



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
PROTEÍNAS FOSFATASAS SECRETADAS POR  
AMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CARLOS RAMÍREZ ÁLVAREZ



DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA  
2011



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 del jurado

### 1.- Datos del alumno

Ramírez

Álvarez

Carlos

26 31 00 37

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

303154833

### 2.- Datos del tutor

Dra.

María Magdalena

Aguirre

García

### 3.- Datos del sinodal 1

Dra.

Ana

Flisser

Steinbruch

### 4.- Datos del sinodal 2

Dr.

Heliodoro

Celis

Sandoval

### 5.- Datos del sinodal 3

M. en C.

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

### 6.- Datos del sinodal 4

Dra.

Patricia Margarita

Tato

Saldivar

### 7.- Datos del trabajo escrito

Identificación y caracterización de proteínas fosfatasas secretadas por amastigotes de

Leishmania mexicana

52 p

2011

*...Por un lugar difícil caminamos, andamos aquí en la tierra.  
Por un lado un abismo, por el otro un barranco.  
Si no vas por en medio caerás de un lado o del otro,  
Sólo en el medio se vive, sólo en el medio se anda...*

Fragmento de Huehuetlatolli

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. María Magdalena Aguirre García.

## DEDICATORIAS:

A mis padres, por darme el privilegio de cursar estudios universitarios.

A mi madre, Lucía Teresa Álvarez Hernández, por tu apoyo y tu ejemplo de ética, del deber y de la lucha. A mi padre Margarito Ramírez Ruiz, por su apoyo y el gran amor paternal que me das. A mi hermano Óscar, por hacerme compañía.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, el espacio de discusión y desarrollo de ideas que ha promovido mi desarrollo como profesional y como universitario. A los profesores que me han enseñado a cuestionar, razonar e imaginar. Les quedo en deuda intelectual.

A mis amigos Angélica, Rafael, Ulises, Juan Carlos, Tania, Zaira, Jania, Carla, Ale (Larck) y Joaquín, sin ustedes, no sería lo que soy, me han enseñado mucho, gracias.

A mis familiares, por todo el apoyo y afecto que me han dado durante mi vida.

Un agradecimiento especial a la M. en C. Alma Reyna Escalona Montaña, por su ayuda, sin ella no habría sido posible esta tesis.

A mi tutora, la Dra. María Magdalena Aguirre García por la oportunidad que me dio de desarrollar este proyecto, por su apoyo, asesoramiento y consejo.

A la Dra. Ingeborg Becker, por su amabilidad y por brindarme el espacio hospitalario para la realización de esta Tesis.

A Rocely Cervantes Saravia por su invaluable ayuda en la realización de esta tesis.

A mis sinodales, por la amable revisión de esta tesis, les quedo en deuda intelectual.

A la UNAM DGAPA por el apoyo económico para la realización de esta tesis, con el número de Programa IN212606 de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT y por apoyo de beca PAPIIT Número IN212409.

Al personal del bioterio de Medicina Experimental, en especial a Ricardo y Daniel.

A mis padrinos Delfino Ambrosio y Rosaelia Montalván. A mi madrina Norma Peláez. Que siempre he tenido en gran estima.

A todo el laboratorio de inmunoparasitología (Jesús, Jorge, Germán, Juan, Daniel, Araceli, Aratzeni, Jaime, Lorena, Susana, Nané, Paloma, Adriana, José, Cris, Miriam, Angie, Laura, Silvia, Dulce, Eddie, ambos Marcos, Omar, Ingrid, Jenny, Edith, Berenice, Diana, Arturo Wilkins, Carlos Alberto) por su amabilidad, por hacer el trabajo ameno, por la ayuda desinteresada y atenta que me dieron, gracias.

A Mitzy, Tulli, Macario, Les (azul), Dení, Jime, a la Queen, Zitla, Laurita, Clau, Licha, Erandy, Ursula, Adri, Claudia, Daniela, Ana, Diana, Sopas, Leslie, Yola, Bris, Cintia, Sara, Rubén, Diana, Lore, Ian, Mariana, Bere, Val, Pau, Poncho, Kabeto, Duque, Omar (güero), Sionela, Wendy, Victor (Primo), Marta, Naye, Yoali, la Chona, Citripio, Vero, Alejandro Caver, Pamela, Magali, Osquis, Diana Elinos, Sara, Rach, Gis, Juanita, Abril, Víctor (Chito), Pablovski, Hugo Sánchez, Rafael Cruz, Manolo, Juan Salvador, Fercho, Jorgito, Ericho, Estefania, Ale, Eli, Carlos Chávez, Carlos (cotonete), Aldo, Deborah, Eliuh, Eleonor, Estrella, Fidel y Lucy por compartir experiencias en el camino.

# Índice general

<b>Índice general</b> .....	i
<b>Índice de figuras</b> .....	ii
<b>Índice de tablas</b> .....	iii
<b>Abreviaturas</b> .....	iii
<b>Resumen</b> .....	1
<b>1.- Introducción</b> .....	2
1.1.-Generalidades.....	2
1.1.1.- Epidemiología de la leishmaniasis.....	2
1.1.2.- Evolución del parásito.....	2
1.1.3.- Ciclo de vida del parásito.....	3
1.2.- Moléculas que participan en la infección de <i>Leishmania</i> .....	4
1.2.1.- Moléculas de superficie.....	4
1.3.- Moléculas de secreción.....	6
1.3.1.- Moléculas secretadas por <i>Leishmania</i> .....	6
1.3.2. Vías de secreción de <i>Leishmania</i> .....	8
1.3.2.1.- Vía de secreción clásica en <i>Leishmania</i> .....	8
1.3.2.2.- Vías alternas de secreción de <i>Leishmania</i> .....	9
1.4.- Proteínas fosfatasas de <i>Leishmania</i> .....	10
1.5.- Mecanismos de supervivencia de <i>Leishmania</i> .....	11
1.5.1.- Mecanismos de entrada.....	11
1.5.2.- Condiciones de la vacuola parasitófora.....	12
1.5.3.- Modulación de la célula hospedera por <i>Leishmania</i> .....	14
1.5.4.- Participación de fosfatasas en los mecanismos de infección de <i>Leishmania</i> .....	15
<b>2.-Justificación</b> .....	16
<b>3.- Objetivos</b> .....	17
3.1.- Objetivo general.....	17
3.2.- Objetivos particulares.....	17
<b>4.- Métodos</b> .....	18
4.1. Cultivo y aislamiento de los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	18
4.2.- Obtención de los sobrenadantes de los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	18
4.3.- Determinación de la actividad de fosfatasa ácida.....	19



4.4.- Prueba de viabilidad de los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	19
4.5.- Determinación de la actividad de PTP y PSP de los sobrenadantes de los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	19
4.6.- Efecto de compuestos químicos en la actividad de fosfatasa de los sobrenadantes...19	
4.7.- Análisis del perfil de electroforético de los sobrenadantes y detección de PTP y PP2C por ensayo de Western Blot.....	20
4.8.- Efecto de anticuerpos en la actividad de fosfatasa de los sobrenadantes.....	20
<b>5.- Resultados</b> .....	21
5.1.- Estandarización de cultivo axénico de amastigotes .....	21
5.2.- Secreción de fosfatasas por amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	22
5.3.- Viabilidad de los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	23
5.4.- Perfil de proteínas secretadas por los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	24
5.5.- Especificidad de sustrato de las fosfatasas secretadas por los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	25
5.6.- Efecto de los inhibidores de fosfatasas de PSP y PTP en la actividad enzimática secretada por los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	26
5.7.- Inmunodetección de una PTP secretada por los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	27
5.8.- Identificación de una PP2C secretada por los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	28
5.9.- Inhibición de la actividad de fosfatasa secretada por los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> utilizando anticuerpos anti PTP1B y anti PP2C.....	29
<b>6.- Discusión</b> .....	30
<b>7.- Conclusión</b> .....	33
<b>8.- Referencias</b> .....	34

## Índice de figuras

Figura A.- Ciclo de vida de <i>Leishmania spp</i> .....	4
Figura B.- Microvesículas secretadas por <i>L. donovani</i> .....	10
Figura C.- Interacción del amastigote con el hospedero en la vacuola parasitófora.....	13
Figura 1.- Crecimiento de los amastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	21

Figura 2.- Tiempo óptimo de la actividad de fosfatasa secretada por los amastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	22
Figura 3.- Viabilidad de los parásitos utilizados para secreción.....	23
Figura 4.- Perfil de proteínas de los sobrenadantes de amastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	24
Figura 5.- Análisis de la especificidad de sustrato de las fosfatasas secretadas por los amastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	25
Figura 6.- Efecto de los inhibidores de PTP y PSP en la actividad de fosfatasa de los secretada por <i>L. mexicana</i> .....	26
Figura 7.- Identificación de una PTP secretada por amastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	27
Figura 8.- Identificación de una PP2C secretada por amastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	28
Figura 9.- Inhibición de la actividad de fosfatasa secretada por amastigotes de <i>L. mexicana</i> utilizando anticuerpos.....	29

## Índice de tablas

Cuadro A. Especies del orden <i>Leishmania</i> y su fenotipo de enfermedad asociado.....	3
--	---

## Abreviaturas

AMP	adenosina de mono fosfato
AP-1	proteína activadora 1
ATPasa	fosforilasa de adenosina de trifosfato
C3	factor de complemento 3
C3a y C5a	factor de complemento fragmento 3a y 5a
CAM	control de amortiguador de muestra
CD4, 8 y 25	cúmulo de diferenciación 4, 8 y 25
CR1 y CR3	receptor de complemento 1 y 3
DC-SIGN	molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas

L-SIGN	molécula de adhesión intercelular específica de nódulo linfático e hígado
EF1- $\alpha$	factor de elongación 1 $\alpha$
ERK	cinasa regulada por señales extracelulares
FBS	suero fetal bovino
Fc	Fragmento constante
FCP	fosfatasa factor de transcripción II F- dominio que interactúa con el carboxilo terminal
FcR	receptor de fragmento constante
fPPG	proteofosfoglicano filamentoso
gp63	glicoproteína 63
GPI	glicofosfatidilserina
HO-1	hemo oxigenasa 1
IFN- $\gamma$	interferón gama
IgG	inmunoglobulina G
IL	interleucina
iNOS	sintetasa de óxido nítrico inducible
ITIMs	inmuno receptores basados en dominio de tirosina
JAK	cinasa de Janus
<i>L.spp</i>	<i>Leishmania spp</i>
LAMP-1	proteína asociada a la membrana lisosomal
LC	Leishmaniasis cutánea
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LM	Leishmaniasis mucocutánea
LmPTP1	proteína fosfatasa de tirosina 1 de <i>Leishmania mexicana</i>
Lmsap	gen de fosfatasa ácida secretada de <i>L. mexicana</i>
LPG	lipofosfoglicano
LPS	lipofosfatidilserina
LRR	repeticiones ricas en leucina
LV	Leishmaniasis visceral
MAPK	proteína cinasa activada por mitógenos
mg y $\mu$ g	microgramo y miligramo      respectivamente
MHCI y MHCII	complejo de histocompatibilidad I y II

ml y µl	microlitro y mililitro
µM	micromolar
mPPG	proteína fosfoglicano de membrana
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MYD88	gen de repuesta a la diferenciación mieloide primaria-88
N terminal y C-terminal	amino terminal y carboxilo terminal
NADPH oxidasa	oxidasa de nicotidamina adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	factor de necrosis kapa B
PKC	proteína cinasa C
p-NPP	paranitrofenilfosfato
PP1, PP2A y PP2B	proteína fosfatasa 1, 2A y 2B
PP2C	proteína fosfatasa 2C
PPM	fosfo proteína fosfatasa dependiente de Mg <sup>+</sup> /Mn <sup>+</sup>
PPP	fosfo proteína fosfatasa
PTP	proteína fosfatasa de tirosina
PTP	proteínas fosfatasas de tirosina
PTP1B	proteína fosfatasa de tirosina 1B
PTS1 y 2	secuencia señal que dirige al peroxisoma tipo 1 y 2
RE	retículo endoplásmico
ROS y NOS	especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico
SAP	fosfatasa ácida de secreción
SDM	medio <i>Schneider Drosophilla</i>
PSP	fosfatasas de serina/treonina
SHP-1	fosfatasa que contiene un dominio homólogo a Src2
SRC	Sarcoma
STAT	transductor de señal y activador de la transcripción
SYK	cinasa de tirosina de bazo
tbPTP1	proteína fosfatasa de tirosina 1 de <i>Trypanosoma brucei</i>
TGF-β	factor de crecimiento tumoral beta
TLR-2	receptor de tipo Toll-2
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
TRAF	familia del factor asociado al receptor de TNF
VP	vacuola parasitófora
XTT	prueba de tetrazolium

## Resumen

*Leishmania* es un parásito protozoario zoonótico, agente causal de un diverso conjunto de manifestaciones clínicas, como la leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. En México se presentan casos de leishmaniasis cutánea, provocada por la especie *Leishmania (L.) mexicana*. El ciclo de vida del parásito incluye una fase de promastigote presente en el vector artrópodo y el amastigote que se encuentra en el hospedero mamífero. El parásito cuenta con moléculas de superficie y secretadas que participan en los mecanismos de la evasión al hospedero. En la segunda categoría se conocen pocas moléculas reportadas como patogénicas en la fase de amastigote, la fase de mayor relevancia clínica. Las proteínas fosfatasas se han reportado como factores de virulencia en diversos organismos patogénicos, estas enzimas son capaces de inhibir vías de señalización celular asociadas a la respuesta inmune a patógenos.

