde el pH es ácido. Por otro lado, se sabe que cuando los amastigotes de *Leishmania* se encuentran dentro del fagosoma son capaces de transportar moléculas al citoplasma del macrófago (Silverman *et al.*, 2012), como bien se sabe el pH en el citoplasma del macrófago es neutro, por lo que sugerimos que las proteínas fosfatasa que secreta el amastigote podrían estar modulando alguna señalización en el citoplasma del macrófago ya que presentaron un aumento en la actividad a pH 7.

Consecuentemente, el análisis de inhibidores específicos de PTP y PSTP reveló que las fosfatasa en MSP fueron inhibidas casi por completo por inhibidores de PTP, mientras que resultaron insensibles a inhibidores de PSTP. De manera interesante los resultados mostrados para MSA muestran que tanto inhibidores de PTP como inhibidores de PSTP

disminuyen la actividad de fosfatasa, aunque los inhibidores de PSTP inhiben en porcentajes muy pequeños, sin embargo, aunque las fosfatasas en MSA fueron inhibidas, son hasta cierto punto resistentes, ya que los porcentajes de inhibición no superan el 50 %. Muy probablemente las proteínas fosfatasas que secretan los promastigotes y los amastigotes sean en mayor medida de tipo PTP.

Previamente, se ha reportado el efecto de algunos inhibidores de fosfatasas en promastigotes de *L. major*. En el estudio se observó que la actividad de las fosfatasas de membrana en promastigotes metacíclicos fue completamente inhibida por inhibidores de PTP como el ortovanadato, molibdato y tungstato (200 μM), e inhibidores de PSTP como el ácido okadaico (1 μM) y la trifluoperazina (100 μM) presentaron porcentajes de 100 y 98 % respectivamente. Por otro lado, la fracción membranal de promastigotes procíclicos presentó inhibición de 25, 80 y 50 % para ortovanadato, molibdato y tungstato, respectivamente, finalmente, inhibidores de PSTP mostraron porcentajes de inhibición de 38 % con el ácido okadaico y 19 % con la trifluoperazina (Aguirre-García *et al.*, 2005). Actualmente se sabe que la sanguinarina es un inhibidor específico de PP2C (Aburai *et al.*, 2010) y que esta requiere de cationes para su actividad catalítica (Burns *et al.*, 1993), sin embargo, nuestros resultados muestran que las proteínas fosfatasas tipo 2C de secreción de *L. mexicana* lacandonas a diferencia de lo observado en proteínas de membrana en *L. major*, no presentan actividad catalítica.

Estudios tempranos de parásitos intracelulares han demostrado que las proteínas de secreción-excreción son potentes inmunógenos o agentes protectivos, importantes para la formulación de vacunas (Choudhury *et al.*, 2010; Maue *et al.*, 2005). En este estudio, se

identificaron las proteínas secretadas por promastigotes y amastigotes (MSP y MSA) de *L. mexicana* lacadona, las cuales presentaron un amplio rango de pesos moleculares: desde 10 a 150 kDa. Se puede apreciar que el patrón es similar entre las proteínas de secreción de los promastigotes y los amastigotes y es importante remarcar que existe una molécula bastante notoria que tiene el peso aproximado de entre 72 y 75 kDa en ambos perfiles de secreción. En *L. donovani* se realizó un análisis de las proteínas secretadas por los promastigotes, se identificaron un total de 17 proteínas con pesos moleculares desde 11 hasta 80 kDa, dividieron las proteínas secretadas en fracciones por pesos moleculares y encontraron que dos fracciones mostraron excelentes capacidades antigénicas (Gour *et al.*, 2012), similares estudios se han encargado de identificar proteínas secretadas por los promastigotes de *Leishmania* spp., sin embargo, no existen estudios de proteínas de secreción en amastigotes, la cual por ser la forma intracelular y residente del hospedero mamífero es importante clínicamente.