Debido a lo anterior, en la presente tesis se identificaron y caracterizaron proteínas fosfatasas secretadas en la fase de amastigote de *L. mexicana*. Para ello se estandarizó el cultivo axénico de *L. mexicana*, de éste se tomaron 500 millones de parásitos, se lavaron y se incubaron a diversos tiempos (15 minutos, 1, 3 y 5 horas), en medio SDM fresco sin suero, libre de L-tyrosina y fosfatos. Se midió la actividad de fosfatasa y se detectó mayor actividad a 1 hora de secreción, en este tiempo de secreción la viabilidad de los parásitos fue del cien por ciento. Las fosfatasas presentes en el sobrenadante fueron capaces de defosforilar péptidos fosforilados en residuos de tirosina y en menor medida los péptidos fosforilados en treonina, se caracterizó la actividad enzimática con inhibidores específicos y se encontró que los inhibidores de PTP abatían la actividad de fosfatasa mientras que los inhibidores de PSP no tuvieron este efecto. Los sobrenadantes se precipitaron, se corrieron en geles de acrilamida, estos se tiñeron con plata o se utilizaron para inmunodetección con anticuerpos monoclonales anti PTP1B y policlonales anti PP2C. En los geles teñidos con plata se identificaron una serie de proteínas, mientras que en los Blots para PP2C y PTP se identificaron proteínas de 42 kDa y 50 kDa, respectivamente. Para corroborar la presencia de una PTP secretada, se incubó el sobrenadante con anticuerpos dirigidos contra el sitio catalítico de una PTP1B de placenta humana y se observó que hubo una reducción de la actividad catalítica. De lo anterior, llegamos a la conclusión de que los amastigotes de *L. mexicana* secretan una PTP y una PP2C al medio de cultivo.

## 1.- Introducción

### 1.1.- Generalidades

#### 1.1.1.- Epidemiología de la leishmaniasis

El estudio de la leishmaniasis comienza con la descripción del agente etiológico, llevado a cabo por Leishman y Donovan en 1903, los cuales por separado aislaron el parásito del bazo de pacientes de la India (Herwaldt, 1999). El parásito *Leishmania spp.* es un protozooario patógeno, agente etiológico de un conjunto de manifestaciones clínicas, entre ellas la leishmaniasis visceral (LV), cutánea (LC) y mucocutánea (LM). La leishmaniasis cutánea se presenta en forma localizada (LCL) y difusa (LCD). La primera se presenta en forma de úlceras redondeadas, con bordes indurados que generalmente curan de forma espontánea. La forma difusa se vuelve crónica y hay una falta de respuesta celular eficiente contra el parásito (Reithinger, 2007).

En un reporte de 2007, la Organización Mundial de la Salud reconoce que la leishmaniasis es una de las enfermedades tropicales más descuidadas (OMS, 2007). Actualmente, más de 20 millones de personas están infectadas en el mundo. Se presentan dos millones de casos nuevos cada año y 350 millones de personas se encuentran en riesgo. Esta enfermedad afecta la población más pobre en 88 países en desarrollo (OMS, 2007).

#### 1.1.2.- Evolución del parásito

Existen más de 20 especies de *Leishmania*. El género *Leishmania spp.* pertenece al orden kinetoplastidae, las especies que infectan a mamíferos pueden ser divididas en dos subgéneros (*Leishmania Leishmania* y *Leishmania Viannia*) (Killick, 1990). El tipo de manifestación clínica depende de la especie de *Leishmania* que infecta y del estatus inmunológico del hospedero. En el viejo mundo *Leishmania (L.) donovani* es la principal causante de leishmaniasis visceral, mientras que *L. major* es la causa principal de leishmaniasis cutánea. En América *L. mexicana* es la principal causante de LCD y *L. amazonensis* para LM (Sacks, 2001). Cada una de estas especies a pesar de compartir la mayor parte del genoma y un origen común, han divergido el tiempo suficiente (se ha calculado que *L. infantum* y *L. brazilliensis* han estado separados de 15-50 millones de

años de evolución) para adquirir mecanismos únicos y distintivos para cada especie y esto podría explicar en parte el hecho de que cada especie se asocia a una manifestación clínica en particular (Lukes, 2007). Es muy importante resaltar este punto, puesto que en las revisiones acerca de los mecanismos de infección que utiliza *Leishmania* para infectar a sus hospederos, suelen mencionarse una multitud de procesos identificados, que dan la apariencia de aplicarse para todas las especies de *Leishmania* en común, lo cual está muy lejos de lo que sucede realmente (Olivier, 2005).

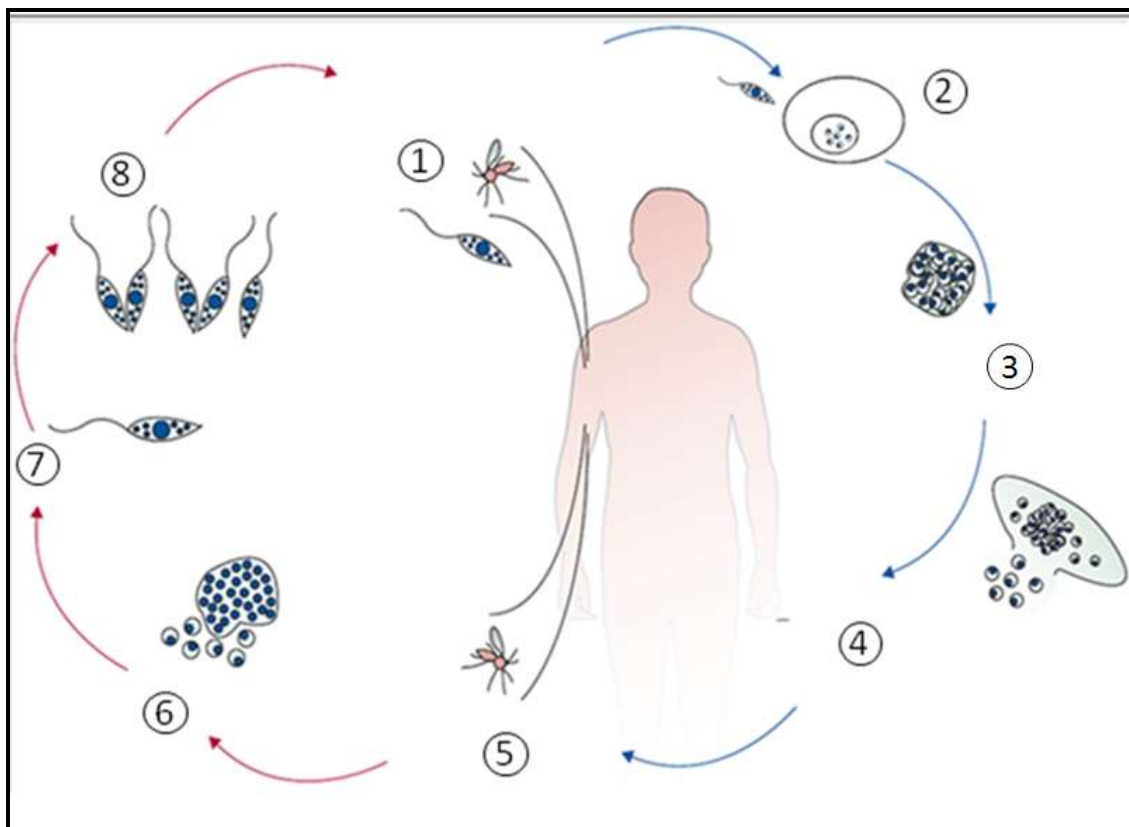
#### **Cuadro A. Especies del género *Leishmania* y su fenotipo de enfermedad asociado**

(modificado de Lynn y McMaster, 2008).

Especie de <i>Leishmania</i>	Ubicación	Fenotipo de la enfermedad
<i>L. major</i>	Viejo Mundo	Leishmaniasis cutánea
<i>L. tropica</i>	Viejo Mundo	Leishmaniasis cutánea
<i>L. donovani</i>	Viejo Mundo	Leishmaniasis visceral
<i>L. infantum</i>	Viejo Mundo	Leishmaniasis visceral
<i>L. braziliensis</i>	Nuevo Mundo	Leishmaniasis mucocutánea
<i>L. panamensis</i>	Nuevo Mundo	Leishmaniasis mucocutánea
<i>L. mexicana</i>	Nuevo Mundo	Leishmaniasis cutánea
<i>L. amazonensis</i>	Nuevo Mundo	Leishmaniasis mucocutánea

#### **1.1.3.- Ciclo de vida del parásito**

El ciclo de vida de *Leishmania spp.* incluye la existencia del parásito en un vector artrópodo (*Lutzomia* y *Phlebotomus*, en América y el viejo mundo respectivamente), dentro del cual el parásito pasa por una serie de transformaciones, de la forma promastigote nectomónade el parásito se transforma al estadio haptomónade, después al estadio leptomónade, luego a promastigote procíclico y por último promastigote metacíclico, en esta última fase el parásito migra a la proboscis del mosquito (Killick, 1979). La transmisión al hospedero mamífero ocurre cuando el mosquito se alimenta de éste y regurgita promastigotes metacíclicos. En el hospedero mamífero el parásito se transforma en la fase de amastigote (Sacks, 2001).



**Figura A.- Ciclo de vida de *Leishmania spp.*** 1. Transmisión de promastigotes metacíclicos a través de la picadura del mosquito. 2. Transformación en amastigotes y fagocitosis por macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. 3. Reproducción de los amastigotes en la vacuola parasitófora. 4. Liberación del parásito por la lisis de la célula hospedera e infección de otras. 5. Ingestión de células infectadas por el mosquito al alimentarse de sangre. 6. Liberación de los parásitos en el intestino del mosquito. 7. Transformación de los amastigotes en promastigotes. 8. Los promastigotes pasan a través de varios estadios hasta convertirse en promastigotes metacíclicos durante la cual ocurre la transmisión al hospedero mamífero cerrándose el ciclo. Figura tomada de Reithinger et al, 2007.

## 1.2.- Moléculas que participan en la infección de *Leishmania*

### 1.2.1.- Moléculas de superficie

Para abordar el estudio de la interacción del parásito con la célula hospedera se han encontrado y caracterizado moléculas involucradas en los procesos de supervivencia e infección del parásito. Estas proteínas pueden ser de membrana o de secreción. En



cuanto a las moléculas de membrana, *Leishmania* cuenta con una superficie protectora conocida como glicocalix, compuesta principalmente de proteínas ancladas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), lipofosfoglicanos (LPG) y glicosilfosfolípidos (Olivier, 2005). La proteína más abundante en la superficie de promastigotes de *Leishmania* es la gp63, la cual es una metaloproteinasa de zinc, la cual es activa en un rango de pH de 7-10 y tiene una actividad proteolítica específica en un amplio rango de sustratos entre los cuales se encuentra la caseína, el fibrinógeno, gelatina y la albúmina (McMaster, 1994). Cada parásito presenta alrededor de  $5 \times 10^5$  moléculas (Ellis, 2002), la abundancia de esta proteína se reduce radicalmente (10 veces) en amastigotes (Medina, 1989). La reducción de la cantidad de gp63 presente en la fase de amastigote podría estar balanceada por la exposición de moléculas antes embebidas en el glicocálix de LPG que se pierden en la fase de amastigotes (Olivier, 2005). Se cree que en esta fase intracelular la actividad de la gp63 podría participar en la ruptura de macromoléculas del hospedero, en la protección y en la provisión de nutrientes al parásito. Esta proteína es capaz de unirse con el receptor de complemento 3 (CR3) presente en la superficie de fagocitos y de esta forma podría contribuir al anclaje del parásito a macrófagos u otras células (Brittingham, 1995).

El glicolípido lipofosfoglicano (LPG) es el principal glicoconjugado de superficie de *Leishmania* y también es secretado activamente al sobrenadante de cultivo (Valerie, 1992). Este glicolípido está organizado en cuatro dominios: un conservado 1-O-alkil-2-liso-fosfatidil (mio) inositol de anclaje a membrana, un núcleo de estructura de difosfoheptasacárido, unidades repetidas de fosfodisacáridos, las cuales contienen variaciones especie específicas en las cadenas laterales (Ilg, 2000). La expresión de LPG disminuye en la etapa de amastigotes en al menos mil veces (Valerie, 1992). En promastigotes de *L. mexicana* hay aproximadamente  $1.3-2.0 \times 10^6$  moléculas de LPG por parásito (McMaster, 1997). En amastigotes, el LPG producido es principalmente soluble y se localiza en la bolsa flagelar para su secreción (Bahr, 1993). El LPG ha sido involucrado en la resistencia de los promastigotes al ataque por complemento, en el anclaje y la fagocitosis de los promastigotes por el macrófago, en la protección del parásito contra las hidrolasas del fagolisosoma, en la reducción de la producción de citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , así como la inhibición de señales intracelulares como la vía de la PKC, inhibición de la fusión del fagolisosoma y la producción de estallido oxidativo entre otros (Ilg, 1992). Sin embargo, en un estudio realizado por Ilg y

colaboradores en el 2000 se demuestra que a pesar de que es una molécula importante para la sobrevivencia del parásito, su falta no afecta la capacidad infectiva del parásito.

El fosfolípido glicosilinositol (GIPL) es una molécula de superficie de *Leishmania* anclado por GPI, esta molécula es diez veces más abundante que el LPG, su tamaño reducido le hace estar más cerca a la superficie membranal, a diferencia del LPG que es constantemente rasurado de la membrana, el GIPL es una molécula de vida media larga y por esto se cree que tiene un papel en la protección del parásito, sin embargo, esto no está claro ya que su falta no afecta la infección del parásito *in vivo* (Garami, 2001).

*Leishmania* expresa un proteoglicano de tipo proteofosfoglicano en su superficie, denominado PPG de membrana (mPPG), esta proteína está anclada por GPI en su extremo C-terminal, contiene dominios homólogos a repeticiones ricas en leucina (LRR), dominio encontrado en proteínas transductoras de señales intracelulares (Ilg, 1999), debido a su extensa glicosilación con largas cadenas de fosfoglicanos tipo LPG, la cual se extiende miles de nanómetros de la membrana plasmática, se especula que esta molécula podría constituir un excelente ligando para el anclaje al hospedero artrópodo y mamífero (Ilg, 1999). Una sola molécula de mPPG cuenta con más de 800 residuos de serina agrupados y unidos a fosfoglicanos en comparación con LPG que sólo contiene un sitio de glicosilación (Ilg, 2000).

### **1.3.- Moléculas de secreción**

#### **1.3.1.- Moléculas secretadas por *Leishmania***

Los promastigotes metacíclicos de *L. donovani* secretan aproximadamente 150 proteínas (Silverman, 2008). Dichas proteínas secretadas podrían tener distintos efectos en la supervivencia del parásito, entre las proteínas identificadas se encuentran: a) proteínas con efecto inmunomodulatorio: b) proteínas involucradas en la supervivencia intracelular del parásito y c) proteínas que participan en transducción de señales. Entre las proteínas reportadas se encuentran proteasas, oxidoreductasas, nucleasas, al menos 10 proteínas involucradas en transducción de señales (MapK, proteínas fosfatasa de tirosina (PTP), de unión a fosfoinositol, entre otras) y que participan en la síntesis de proteínas del parásito (Silverman, 2008).

Todos los promastigotes de *Leishmania spp.* secretan al medio fosfatasa ácida (SAPs) excepto *L. major* (Ilg, 2000). Las SAPs poseen actividad inespecífica y pueden

defosforilar un amplio rango de sustratos como fructosa 1, 6-fosfato, AMP, O-fosfo-DL-tirosina, entre otros. En *L. donovani* se ha demostrado que estas SAPs son capaces de inhibir el estallido oxidativo en neutrófilos (Remaley, 1985). Los amastigotes (incluyendo amastigotes cultivados de forma axénica) de *L. donovani* son capaces de secretar SAPs (Doyle, 1991; Debrabant, 2003). Los promastigotes de *L. mexicana* secretan dos tipos de SAPs que no poseen actividad catalítica: mayoritariamente SAP2 codificada por el gen *Lmsap2* y SAP1, codificado por *Lmsap1*, estas proteínas maduras pesan 200 kDa y 100 kDa respectivamente (Wiese, 1995; Ilg, 2000), estas proteínas pueden formar largos polímeros, una característica muy inusual en fosfatasas ácidas. Estos polímeros se hallan formados por subunidades de SAP1 y SAP2 intercaladas y llegan a tener más de 200 de estas subunidades y un tamaño de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , donde el extremo N-terminal es la parte enzimáticamente activa, los extremos C-terminales son visibles al microscopio electrónico y le dan una apariencia de milípedo (Ilg, 1991). A diferencia de *L. donovani* que secreta SAPs con capacidad de oligomerizar limitada, con pesos de 110 y 130 kDa en promastigotes y de peso heterodisperso entre 130-250 kDa en amastigotes (Debrabant, 2003). Se ha propuesto que las SAPs podrían tener una función nutricional en el tracto digestivo del insecto vector (Walters, 1989).

Los promastigotes de *Leishmania* secretan una proteína filamentosa llamada proteofosfoglicano filamentoso (fPPG). Esta proteína se haya glicosilada en un 84-90% en residuos de serina, esta magnitud de glicosilación le confiere resistencia a proteinasas, tiene una enorme masa molecular, con alta carga negativa, posee regiones análogas a las mucinas de mamíferos, es viscosa y tiene la capacidad de formar geles (Ilg, 1996). Se ha propuesto que este gel mejora la eficiencia de la transmisión del parásito, bloqueando la válvula estomoidea del vector durante la picadura provocando el reflujo y la deposición del parásito en el mamífero (Walters, 1989).

Los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* secretan proteofosfoglicanos que no contienen ninguna actividad catalítica conocida (Bahr, 1993; Stierhof, 1994; Ilg, 1995; Wiese, 1995). Los amastigotes de *L. mexicana* secretan una molécula llamada PPG de amastigotes (aPPG), la cual contiene todas las modificaciones glicosídicas encontradas en PPGs y SAPs de promastigotes además de glicosilaciones jamás reportadas (Ilg, 2000). En amastigotes axénicos no se ha podido identificar la secreción de aPPG, de modo, que un estímulo del macrófago parece ser esencial para su expresión (Ilg, 1998; Ilg, 2000). Debido a que se expresa en la fase presente en el mamífero se ha propuesto y

demostrado la implicación en la infección del hospedero mamífero. Esta molécula se puede detectar en grandes concentraciones en la lesión ( $40-100 \mu\text{g g}^{-1}$ ) de ratones y en vacuolas parasitóforas (Ilg, 1995; Aebischer, 1999), por su alta glicosilación aPPG no puede ser presentada por el complejo de histocompatibilidad II (MHCII) (Overath, 1999; Aebischer, 1999) y como es conocido para compuesto polianiónicos se ha demostrado que induce vacuolización en macrófagos (Peters, 1997), lo que podría explicar la formación de grandes vacuolas en macrófagos infectados por *L. mexicana* (Ilg, 2000). El aPPG es capaz de unirse a lectinas de unión a manosas y activar el complemento por la ruta alterna lejos de la superficie del parásito, lo cual explicaría que no se encuentre el factor de complemento C3 en la superficie de amastigotes de *L. mexicana* aislados de lesión (Peters, 1997). Además esto podría favorecer la producción de anafilotoxinas C3a y C5a potentes reclutadoras de monocitos circulantes y favorecer la dispersión del parásito (Ilg, 2000).

### **1.3.2.- Vías de secreción de Leishmania**

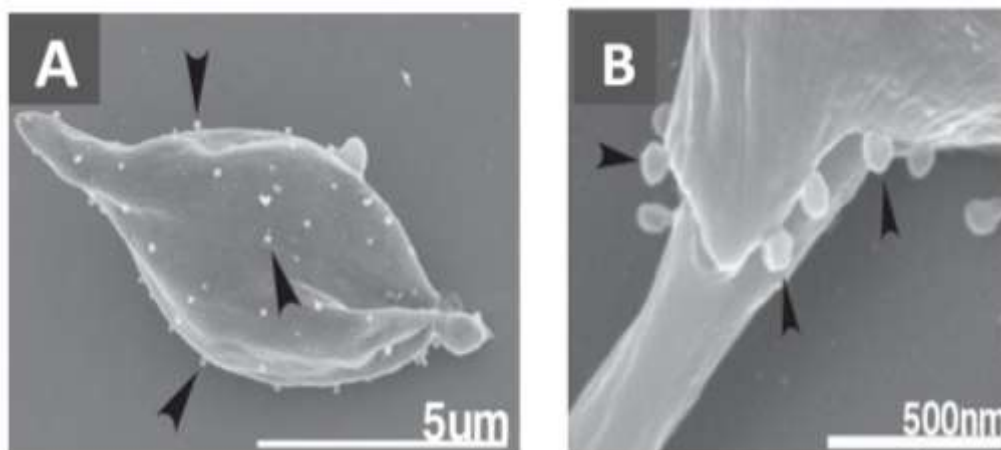
#### **1.3.2.1.- Vía de secreción clásica en *Leishmania***

El parásito *Leishmania* tiene la ruta de secreción eucariótica clásica y cuenta con una serie de organelos característicos involucrados en el tráfico de proteínas secretadas y endocitadas (McConville, 2002). La ruta de secreción de proteínas comienza con la síntesis y translocación de proteínas al retículo endoplásmico (RE) cercanamente asociado a la membrana nuclear. En el RE la mayoría de las proteínas de la ruta secretora se modifican con N-glicanos. Como en los demás eucariontes, estos oligosacáridos son ensamblados en bloques a las proteínas nuevas sintetizadas en el lumen del RE, los pasos de la biosíntesis de estos oligosacáridos son iguales en los demás eucariontes (Parodi, 1993). Los trypanosomátidos utilizan dolicoles que son más cortos en comparación con los que se encuentran en células animales (Low, 1991). Además los trypanosomátidos sólo transfieren a las proteínas recién sintetizadas oligosacáridos truncados de tipo  $\text{MAN}_{6-7}\text{GLcNAc}_2$  a diferencia del resto de los eucariontes que transfieren oligosacáridos terminados con residuos de glucosa (Parodi, 1993), las proteínas son exportadas al aparato de Golgi a través de transporte vesicular. En el aparato de Golgi se procesan sólo pocas modificaciones en las proteínas procesadas con N-glicanos (Parodi, 1993). Las proteínas necesitan una secuencia señal

de secreción clásica o un tipo de glicosilación no determinado aún para ser dirigidas al bolsillo flagelar y secretadas (Emanuelsson, 2007; Ellis, 2002). En el genoma de *Leishmania* se hayan por lo menos 50 genes con secuencia señal de secreción de la ruta clásica (Silverman, 2008).