Adicional a la caracterización de proteínas fosfatasa secretadas por promastigotes y amastigotes, se realizó Western blot utilizando un anticuerpo contra una PP2C recombinante de *L. mexicana* lacandona, el anticuerpo anti-PP2C reconoció en las fracciones subcelulares ET y FC de ambas fases del parásito una proteína de aproximadamente 45 kDa, mientras que en los MSP y MSA el anticuerpo reconoció una proteína PP2C de aproximadamente 75 kDa, fue un resultado que no esperábamos debido a que la PP2C recombinante de *L. mexicana* lacandona tiene un peso molecular de 45 kDa (Zuñiga-Fabian, 2014), sin embargo, en el genoma de *L. major* se identificaron 25 genes (Ivens *et al.*, 2005) que pueden codificar hasta para 88 proteínas fosfatasa, de las cuales, al menos 15 podrían ser de tipo PP2C (Brenchley *et al.*, 2007), además, el anticuerpo está

dirigido al sitio activo de esta proteína (CX5R), el cual es altamente conservado. Por otro lado, dentro de la familia PP2C de las fosfatasa se han encontrado un conjunto de 11 motivos altamente conservados (Bork *et al.*, 1996). Los motivos 1, 2, 5, 6, 8 y 11 son los más conservados en eucariontes, los cuales son residuos de ácido aspártico (Asp) altamente conservados que coordinan la unión de iones metálicos como Mg^{2+} o Mn^{2+} esenciales para la catálisis. El análisis de las secuencias de PP2C de *L. major* muestra que todos los motivos anteriormente mencionados poseen los residuos de Asp, con la excepción uno (LmjF36.1260), en el que faltan algunos de los residuos de Asp en el sitio de unión al metal. Fueron designados como “PP2C-like” (Brenchley *et al.*, 2007). En este estudio la caracterización bioquímica no presentó indicios de una proteína PP2C en los MSP y MSA, sin embargo, esto podría deberse a que la proteína tiene modificados o carece de uno o más motivos esenciales para su actividad, e incluso, esta proteína podría tener alguna otra función. Adicionalmente, el análisis del fosfatoma de tres kinetoplastidos: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *L. major*, reveló que estos organismos tienen una composición inusual de fosfatasa con la familia PTP reducida, mientras que la familia PSTP se ha expandido en comparación con las fosfatasa de humanos. También identificaron nuevas arquitecturas de dominios en varias fosfatasa con potencialmente nuevas funciones y una serie de fosfatasa únicas y atípicas (Brenchley *et al.*, 2007).

Finalmente, en este estudio se analizó la producción de citocinas por los macrófagos humanos estimulados con los MSP y MSA. La producción de citocinas proinflamatorias, principalmente $INF-\gamma$, $TNF-\alpha$ e IL-12 activan los mecanismos leishmanicidas en el macrófago (Ruiz and Becker 2006), como se puede ver en este trabajo los MSP y los MSA inducen la producción de citocinas proinflamatorias como $TNF-\alpha$, IL-1 β e IL-12p70,

adicionalmente, IL-10 la cual es una citocina mediadora y que se ha visto no es una citocina favorable en la resolución de la infección por leishmaniasis, también fue producida. En un estudio similar en *L. donovani* se identificaron proteínas de excreción-secreción de dos fracciones: F1 (11, 13 y 16 kDa) y F3 (26, 29 y 33 kDa) las cuales inducían las funciones efectoras en macrófagos (RAW 264.7), proliferación de linfocitos y producción de citocinas de tipo Th1 en PBMCs que normalmente se relaciona con una resolución favorable de la enfermedad (Gour *et al.*, 2012). Nuestros resultados indican que las proteínas secretadas por promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* lacandona también inducen la producción de citocinas, por lo cual, estas proteínas podrían ser blancos importantes de investigación. Además, la presencia de proteínas fosfatasas en los MSP y MSA, dado el hecho de la divergencia significativa de estas fosfatasas con las de humanos (Brenchley *et al.*, 2007), indica que estas enzimas pueden ser dianas adecuadas para el desarrollo de inhibidores específicos con aplicaciones terapéuticas.

8 Conclusiones

La leishmaniasis es una parasitosis de gran importancia a nivel mundial y que en los últimos años ha aumentado su frecuencia y distribución. Esto probablemente debido a la epidemia de VIH/SIDA, al calentamiento global y la continua invasión de los ambientes selváticos por el ser humano por motivos urbanísticos o para adquirir mayores terrenos de cultivo. Aunado a esto, *Leishmania* es un parásito sumamente exitoso que ha evolucionado para vivir en el interior de las células del hospedero mamífero y que ha desarrollado numerosas estrategias para evadir los múltiples mecanismos que tiene el sistema inmune para eliminarlo y desafortunadamente la terapia actual contra la leishmaniasis no es del todo eficaz (Ríos & Sousa, 2010). Es por esto, que nuestro estudio aporta información sobre aspectos importantes en la biología de este parásito y blancos nuevos de investigación para el desarrollo de terapias más efectivas e incluso la generación de una vacuna. Nosotros encontramos que:

- Los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/2011/Lacandona secretan proteínas con actividad de fosfatasa al medio de cultivo y esta actividad es diferente entre una fase y otra del parásito.
- Las proteínas fosfatasas que presentan actividad en los MSP y MSA son de tipo PTP.
- Los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* lacandona secretan una amplia variedad de proteínas.