### **1.3.2.2.- Vías alternas de secreción de *Leishmania***

El 98% de las proteínas identificadas en el secretoma de *L. donovani* no contienen la secuencia señal de la vía clásica de secreción, lo que hace suponer que la mayor parte de las proteínas secretadas por *Leishmania* utilizan una ruta no clásica de secreción (Silverman, 2008). Tres procesos de secreción vesicular son candidatos al aporte del secretoma de *Leishmania*: exosomas, vesículas apoptóticas y glicosomas (Silverman, 2008). Los exosomas son vesículas pequeñas, de 50 a 100 nanómetros de diámetro, que son liberados por la fusión de endosomas multivesiculares o lisosomas de secreción con la membrana plasmática eucariótica (Fevrier, 2004). El parásito secreta microvesículas que contienen una carga proteómica parecida a microvesículas de tipo exosoma/adiposoma del hospedero (las microvesículas de *L. donovani* y de células adipocíticas de mamíferos comparten más del 10% de proteínas) (Aoki, 2007). Las vesículas apoptóticas han sido descritas en las membranas plasmáticas de células apoptóticas de mamíferos y se ha encontrado que éstas contienen proteínas como histonas y subunidades de oxidasas de citocromo c. Los glicosomas son organelos exclusivos de trypanosomátidos relacionados a los peroxisomas, especializados en la generación de energía por la vía glicolítica, varias proteínas que contienen la secuencia señal que dirige al peroxisoma tipo 1 y 2 (PTS1 y PTS2) han sido encontradas en el secretoma de *L. donovani* y han sido encontradas en los glicosomas aislados de otros trypanosomátidos (Parson, 2004; Silverman, 2008).



**Figura B.- (A) Microvesículas secretadas por amastigotes axénicos de *L. donovani* presentes. (B) Vista de la base del flagelo y bolsa flagelar de un promastigote de *L. donovani*. Tomado de Silverman et al, 2008.**

#### **1.4.-Proteínas fosfatasas de *Leishmania***

Los genomas de eucariontes presentan tres familias distintas de genes que codifican para fosfatasas dentro de las cuales se presentan: 1) la familia de las fosfoproteínas fosfatasas (PPP), dentro de la cual se encuentran las subfamilias PP1, PP2A y PP2B. 2) Las proteínas fosfatasas monoméricas (PPM) que cuentan con un sólo representante, la PP2C, y 3) las proteínas fosfatasas de tirosina (PTP), que pueden subdividirse en PTP convencionales (entra las cuales se encuentran las fosfatasas duales) y PTP de bajo peso molecular (LMW PTP). Las fosfatasas son un grupo de enzimas que catalizan la remoción de grupos fosfatos de residuos de aminoácidos específicos, esta reacción es conocida como defosforilación. Las PPP y PPM tienen como sustrato residuos de serina y/o treonina, y por lo tanto pueden ser clasificadas por el sustrato que modifican en proteínas fosfatasas de serina/treonina (PSP), mientras que las PTP son capaces de defosforilar residuos de tirosinas, aunque dentro de esta familia existe una subfamilia de PTP llamadas duales que son capaces de defosforilar residuos de serina y treonina (Barford, 1998). *L. major* cuenta con 83 genes de fosfatasas, de éstos 4 % son PTP (3 genes), 69 % son PSP (58 genes) y el 26 % de genes restantes son fosfatasas duales (22 genes) (Brenchley, 2007).

La defosforilación de proteínas es un proceso muy importante en la regulación de los procesos celulares de trypanosomas y muestra diferencias muy marcadas en su ciclo de vida (Brenchley, 2007). En otros parásitos del orden Trypanosomatidae, como

*Trypanosoma brucei*, se ha identificado que la fosfatasa de tirosina tbPTP1 es un gen maestro que controla la diferenciación a la fase procíclica de este parásito (Szoor, 2006). Las PTP se encuentran involucradas en el proceso de diferenciación de *Leishmania* a la fase de amastigote, ya que la expresión heteróloga de la proteína fosfatasa de tirosina 1B (PTP1B) en promastigotes aumenta la expresión de A2, una proteína específica de amastigotes y aumenta la virulencia de los promastigotes tranfectados *in vitro* y la inhibición de cinasas de tirosina promueve el desarrollo de caracteres de la fase de amastigote (Nascimento, 2003). En *L. major* se ha encontrado que LmPTP1 permite la sobrevivencia de los amastigotes *in vivo* y se postula como un factor de virulencia del parásito (Nascimento, 2006). En *L. major* se ha clonado y caracterizado una proteína fosfatasa 2C, la cual se ha localizado en el bolsillo flagelar de promastigotes procíclicos lo que podría indicar que se está secretando. *L. major* también presenta PTPs de membrana que se sobreexpresan en la etapa infectiva de promastigotes metacíclicos (Escalona, 2007; Aguirre, 2006). En promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* se ha reportado que al inhibir las fosfatasas de tirosina del parásito e infectar macrófagos con estos hay una reducción de la carga parasitaria, además se ha encontrado que promastigotes metacíclicos de esta misma cepa secretan una PTP al medio de cultivo (Gómez, 2007; Escalona, 2010).

## **1.5.- Mecanismos de supervivencia de *Leishmania***

### **1.5.1.- Mecanismos de entrada**

Se ha reportado que la interacción de *Leishmania spp.* con células del sistema inmune puede llevarse a cabo por la unión de: 1) moléculas de LPG de superficie del parásito a receptores de tipo Toll (TLR) (Becker, 2003), 2) por la unión de receptores Fc del macrófago a anticuerpos que opsonizan al parásito (Mosser, 1993), y 3) por la unión de moléculas de superficie del parásito a receptores de complemento como CR1 y CR3 (Brittingham, 1995; Kane, 2000). El parásito puede activar al macrófago por medio de diversas rutas de señalización de acuerdo al receptor estimulado. La unión de LPG a TLR-2 puede inducir la producción de citocinas por la vía de MyD88 (Becker, 2003; Gazzinelly, 2006). La activación del macrófago por el parásito asegura una entrada rápida al interior de esta célula mediante la fagocitosis, para evitar otros mecanismos de ataque del sistema inmune como la lisis mediada por complemento (Olivier, 2005). Otra

molécula implicada en la internalización del parásito es la fosfatidilserina, la cual también modula la producción de citocinas como IL-10 y TGF- $\beta$  (Wanderley, 2006). Otra forma de internalización descrita para *L. major* es aquella dependiente de caveolina que involucra la participación de balsas lipídicas (lipid rafts) (Rodríguez, 2006). En células dendríticas se han identificado a lectinas de tipo C como posibles receptores para *L. pifanoi* y *L. infantum*, entre estas lectinas se encuentran DC-SIGN y L-SIGN (Colmenares, 2002). La entrada de los amastigotes a las células dendríticas a través de estos receptores no induce maduración de la célula y puede ser considerada una entrada silenciosa (Bennett, 2001).

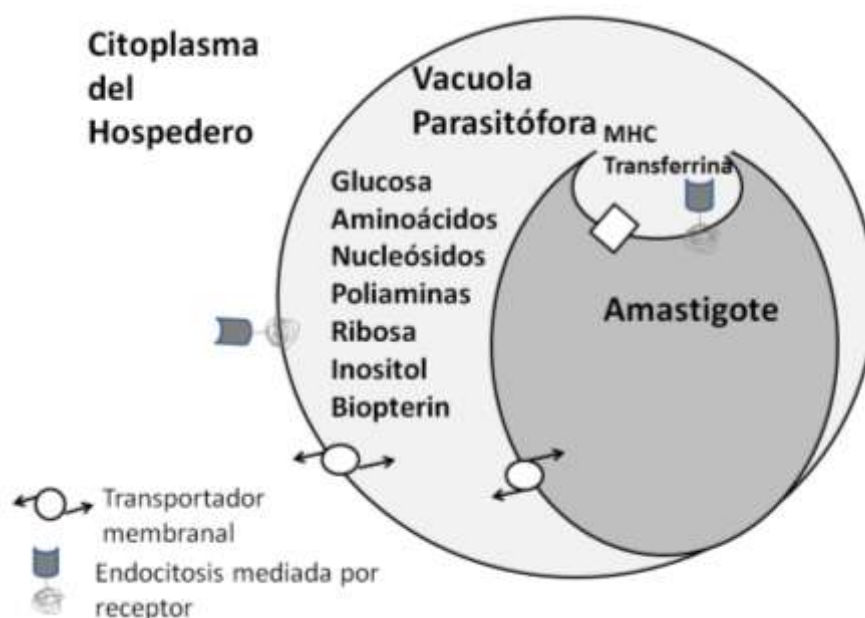
### **1.5.2.- Condiciones de la vacuola parasitófora**

Durante la transición promastigote-amastigote, los parásitos son sujetos de un cambio drástico de condiciones, las cuales incluyen escasez de nutrientes, cambio de pH, cambio de temperatura, exposición a especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (NOS), así como un ambiente proteolítico extracelular (Burchmore, 2001). Muchos de estos eventos disparan un cambio en la regulación del genoma responsable del cambio morfológico y bioquímico entre estos estadios (Besteiro, 2007). El promastigote fagocitado se transforma en amastigote y reside en fagolisosomas, llamados vacuolas parasitóforas (VP). Este compartimento es muy ácido, hidrolítico y contiene muchas proteasas, sin embargo, el parásito no parece alterar estas condiciones, por el contrario muchas proteínas de su superficie tienen una actividad óptima a un pH ácido (Burchmore, 2001). El citoplasma del parásito se mantiene sin embargo a un pH cercano a la neutralidad y este proceso de homeostasis interna parece ser dependiente de ATPasas (Glasser, 1988). Por otro lado, el glicocálix del parásito puede servir de amortiguador en el ambiente ácido (Kovbasnjuk, 2000).

La especie *L. mexicana* y otras subespecies del complejo *mexicana* parecen inducir VPs grandes y por ello, este aspecto se ha estudiado preferentemente en estas especies. Las vacuolas hidrolíticas participan en procesos de degradación y reciclaje de componentes celulares como ácidos ribonucleicos (RNAs) y proteínas caducas. Las VP parecen tener esta misma composición (Prina, 2001). *Leishmania* debe obtener los nutrientes que necesita para sobrevivir dentro de la vacuola parasitófora. La obtención de los nutrientes se lleva a cabo de dos maneras: 1) por el transporte de moléculas pequeñas como aminoácidos, azúcares, nucleótidos y lípidos a través de una serie de



transportadores del parásito que deben competir con los transportadores propios de la VP, y 2) por la fagocitosis de proteínas de gran peso molecular como MHCII (complejo de histocompatibilidad tipo II) y transferrina como se muestra en la figura C (Burchmore, 2001; De Souza, 1995).



**Figura C.- Interacción del amastigote con el hospedero en la vacuola parasitófora.** El parásito además de evadir la respuesta del macrófago debe acceder a nutrientes esenciales en la VP (figura modificada de Burchmore, 2001).

### 1.5.3.- Modulación de la célula hospedera por *Leishmania*

Entre los mecanismos reportados que *Leishmania spp.* utiliza para sobrevivir dentro del macrófago se encuentra la inhibición de la fusión del fagolisosoma con vacuolas y lisosomas, la inhibición del estallido oxidativo y de la producción de iNOS, la inducción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ , la reducción de expresión de señales coestimuladoras y la inhibición parcial de mecanismos de presentación de antígenos (Bogdan, 1999).

Se han realizado estudios de expresión genómica con microarreglos que demuestran que en macrófagos infectados por *Leishmania* está alterada la expresión de alrededor de 37% de genes responsables de la activación del macrófago (Buates, 2001). Detrás de estos mecanismos se encuentra la modulación de diversas vías de transducción de señales por el parásito. Durante la infección de *L. amazonensis* se reducen los niveles de

fosforilación de diversas proteínas y se induce la fosforilación en otras (Martiny, 1996; Martiny, 2006). En *L. major* y *L. donovani* la defosforilación extensiva de tirosina se debe en parte a la activación de SHP-1 (fosfatasa de tirosina que contiene el dominio Src homólogo 2) (Forget, 2001).

La vía de transducción de señales de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) es importante en respuestas de estrés celular, en apoptosis, sobrevivencia y diferenciación, entre otros procesos en células infectadas (Kima, 2007). En macrófagos obtenidos de médula ósea hay una activación de las MAPKs ERK1 y ERK2, además esta activación es necesaria para la producción de IL-10 (Yang, 2007). En macrófagos peritoneales infectados con *L. amazonensis* existe una reducción en la fosforilación de ERK1, mientras que en la infección de estas células con *L. mexicana* esta reducción se debe, al menos parcialmente, a la acción de proteasas de cisteína del parásito (Martiny, 1999; Cameron, 2004).

*Leishmania* inhibe el ensamble del complejo enzimático de la NADPH oxidasa, en *L. donovani* la inhibición de la producción de ROS se debe en parte a la defosforilación de la subunidad p47 del complejo de la NADPH oxidasa, debido a la inactivación de PKC, ya que la activación de PKC es necesaria para la fosforilación de p47 (Turco, 1999; Fontayne, 2002). La expresión de fosfatidilserina en la superficie del parásito parece inhibir la producción de NOS a través de la inducción de TGF- $\beta$  e IL-10 (Wanderley, 2006). *L. mexicana* reduce la producción de IL-12 mediante la degradación de subunidades del factor nuclear potenciador de la cadena  $\kappa$  de células B (NF- $\kappa$ B) por peptidasas de cisteína del parásito (Cameron, 2004).

Es probable que algunas moléculas producidas por el amastigote puedan atravesar la membrana de la vacuola parasitófora y alcanzar el citosol del hospedero, lo que produce la modulación de las vías mencionadas. Una molécula que puede realizar este proceso es el factor de elongación  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ), la cual se une y activa a la PTP que contiene un dominio homólogo a Src 2 (SHP-1) que a su vez defosforila la cinasa JAK2 (cinasa de Janus 2) (Kima, 2005 y 2007; Nandan, 2005). Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos por el cual el parásito modula a la célula hospedera es hasta el momento incompleto.

#### **1.5.4.- Participación de las proteínas fosfatasa en los mecanismos de infección de *Leishmania***

En 1980, Olivier y colaboradores demostraron que la inhibición de las PTP del macrófago restablece el estallido oxidativo, la producción de óxido nítrico y esto permite la resolución de la infección de macrófagos infectados por promastigotes de *L. donovani*, lo que demuestra que PTP están involucradas en el proceso de infección del parásito. Como se mencionó anteriormente, *Leishmania* secreta la proteína EF-1 $\alpha$  durante su residencia en fagolisosomas, EF-1 $\alpha$  se exporta al citosol y es capaz de inducir a la PTP SHP-1. La inducción se lleva a cabo por la probable unión de EF-1 $\alpha$  al dominio SH2 presente en SHP-1, además la expresión exógena de este factor de elongación en macrófagos activados es capaz de inhibir la producción de NOS estimulada con IFN- $\gamma$  (Devki, 2002). La PTP SHP-1 tiene una función relevante en la vía de señalización por inmuno receptores basados en dominio de tirosina (ITIMs). Los dominios ITIMs después de la unión del ligando a receptores Fc son fosforilados por proteínas de las familias SRC (quinasas de Sarcoma) y SYK (quinasas de tirosina de bazo), creando sitios de unión para el dominio SH2 de la PTP SHP-1 (Mustelin, 2004), de este modo las SHP-1 inactivan al macrófago e inhiben la fagocitosis. La PTP SHP-1 también es capaz de regular negativamente la vía de receptores de citocinas JAK/STAT (quinasas de janus/transductores de señales y activadores de transcripción), la vía de MAPK por inhibición de ERK1 y 2, además de inhibir factores transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1. (Forget, 2006). En resumen, la inducción de la PTP SHP-1 por *Leishmania* provoca la inhibición de los mecanismos microbicidas del macrófago (Olivier, 2005).

## 2.-Justificación

La leishmaniasis es una enfermedad que se distribuye a lo largo de todas las regiones tropicales del planeta, incluyendo México. En nuestro país se considera un problema de salud pública ya que hay reportados 400 nuevos casos anualmente. El conocimiento de los procesos moleculares de la interacción del parásito con la célula hospedera es escaso. Se sabe que *Leishmania* interactúa con la célula hospedera a través de moléculas de superficie y de secreción. Dentro de las primeras se conocen moléculas como la proteína gp63 y los fosfolípidos GILP, LPG y PS, las cuales se ha visto que participan en los mecanismos de infección a la célula hospedera por el parásito. En los últimos años ha cobrado relevancia el estudio de las moléculas secretadas por el parásito, tomando en cuenta que aunque el parásito restringe su localización dentro de la VP del macrófago, los efectos moduladores de *Leishmania* se presentan en toda la célula, por lo tanto, las moléculas de secreción se convierten en las principales candidatas a ejercer esta modulación de las vías de señalización celular del fagocito, ya que se ha visto que algunas de éstas atraviesan la membrana de la VP, alcanzan el citoplasma celular y ejercen efectos inhibitorios de los mecanismos leishmanicidas.

El amastigote es la fase que reside de forma intracelular en las células fagocíticas del hospedero mamífero y por lo tanto, es la fase de mayor importancia clínica, sin embargo, la mayor parte de los estudios de caracterización bioquímica de *Leishmania* son reportes realizados en promastigotes, esto en parte se debe a que esta fase del parásito es más fácil de cultivar (Gupta, 2001; Hernández, 2007). Las proteínas fosfatasas de tirosina del macrófago pueden participar en la infección por *Leishmania* regulando negativamente la activación del macrófago (Olivier, 1980). En antecedentes de nuestro laboratorio se ha demostrado que PTPs que pertenecen al parásito pueden estar involucradas en la infección de los macrófagos por promastigotes de *L. mexicana* y que promastigotes metacíclicos de esta especie secretan una PTP al medio de cultivo (Gómez, 2007; Pardavé, 2008). También hemos demostrado que una PP2C se localiza en el bolsillo flagelar de promastigotes metacíclicos de *L. major* probablemente para ser secretada (Escalona, 2007). Por lo anterior, el objetivo de este estudio es evaluar si los amastigotes de *L. mexicana* secretan PTP y/o PSPs al medio de cultivo.

### **3.- Objetivos**

#### **3.1.- Objetivo general**

- Identificar y caracterizar proteínas fosfatasas secretadas por amastigotes de *Leishmania mexicana*.

#### **3.2.- Objetivos particulares**

- Estandarizar el cultivo axénico de amastigotes de *L. mexicana*.
- Establecer el tiempo óptimo de secreción de las proteínas fosfatasas de los amastigotes de *L. mexicana*.
- Analizar el perfil de proteínas secretadas por los amastigotes de *L. mexicana*.
- Caracterizar las PTP y PSP secretadas por los amastigotes de *L. mexicana* mediante sustratos e inhibidores específicos.
- Identificar las PTPasas y PSPs secretadas por los amastigotes de *L. mexicana* utilizando anticuerpos específicos.

## 4.- Métodos

### 4.1.- Cultivo y aislamiento de los amastigotes de *Leishmania mexicana*

El cultivo de los amastigotes se obtuvo a partir de ratones infectados con la cepa MHOM/MX/92/UADY68 de *L. mexicana* aislada de un paciente con leishmaniasis localizada. Después de sacrificar el ratón, se cortó la pata (la parte inoculada), se dejó en alcohol al 90%, se hicieron macerados y esto se filtró por tres distintos calibres de aguja (21G, 23G y 25G). El filtrado se dejó en hielo durante 60 minutos, después se centrifugó a 350× g durante 10 minutos para limpiar restos celulares de tejido, se tomó el sobrenadante, se resuspendió en 10 mL de medio, luego se centrifugó a 2000× g y se separó el precipitado. El precipitado se resuspendió en 10 mL de medio *Schneider Drosophilla medium* (SDM) más 20% de suero fetal bovino (FBS), pH 5.4, 2% de L-glutamina, 2% de antibiótico y se incubó a 32-33°C. Se hicieron pases con una cantidad inicial de  $5 \times 10^6$  de parásitos de la fase estacionario en 10 mL de medio. El cultivo de amastigotes axénicos se realizó en botellas de cultivo de 25 mL, se contaron diariamente los parásitos en un hemocitómetro y se graficó para ver el crecimiento de los amastigotes.

### 4.2.- Obtención de los sobrenadantes de los amastigotes de *Leishmania mexicana*

Se usaron amastigotes del quinto día de cultivo y se lavaron dos veces en medio SDM modificado (SDMM), el medio SDMM no contiene FBS, fosfatos, ni L-tirosina. Se resuspendieron en aproximadamente 10 ml, 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 separó el volumen que contenía  $5 \times 10^8$ . Esta cantidad de parásitos se pasó a 5 ml de medio SDMM y se incubó durante 15 minutos, 1, 3 y 5 horas a 32°C. Después se centrifugó a 2000× g durante 12 minutos para obtener el sobrenadante. El precipitado de parásitos se utilizó para analizar su viabilidad. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 13500× g y se pasó por un filtro de amicón de 10 kDa de tamaño de poro (millipore), se concentró aproximadamente 10 veces y se guardó a -20 °C. Los “sobrenadantes” representan al medio SDMM que contiene las moléculas secretadas por los amastigotes de *L. mexicana*. Como control negativo de los experimentos realizados se utilizó el medio SDMM solo.

#### **4.3.- Determinación de la actividad de fosfatasa ácida**

La medición de la actividad se llevó a cabo en placas de 96 pozos, 40 µl de sobrenadante se incubaron en amortiguador (200 mM de acetato de sodio a pH 5, 10 mM de *p*-nitrofenilfosfato «Sigma Aldrich») en un volumen final de 100 µl de esta “mezcla de reacción”, durante 1 hora a 32 °C. La reacción se paró con la adición de 20 µl de hidróxido de sodio 2 N y se leyó en un espectrofotómetro a 405 nm.

#### **4.4.- Prueba de viabilidad de los amastigotes de *Leishmania mexicana***

Se incubaron  $2 \times 10^6$  de parásitos en medio SDMM ajustados a 100 µl, en placas de 92 pozos, se agregó 50 µl del reactivo de XTT comercial (Roche), se incubó durante 3 horas y por último se leyó a 550 y 450 nm en un espectrofotómetro. La actividad de XTT obtenida en el control de parásitos incubados durante 0 horas de secreción se consideró como el cien por ciento de viabilidad.

#### **4.5.- Determinación de la actividad de PTP y PSP de los sobrenadantes de los amastigotes de *Leishmania mexicana***

En los sobrenadantes se analizó la actividad específica de PTP y PSP, 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 por la fosfatasa correspondiente. La actividad se analizó en un amortiguador de acetato a pH 5.0 (descrito en la sección 4.3), 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 incubaron 40 µl de sobrenadante de amastigotes con 5 µL del sustrato en un volumen total de 100 µl, la reacción se paró con la adición de 50 µl de “Dye/additive”, la absorbancia se registró en un espectrofotómetro a 630 nm.

#### **4.6.- Efecto de compuestos químicos en la actividad de fosfatasa de los sobrenadantes**

El sobrenadante fue analizado con inhibidores de PTP como el ortovanadato (100 µM; Sigma) y el pervanadato (50 µM; Alexys Biochemycals) e inhibidores de PSP como la trifluoperazina (100 µM; Sigma) y el ácido okadáico (1 µM; Sigma). La reacción se llevó a cabo en el amortiguador de acetato (descrito en la sección 4.3), se agregó 40 µl

de sobrenadante, esta mezcla se preincubó por 15 minutos a temperatura ambiente antes de agregar el sustrato p-NPP y después se incubó durante otros 60 minutos a temperatura ambiente.