- Los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* lacandona secretan una proteína PP2C que no presenta actividad catalítica.
- En los MSP y MSA existen proteínas que inducen la producción de citocinas proinflamatorias.

9 Perspectivas

Este es el primer estudio de caracterización en proteínas fosfatasas secretadas en dos fases del parásito *Leishmania mexicana* y el efecto de proteínas de secreción en la producción de citocinas proinflamatorias. Estudios más específicos podrían revelar el efecto únicamente de proteínas fosfatasas en la producción de citocinas y su función en la señalización de los macrófagos.

10 Referencias

1. CONTROL OF THE LEISHMANIASSES (2010) Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010 Introduction. Who Tech Rep Ser 949: Xii-+.
2. Agudelo SP & Robledo SM (2000) REVISIÓN DE TEMA. Respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania* spp. Iatreiva/vol 13/No.3/ Septiembre.
3. Aguirre-Garcia MM, Escalona-Montano AR, Bakalara N, Perez-Torre A, Gutierrez-Kobeh L & Becker I (2006) *Leishmania major* detection of membrane-bound protein tyrosine phosphatase. Parasitology 132: 641-649.
4. Alexander J (1992) The Interaction of *Leishmania* Species with Macrophages. Adv Parasit 31: 175-254.
5. Atayde VD, Aslan H, Townsend S, Hassani K, Kamhawi S & Olivier M (2015) Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. Cell Rep 13: 957-967.
6. Bates PA & Dwyer DM (1987) Biosynthesis and Secretion of Acid-Phosphatase by *Leishmania-Donovani* Promastigotes. Mol Biochem Parasit 26: 289-296.
7. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Pérez TA, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A (2003) *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. Mol Biochem Parasitol;130:65-74.
8. Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Salaiza SN, Pérez-Montfort R & Becker I (2009) PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis. Parasitol Res 104:691-699

9. Blackwell JM, Mohamed HS & Ibrahim ME (2004) Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link. *Trends Parasitol* 20: 268-274.
10. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK & Kupper TS (2006) The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. *J Immunol* 176:4431-9.
11. Bork P, Brown NP, Hegyi H & Schultz J (1996) The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: Detection of bacterial homologues. *Protein Science* 5:1421-1425. Cambridge University Press. Printed in the USA.
12. Burns JM, Parsons JrM, Rosman DE & Reed SG. (1993) Molecular Cloning and Characterization of a 42-kDa Protein Phosphatase of *Leishmania chagasi**. *The journal of biological chemistry*. Vol. 268, No. 23, Issue of August 15, pp. 17155-17161, 1993 Printed in U.S.A.
13. Brenchel R, Tariq H, McElhinney H, Szöör, Huxley-Jones J, Stevens R, Matthews & Taberner L. (2007) The TriTryp Phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics* 2007, 8:434 doi:10.1186/1471-2164-8-434.
14. Carnielli JBT, de Andrade HM, Pires SF, et al. (2014) Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant *Leishmania infantum chagasi* isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes. *J Proteomics* 108: 198-208.
15. Corrales RM, Sereno D & Mathieu-Daude F (2010) Deciphering the *Leishmania* exoproteome: what we know and what we can learn. *Fems Immunol Med Mic* 58: 27-38.