#### **4.7.- Análisis del perfil electroforético de los sobrenadantes y detección de PTPasas y PP2C por ensayo de Western Blot**

Las proteínas secretadas al medio SDMM fueron precipitadas con acetona (100µl de volumen de sobrenadante), posteriormente se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% y se tiñeron con un equipo de tinción de plata (Bio-Rad) o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anticuerpos monoclonales generados contra el sitio catalítico de una PTPasa 1B de placenta humana (Oncogen) (1µg/ml) o con anticuerpos policlonales producidos en nuestro laboratorio, generados contra una proteína recombinante PP2C de *L. major* en una dilución 1/1000, después de cuatro lavados con TBS-T las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina anti-ratón IgG (Biotechnology, Santa Cruz CA, USA) en una dilución 1/5000, y un anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina anti IgG de conejo (Biomed, Foster City, CA, USA) dilución 1/5000 respectivamente, luego se lavó cinco veces en TBS-T. Las proteínas se revelaron por quimioluminiscencia (Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

#### **4.8.- Efecto de anticuerpos en la actividad de fosfatasa de los sobrenadantes**

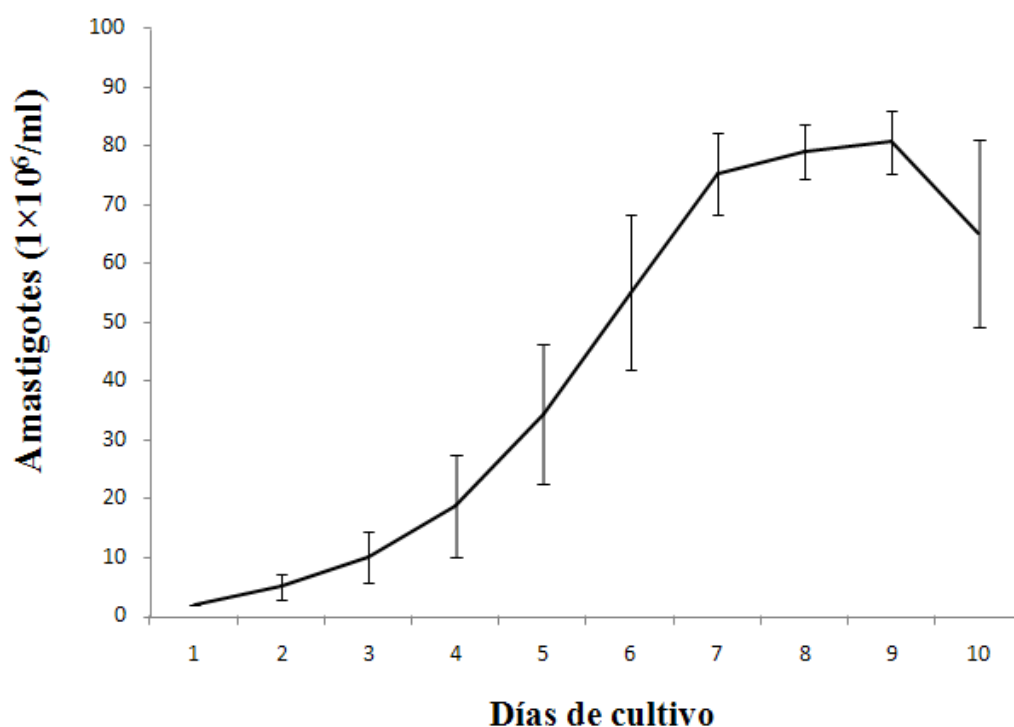
Los sobrenadantes se coincubaron con anticuerpos a distintas concentraciones (0, 1 y 5 µg/µl). Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti PTP1B de placenta humana (Oncogen) y policlonales anti PP2C (antes descrito), como control del efecto de la concentración del anticuerpo anti PTP1B se utilizó un control del mismo isotipo (IgG2a), mientras que para PP2C se utilizó como control suero preinmune. Para esta prueba se preincubaron 40 µl de sobrenadante con los anticuerpos antes mencionados, durante 15 minutos en el amortiguador de acetato pH 5.0 (descrito en la sección 4.3) antes de agregar el sustrato de p-NPP.



## 5.- Resultados

### 5.1.- Estandarización del cultivo axénico de amastigotes

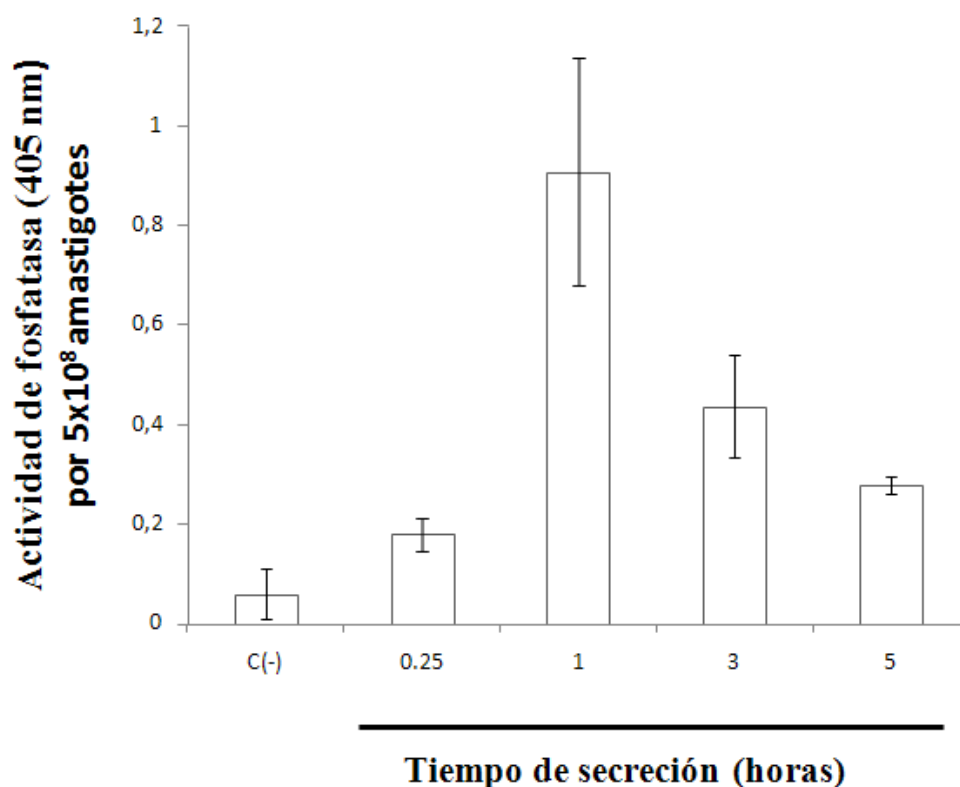
Como se muestra en la figura 1, los amastigotes cultivados en 5 mL de SDM + 20% de FBS crecieron de forma exponencial desde el primero hasta el cuarto día de cultivo, de forma logarítmica del día quinto al séptimo, el crecimiento se mantuvo estacionario que del día séptimo al noveno y por último hubo una etapa de decaimiento que inició el día décimo hasta el final del cultivo. Durante el cultivo se observó la presencia de conglomerados de parásitos como se reportó para *L. mexicana* (Bates, 1994 y 1995).



**Figura 1.- Crecimiento de los amastigotes de *L. mexicana* cultivados en medio axénico.** Los puntos de la curva presentan el promedio de tres ensayos realizados por separado y las barras representan la desviación estándar.

## 5.2.- Secreción de fosfatasas por los amastigotes de *Leishmania mexicana*

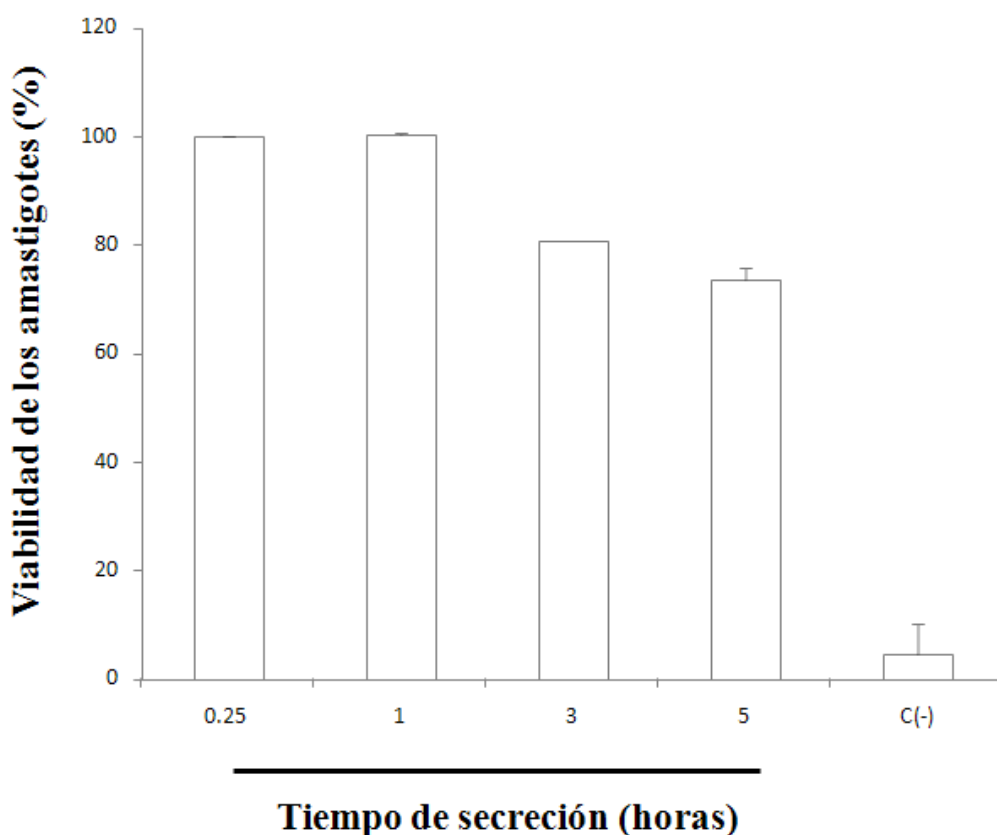
Se analizó la actividad de fosfatasa en los sobrenadantes de 0.25 (15 minutos), 1, 3 y 5 horas de incubación. Como se muestra en la figura 2, se detectó que una proteína con actividad de fosfatasa ácida se secreta en los diferentes tiempos analizados. Se observó una mayor actividad enzimática a 1 hora de secreción, mientras que a tiempos posteriores (3 y 5 horas) hubo una disminución de la misma. El control de medio SDMM solo no presentó actividad enzimática.



**Figura 2.- Tiempo óptimo de la actividad de fosfatasa secretada por los amastigotes de *L. mexicana*.** C(-): control negativo de medio SDMM solo. Las columnas representan el promedio de dos ensayos realizados por separado y las barras representan los valores mínimos y máximos obtenidos.

### 5.3.- Viabilidad de los amastigotes de *Leishmania mexicana*

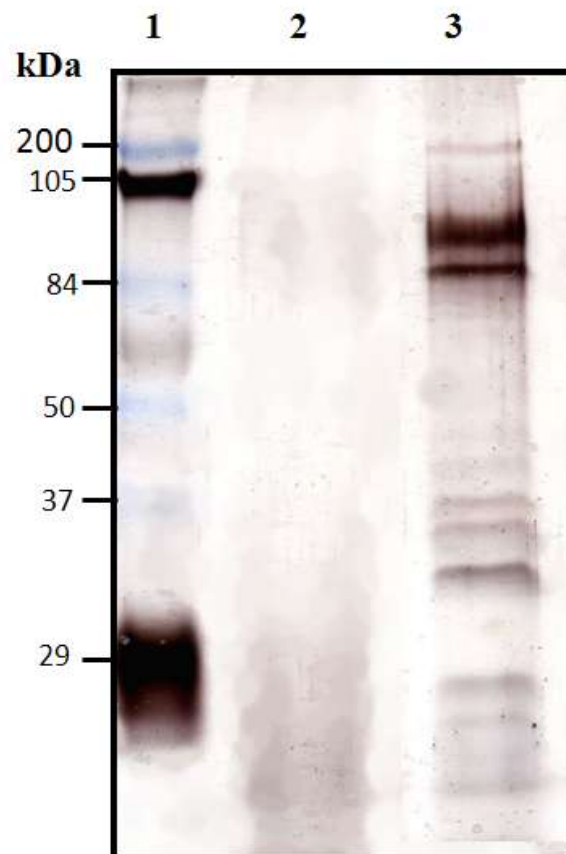
Se analizó la viabilidad de los amastigotes utilizados para cada uno de los tiempos de secreción (15 minutos, 1, 3 y 5 horas). Como se muestra en la figura 3, la viabilidad de los parásitos incubados en el medio SDMM se mantiene al 100% desde el inicio hasta 1 hora de incubación, mientras que a 3 y 5 horas de incubación hay un descenso de la viabilidad de los mismos y en el control de medio SDMM no se presentó actividad de XTT endógena.



**Figura 3.- Viabilidad de los amastigotes a diferentes tiempos de incubación en SDMM. C(-): control de medio SDMM solo. Las columnas representan el promedio de tres ensayos realizados por separado y las barras representan la desviación estándar.**

#### 5.4.- Perfil de proteínas secretadas por amastigotes de *Leishmania mexicana*

Se analizaron los sobrenadantes de cultivo de los amastigotes de *L. mexicana* a 1 hora de secreción en geles de acrilamida por SDS PAGE al 10% teñidos con plata y como se muestra en la figura 4, en el carril 3 se observaron una serie de proteínas de distintos pesos moleculares, en especial un par de proteínas entre los 84 y 90 kDa aproximadamente, estas proteínas no se presentaron en el medio SDMM solo usado como control (carril 2).

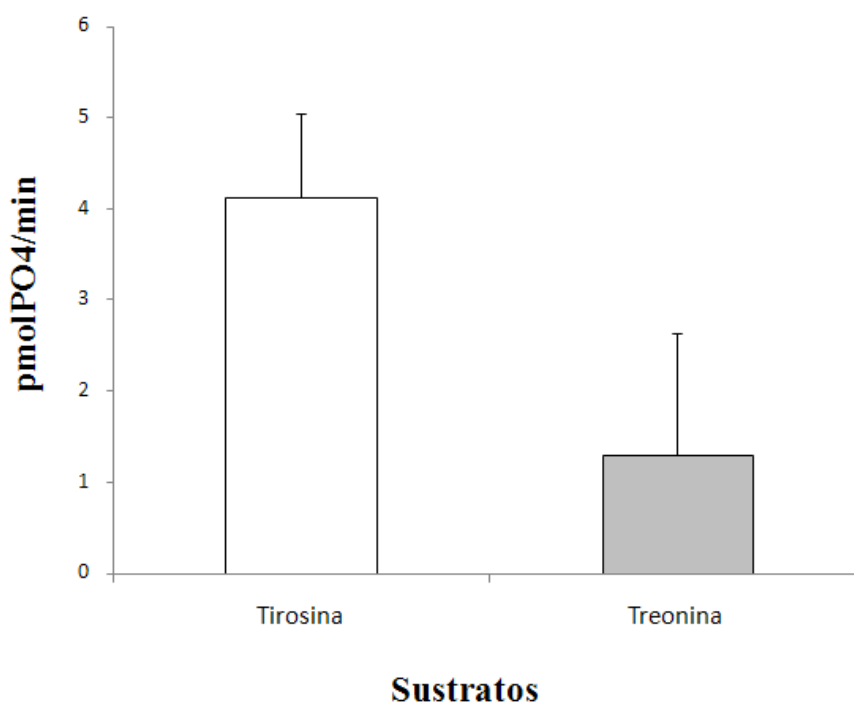


**Figura 4.- Perfil de proteínas de los sobrenadantes de amastigotes de *L. mexicana*.**

1: pesos moleculares. 2: medio SDMM solo. 3: sobrenadante de *Leishmania*. La figura muestra un gel representativo de cuatro ensayos separados.

### 5.5.- Especificidad de sustrato de la fosfatasa secretada por los amastigotes de *Leishmania mexicana*

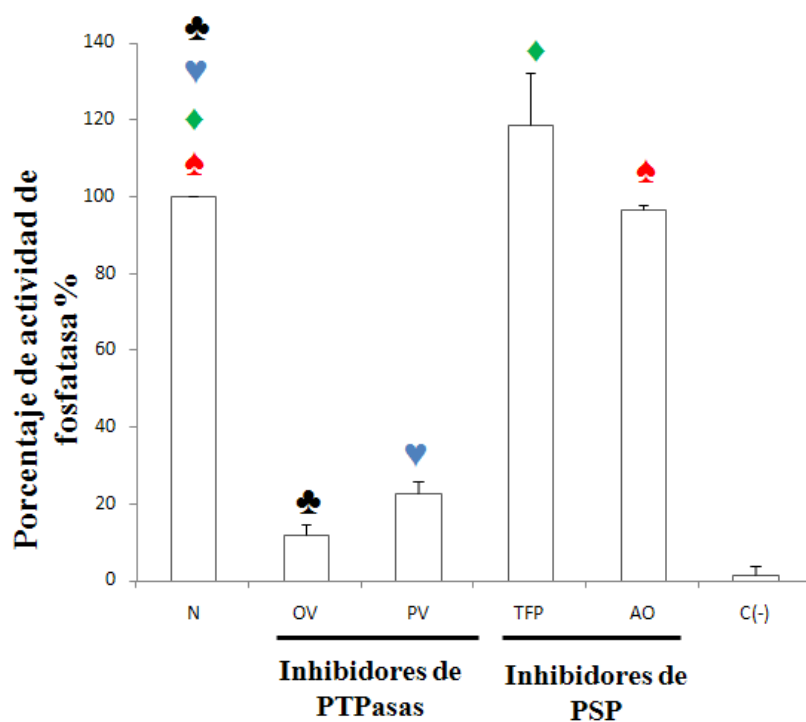
Como se muestra en la figura 5, la fosfatasa presente en los sobrenadantes a 1 hora de secreción fue capaz de defosforilar en promedio 4 pmol del sustrato de fosfotirosina (ENDpYINASL) por minuto, mientras que para el sustrato de fosfotreonina (RRApTVA) hubo una defosforilación de 1 pmol por minuto.



**Figura 5.- Análisis de la especificidad de sustrato de las fosfatasas secretadas por los amastigotes** utilizando péptidos fosforilados sintéticos de fosfotirosina (END (pY) INASL) y fosfotreonina (RRA(pT)VA). Las columnas representan el promedio de tres ensayos realizados por separado y las barras representan la desviación estándar.

### 5.6.- Efecto de los inhibidores de PTP y PSP en la actividad de fosfatasa secretada por los amastigotes de *Leishmania mexicana*

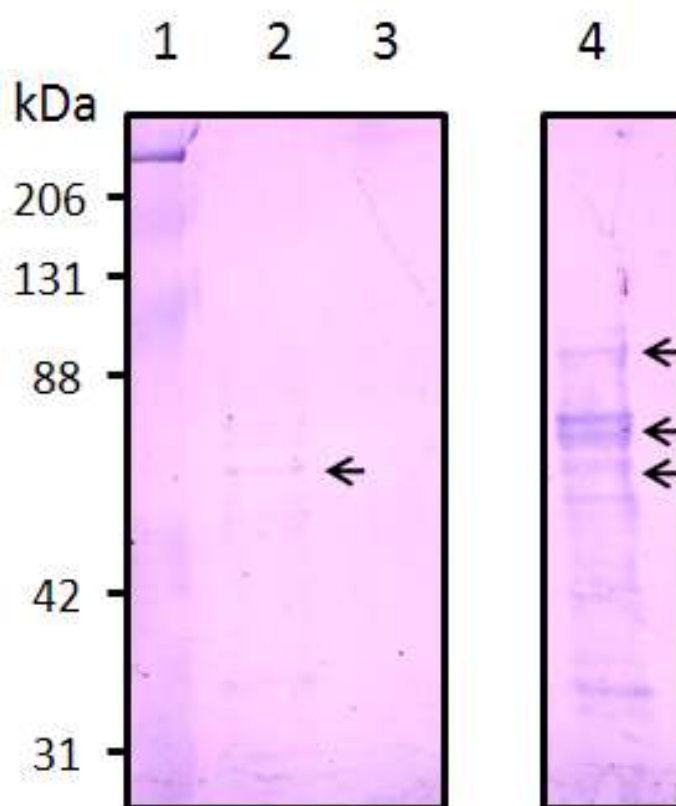
Se analizó el efecto de inhibidores específicos de PTP como el ortovanadato y el pervanadato, así como el efecto de inhibidores de PSP como la trifluoperazina y el ácido okadaico. Como se muestra en la figura 6, los inhibidores de PTP abatieron la actividad de fosfatasa, el ortovanadato en un 88% y el pervanadato en un 77%. En cuanto a los inhibidores de PSP, la trifluoperazina, de forma inesperada, incrementó en un 18.6% la actividad de fosfatasa mientras que el ácido okadaico produjo una disminución de 3.4%. Los efectos producidos por todos los inhibidores probados con respecto a la actividad de fosfatasa sin inhibidor fueron estadísticamente significativos. El control de medio SDMM solo no presentó actividad catalítica endógena.



**Figura 6.- Efecto de los inhibidores de PTP y PSP en la actividad de fosfatasa secretada por *L. mexicana*.** N: sin inhibidor. OV: ortovanadato. PV: pervanadato. TFP: trifluoperazina. AO: ácido okadaico. C(-): control negativo de medio SDMM solo. Las columnas representan el promedio de tres ensayos realizados por separado y las barras representan la desviación estándar. Las diferencias significativas (♠ ♥ ♦ ♣,  $p < 0.05$ ) fueron analizadas mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

### 5.7.- Inmunodetección de una PTP secretada por los amastigotes de *Leishmania mexicana*

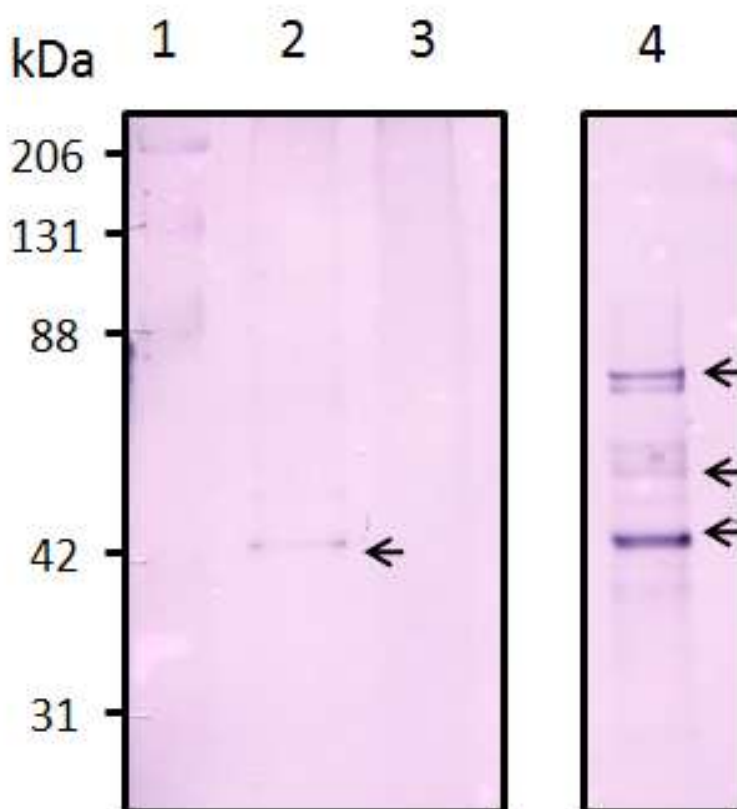
Utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra el sitio catalítico de una PTP de placenta humana se detectó la presencia de una PTP, como se muestra en el segundo carril de la figura 7, la PTP secretada tiene un peso aproximado de 50 kDa, en el control de medio SDMM solo no se observó ningún reconocimiento de proteínas (carril 3). En el carril 4 se muestra un lisado de amastigotes donde se pudo apreciar además de otras moléculas el reconocimiento de la proteína de 50 kDa.