16. Corrales RM, Mathieu-Daude F, Garcia D, Breniere SF & Sereno D (2010) An Experimental Approach for the Identification of Conserved Secreted Proteins in Trypanosomatids. *J Biomed Biotechnol*.
17. Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia L, Mendonca-Lima L, Domont GB & Cupolillo E (2009) Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *J Proteomics* 73: 79-92.
18. Chang KP, Reed SG, McGwire BS & Soong L (2003) *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop* 85: 375-390.
19. Choudhury R, Das P, Bhaumik SK, De T & Chakraborti T (2010) In Situ Immunolocalization and Stage-Dependent Expression of a Secretory Serine Protease in *Leishmania donovani* and Its Role as a Vaccine Candidate. *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, Apr. 2010, p. 660–667 Vol. 17, No. 4
20. de Assis RR, Ibraim IC, Nogueira PM, Soares RP & Turco SJ (2012) Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Bba-Gen Subjects* 1820: 1354-1365.
21. Denny PW, Gokool S, Russell DG, Field MC & Smith DF (2000) Acylation-dependent protein export in *Leishmania*. *J Biol Chem* 275: 11017-11025.
22. Fernandes ACS, Soares DC, Saraiva EM, Meyer-Fernandes JR & Souto-Padron T (2013) Different secreted phosphatase activities in *Leishmania amazonensis*. *Fems Microbiol Lett* 340: 117-128.

23. Figuera L, Acosta H, Gomez-Arreaza A, Davila-Vera D, Balza-Quintero A, Quinones W, Mendoza-Briceno RV, Concepcion JL & Avilan L (2013) Plasminogen binding proteins in secreted membrane vesicles of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasit* 187: 14-20.
24. Gallego C, Golenbock D, Gomez MA & Saravia NG (2011) Toll-Like Receptors Participate in Macrophage Activation and Intracellular Control of *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Infect Immun* 79: 2871-2879.
25. Goto H & Lindoso JAL (2012) Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infect Dis Clin N Am* 26: 293-+.
26. Gour JK, Kumar V, Singh N, Bajpai S, Pandey HP & Singh RK (2012) Identification of Th1-responsive leishmanial excretory-secretory antigens (LESAs). *Exp Parasitol* 132: 355-361.
27. Grimaldi G & Tesh RB (1993) Leishmaniasis of the New-World - Current Concepts and Implications for Future-Research. *Clin Microbiol Rev* 6: 230-250.
28. Handman E (2000) Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology*, Vol 44 44: 1-39.
29. Handman E & Bullen DV (2002) Interaction of *Leishmania* with the host macrophage (vol 18, pg 332, 2002). *Trends Parasitol* 18: 417-417.
30. Hassani K, Antoniak E, Jardim A & Olivier M (2011) Temperature-Induced Protein Secretion by *Leishmania mexicana* Modulates Macrophage Signalling and Function. *Plos One* 6.
31. Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354(9185): 1191-99.

32. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z & Rachlin EM (1988) Nitric-Oxide - a Cyto-Toxic Activated Macrophage Effector Molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 87-94.
33. Hunter T (1995) Protein-Kinases and Phosphatases - the Yin and Yang of Protein-Phosphorylation and Signaling. *Cell* 80: 225-236.
34. Ivens, AC, Peacock C S, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman, M, ... & Anupama A. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309(5733), 436-442.
35. Jardim A, Funk V, Caprioli RM & Olafson RW (1995) Isolation and Structural Characterization of the *Leishmania donovani* Kinetoplastid Membrane Protein-11, a Major Immunoreactive Membrane Glycoprotein. *Biochem J* 305: 307-313.
36. Laskay T, van Zandbergen G & Solbach W (2008) Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* 213:183-91
37. Laurenti MD, Gidlund M, Ura DM, Sinhorini IL, Corbett CE & Goto H (1999) The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 32:323-5.
38. Lenis AM. (1998) "La respuesta celular inmune en la Leishmaniasis cutánea americana." *Biomédica* 18(4):274-284
39. Liew FY & O'Donnell CA (1993) Immunology of Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, Vol 32 32: 161-259.
40. Lima GM, Vallochi AL, Silva UR, Bevilacqua EM, Kiffer MM & Abrahamsohn IA (1998) The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett* 64:145-51.

41. Martinez-Velasco L., Espinoza B (2009). “Importancia de las proteínas de superficie y secretadas en la capacidad infectiva de tres patógenos humanos.” *El Residente* IV(3): 92–96.
42. Maue AC, Waters WR, Davis WC, Palmer MV, Minion FC & Estes DM (2005) Analysis of immune responses directed toward a recombinant early secretory antigenic target six-kilodalton protein–culture filtrate protein 10 fusion protein in mycobacterium bovis-infected cattle. *INFECTION AND IMMUNITY* , Oct. 2005, p. 6659–6667 Vol. 73, No. 10
43. McConville MJ & Handman E (2007) The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *Int J Parasitol* 37: 1047-1051.
44. McDowell MA, Marovich M, Lira R, Braun M & Sacks D (2002) Leishmania priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. *Infect Immun* 2002;70:3994-4001.
45. McFarlane E, Perez C, Charmoy M, Allenbach C, Carter KC, Alexander J & Tacchini-Cottier F (2008) Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 76:532-41.
46. Moll H, Fuchs H, Blank C & Rollinghoff M (1993) Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 23:1595-601.
47. Moorhead GBG, Trinkle-Mulcahy L & Ulke-Lemee A (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Bio* 8: 234-244.
48. Muller IB, Knockel J, Eschbach ML, Bergmann B, Walter RD & Wrenger C (2010) Secretion of an acid phosphatase provides a possible mechanism to acquire host nutrients by *Plasmodium falciparum*. *Cell Microbiol* 12: 677-691.

49. Mottram JC, Coombs GH & Alexander J (2004) Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. Science Direct. Current Opinion in Microbiology 2004, 7:375–381
50. Naderer T & McConville M (2008) The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective. Cellular Microbiology 10(2), 301–308
51. Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, Iparraguirre A, Cavanagh LL, Tricas JA, Beverley SM, Scott P & Weninger W (2008) Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. PLoS Pathog 4:e1000222.
52. Nylen S, Maasho K, Soderstrom K, Ilg T & Akuffo H (2003) Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. Clin Exp Immunol 131:457-67.
53. Olivier M, Gregory DJ, & Forget G (2005) Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. Clinical microbiology review. doi:10.1128/CMR.18.2.293–305.2005.
54. Overath P, Stierhof YD, Wiese M (1997) Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. Trends in Cell Biology , Volume 7 , Issue 1 , 27 – 33.
55. Ortiz D, Sanchez MA, Pierce S, Herrman T, Kimblin N, Archie Bower HG & Scott ML (2007) Molecular genetic analysis of purine nucleobase transport in *Leishmania major*. Molecular Microbiology 64(5), 1228–1243

56. Paletta-Silva R, Vieira-Bernardo R, Cosentino-Gomes D & Meyer-Fernandes JR (2012) *Leishmania amazonensis*: Inhibition of 3'-nucleotidase activity by Cu²⁺ ions. *Exp Parasitol* 131: 63-68.
57. Pardavé-Alejandro D (2008). Tesis Licenciatura UNAM “Secreción de La Proteína Tirosina Fosfatasa Por Promastigotes de *Leishmania mexicana*.”
58. Pearson RD, Romito R, Symes PH & Harcus JL (1981) Interaction of *Leishmania-Donovani* Promastigotes with Human Monocyte-Derived Macrophages - Parasite Entry, Intracellular Survival, and Multiplication. *Infect Immun* 32: 1249-1253.
59. Pearson RD & Steigbigel RT (1981) Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 127:1438-43.
60. Peters W, Bryceson A, Evans DA, Neal RA, Kaye P, Blackwell J, Killickendrick R & Liew FY (1990) *Leishmania*-Infecting Man and Wild Animals in Saudi-Arabia .8. The Influence of Prior Infection with *Leishmania-Arabica* on Challenge with L-Major in Man. *T Roy Soc Trop Med H* 84: 681-689.
61. Ramírez-Álvares, Carlos (2011) “Identificación Y Caracterización de Proteínas Fosfatasa Secretadas Por Promastigotes de *Leishmania mexicana*.”
62. Reithinger RD, Louzir JC, Pirmez HC, Alexander B & Brooker S. (2007). “Cutaneous Leishmaniasis.” *The Lancet infectious diseases* 7(9): 581–96.
63. Reveiz L, Maia-Elkhoury ANS, Nicholls RS, Romero GAS & Yadon ZE (2013) Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. *Plos One* 8.

64. Ridel PR, Esterre P, Dedet JP, Pradinaud R, Santoro F & Capron A (1988) Killer Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *T Roy Soc Trop Med H* 82: 223-226.
65. Ritter U, Meissner A, Scheidig C & Korner H (2004) CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol* 34:1542-50.
66. Ruiz JH & Becker I (2007) CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 29: 671-678.
67. Sadick MD & Raff HV (1985) *Leishmania-Tropica* - Differences in the Antigenicity of Promastigotes and Amastigotes. *Cell Immunol* 91: 404-414.
68. Sakai S, Takashima Y, Matsumoto Y, Reed SG, Hayashi Y & Matsumoto Y (2010) Intranasal immunization with Leish-111f induces IFN-gamma production and protects mice from *Leishmania major* infection. *Vaccine* 28: 2207-2213.
69. Santarem N, Tomas A, Ouaisi A, Tavares J, Ferreira N, Manso A, Campino L, Correia JM & Cordeiro-da-Silva A (2005) Antibodies against a *Leishmania infantum* peroxiredoxin as a possible marker for diagnosis of visceral leishmaniasis and for monitoring the efficacy of treatment. *Immunol Lett* 101: 18-23.
70. Santarem N, Silvestre R, Tavares J, Silva M, Cabral S, Maciel J & Cordeiro-da-Silva A (2007) Immune response regulation by *Leishmania* secreted and nonsecreted antigens. *J Biomed Biotechnol*.
71. Santarem N, Racine G, Silvestre R, Cordeiro-da-Silva A & Ouellette M (2013) Exoproteome dynamics in *Leishmania infantum*. *J Proteomics* 84: 106-118.

72. Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Junior VF, Pinto AC, & Nakamura CV (2008). Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *Journal of ethnopharmacology*, 120(2), 204-208.
73. Scott P (1991) Host and Parasite Factors Regulating the Development of Cd4+ T-Cell Subsets in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Res Immunol* 142: 32-36.
74. Schatz G & Dobberstein B (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271: 1519-1526.
75. Seelenmeyer C, Stegmayer C & Nickel W (2008) Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 and galectin-1 does not require shedding of plasma membrane-derived vesicles. *Febs Lett* 582: 1362-1368.
76. Shakarian AM & Dwyer DM (2000) Structurally conserved soluble acid phosphatases are synthesized and released by *Leishmania major* promastigotes. *Exp Parasitol* 95: 79-84.
77. Shakarian AM & Dwyer DM (2000) Pathogenic *Leishmania* secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. *Exp Parasitol* 94: 238-242.
78. Silveira FT, Lainson R & Corbett CE (2004) Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. *Mem I Oswaldo Cruz* 99: 239-251.
79. Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ & Reiner NE (2008) Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol* 9.

80. Silverman JM, Clos J, De'Oliveira CC, Shirvani O, Fang Y, Wang C, Foster LJ & Reiner NE (2010) An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci* 123: 842-852.
81. Silverman JM & Reiner NE (2012) *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 1:26.
82. Simpson RJ, Jensen SS & Lim JWE (2008) Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics* 8: 4083-4099.
83. Singla N, Khuller GK & Vinayak VK (1992) Acid Phosphate Activity of Promastigotes of *Leishmania-Donovani* - a Marker of Virulence. *Fems Microbiol Lett* 94: 221-225.
84. Starke-Reed PE, Oliver CN, Carney JM & Stadtman ER (1993) Modification of Proteins during Oxidative Stress and Aging. *Free Radical Bio Med* 15: 479-479.
85. Szoor B (2010) Trypanosomatid protein phosphatases. *Mol Biochem Parasit* 173: 53-63.
86. Tonks, NK. (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006/11/print 7- 11 - 833 - 846 Nature Publishing Group SN - 1471-0072://dx.doi.org/10.1038/nrm2039
87. Vargas-Inchaustegui DA, Tai W, Xin LJ, Hogg AE, Corry DB & Soong L (2009) Distinct Roles for MyD88 and Toll-Like Receptor 2 during *Leishmania braziliensis* Infection in Mice. *Infect Immun* 77: 2948-2956.

88. Wiese M, Ilg T, Lottspeich F & Overath P (1995) Ser/Thr-Rich Repetitive Motifs as Targets for Phosphoglycan Modifications in *Leishmania-Mexicana* Secreted Acid-Phosphatase. *Embo J* 14: 1067-1074.
89. Williams ME, Chang TL, Burke SK, Lichtman AH & Abbas AK (1991) Activation of Functionally Distinct Subsets of Cd4+ Lymphocytes-T. *Res Immunol* 142: 23-28.
90. WHO (2016) “WHO.” <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
91. Zuñiga-Fabian M (2014) Caracterización y purificación bioquímica de la proteína fosfatasas PP2C de *Leishmania mexicana*. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga. UNAM.