**Figura 7.- Identificación de una PTP secretada por amastigotes de *L. mexicana* a 1 hora de secreción.** 1: marcador de peso molecular. 2: sobrenadante de *L. mexicana*. 3: control negativo de medio SDMM solo. 4: control de amastigotes lisados.

### 5.8.- Identificación de una PP2C secretada por los amastigotes de *Leishmania mexicana*

Utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra una PP2C recombinante de *L. major* se detectó la presencia de una PP2C de aproximadamente 45 kDa (carril 2 de la figura 8), mientras que en el control de medio SDMM solo no se observaron bandas (carril 3). En el control de amastigotes lisados se pudo observar que el anticuerpo anti PP2C reconoció además de la proteína de 42 kDa otras proteínas PP2C citosólicas.



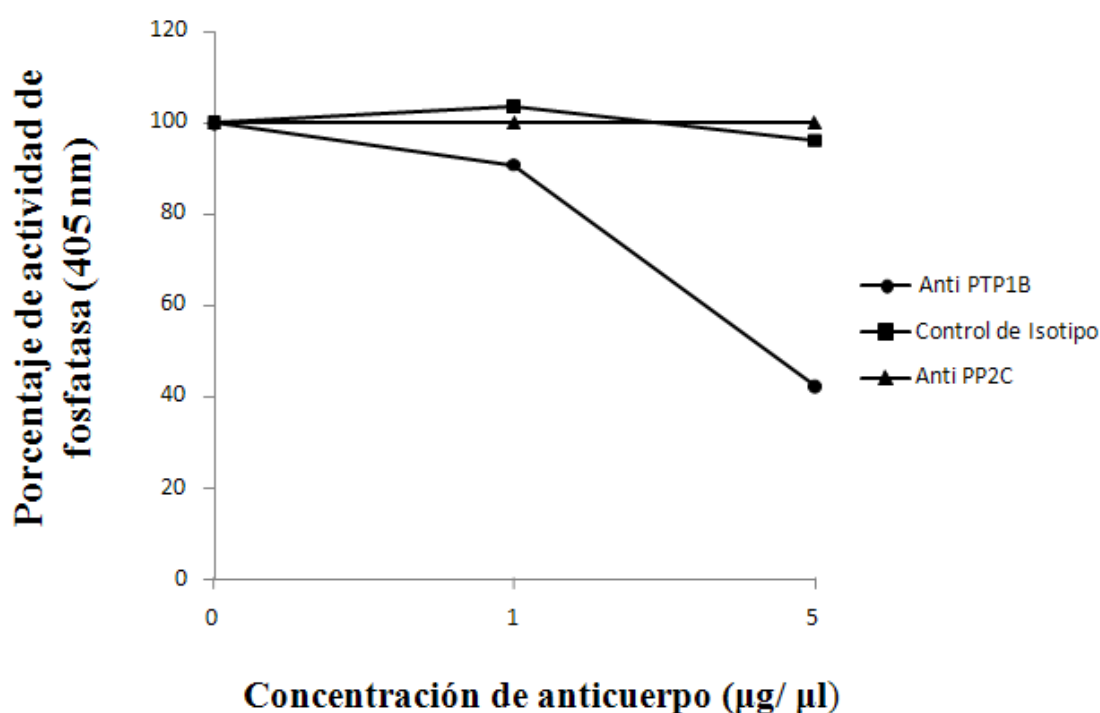
**Figura 8.- Identificación de una PP2C secretada por amastigotes de *L.mexicana*.**

1: Marcador de peso molecular. 2: sobrenadante a 1 hora de secreción. 3: control negativo de medio SDMM solo. 4: control de amastigotes lisados.



### 5.9.- Inhibición de la actividad de fosfatasa secretada por los amastigotes de *Leishmania mexicana* utilizando anticuerpos anti PTP1B y anti PP2C

Como se muestra en la figura 9, se observó que al coincubar los sobrenadantes de los amastigotes de *L. mexicana* con diferentes concentraciones (1 y 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de anticuerpos específicos contra la PTP1B se inhibió la actividad de fosfatasa de forma dosis dependiente, sin embargo, la coincubación de los sobrenadantes con el anticuerpo anti PP2C no presentó el mismo efecto. Como se puede observar el control de isotipo del anticuerpo anti PTP1B no tuvo ningún efecto en la actividad enzimática.



**Figura 9.- Inhibición de la actividad de fosfatasa secretada por amastigotes de *L. mexicana* utilizando anticuerpos específicos.** Se muestra el porcentaje de actividad de fosfatasa de los sobrenadantes preincubados con anticuerpos: monoclonales dirigidos contra el sitio catalítico de una PTP1B (círculos); un control del mismo isotipo del anticuerpo anti PTP1B (cuadro) y policlonales anti PP2C (triángulos).

## 6.- Discusión

Se sabe que *Leishmania* en la fase de promastigote metacíclico secreta una gran cantidad de proteínas al medio de cultivo y que éstas tienen un efecto inmunomodulador en la célula hospedera (Silverman, 2008; Hassani, 2011). Sin embargo, se sabe poco acerca de las proteínas secretadas durante el estadio de amastigotes, la fase de mayor relevancia clínica. Los amastigotes de *Leishmania* secretan LPG al medio y durante su estancia en la célula hospedera (Bahr, 1998; Ilg, 1999), este fosfoglicolípido se ha visto involucrado en diversos mecanismos de evasión de la respuesta leishmanicida del macrófago, sin embargo, LPG no es necesario para la infección ya que mutantes que no poseen ésta molécula continúan siendo infectivos (Ilg, 2000). Los amastigotes de *L. donovani* secretan SAPs al medio de cultivo, éstas fosfatasas podrían participar en la virulencia del parásito ya que en la fase promastigote, proteínas de este tipo inhiben el estallido oxidativo (Remaley, 2005). Los amastigotes de *L. mexicana* secretan aPPG a la vacuola parasitófora y al tejido infectado, los amastigotes obtenidos de cultivo axénico no secretan esta molécula al medio de cultivo, lo que indica que la secreción de aPPG requiere de factores externos de las células hospederas, esta proteína participa en la infección del amastigote induciendo vacuolización y activando la vía de complemento lejos de la superficie del parásito. Aparte de aPPG, no se conocen más proteínas secretadas por *L. mexicana* en la fase de amastigotes.

Se sabe que *Leishmania* inhibe diversas vías de señalización, así como la expresión de una gran cantidad de genes en la célula hospedera (Olivier, 2005; Buates, 2001), esto se debe en parte a la activación de fosfatasas del hospedero, como la SHP-1, PP2A y posiblemente PP1 (Bhardwaj, 2010). La activación de la PTP SHP-1 mediante la unión de EF-1 $\alpha$  secretada por *Leishmania* fue descrita como el principal mecanismo de evasión del parásito, ya que SHP-1 inhibe entre otras vías, la vía de JAK/STAT, lo que ocasiona la inhibición de la producción de NO, el principal mecanismo leishmanicida (Nandan, 2005). *Leishmania* también induce la expresión de PP2A y PP1 por medio de un proceso dependiente de ceramidas y esto provoca la inhibición de la vía de ERK y PKC (Dey, 2007). Además de la inducción de fosfatasas del hospedero, *Leishmania* cuenta con fosfatasas propias que pueden participar en el proceso de infección. En nuestro laboratorio se reportó que *L. major* presenta una PTP de superficie y que ésta aumenta su expresión en la fase metacíclica, lo que indica probablemente una función durante la transmisión al mamífero. Por otra parte, también reportamos que *L. mexicana*

en la fase de promastigote metacíclico secreta una PTP al medio de cultivo. Además se clonó y purificó una PP2C, la cual se localizó en el bolsillo flagelar de promastigotes metacíclicos lo que puede indicar que se está secretando, en apoyo a esto se reportó la presencia de PP2C en el secretoma de *L. donovani* (Silverman, 2005). Debido a lo anterior, el objetivo de la presente tesis fue analizar si los amastigotes de *L. mexicana* secretan fosfatas al medio de cultivo.

El cultivo de los amastigotes de *L. mexicana* fue fluctuante y difícil de reproducir, la cinética de crecimiento varió de un aislado a otro, así como las características del cultivo como la formación de agregados, que no se observó en los primeros pases pero sí en pases subsecuentes. Estos agregados se hallan ampliamente reportados en la literatura como característica propia de los cultivos de *L. mexicana* (Bates, 1994 y 1998), de modo que se requiere una revisión más constante y meticulosa a través de varios pases del parásito por ratón para contar con curvas de crecimiento confiables. En la presente tesis se probó la estandarización del cultivo de amastigotes derivados de promastigotes metacíclicos, se observó que estos revertían a promastigotes después de varios pases, por lo que al final se decidió utilizar amastigotes aislados de ratones infectados. A pesar de esto, el objetivo de esta tesis se cumplió, ya que se observó que los amastigotes secretaron proteínas y fosfatasas al medio de cultivo. El perfil de proteínas secretadas fue similar y altamente reproducible en todos los tiempos, esto demuestra que la composición proteica de las secreciones del parásito no varía mucho en el tiempo, sino que sólo varía la cantidad y concentración de las proteínas secretadas. La posibilidad de identificar estas proteínas es una perspectiva que debe ser analizada en trabajos futuros, el uso de amastigotes axénicos en lugar de amastigotes obtenidos de ratones infectados facilita esta tarea, ya que permite obtener un número de parásitos suficientes para los experimentos y libres de componentes celulares del tejido infectado (Hernández, 2007). Sin embargo, encontramos como principal limitante de la caracterización de las proteínas encontradas que la cantidad de proteína fue muy baja. Los amastigotes de *L. mexicana* secretaron al medio de cultivo axénico proteínas con actividad de fosfatasa ácida, además se observó que el tiempo óptimo de secreción de esta actividad fue de 1 hora y que en este tiempo los amastigotes seguían teniendo el 100% de viabilidad. En promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* se ha reportado que el tiempo óptimo de secreción de actividad de fosfatasa es de 7 horas (Escalona, 2010). Esto indica diferencias en el tiempo de secreción de fosfatasas entre la fase de promastigote metacíclico y la fase de amastigote, y posiblemente diferencias en la

función que estas fosfatasa pueden tener en la sobrevivencia del parásito ya que ambas fases se enfrentan a condiciones diferentes. Por otra parte la reducción de la actividad de los sobrenadantes a tiempos posteriores puede deberse a la disminución de la viabilidad de los amastigotes observada mediante el XTT.

Las fosfatasa secretadas al sobrenadante defosforilaron de forma específica péptidos de fosfotirosina, y en menor grado péptidos de fosfotreonina. En sobrenadantes de promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* se ha reportado la presencia de una PTP, la cual presenta mayor defosforilación de sustrato por minuto (Escalona, 2010) en comparación con la observada en la presente tesis, lo cual puede significar una mayor secreción en la fase de promastigotes, que reflejaría nuevamente diferencias en la función en el estadio del amastigote. Los inhibidores de PTP fueron capaces de abatir la actividad enzimática de los sobrenadantes, mientras que los inhibidores de PSP produjeron un incremento (trifluoperazina) y una pequeña inhibición (ácido okadáico) de la actividad de fosfatasa, todos los efectos observados en las pruebas con inhibidores fueron estadísticamente significativos respecto a la actividad de los sobrenadantes sin inhibidor, lo cual muestra, otra vez, la presencia de una PTP y probablemente una PSP secretadas al medio de cultivo. Por otra parte se detectó mediante anticuerpos específicos anti PTP1B la presencia de una proteína que comparte el epítipo del sitio catalítico de una PTP de placenta humana en el sobrenadante. Para corroborar la presencia de una PTP se probó bloquear la actividad de fosfatasa mediante anticuerpos específicos que se unen al sitio catalítico de las PTP, dicho bloqueo fue observado, lo que demuestra que los amastigotes de *L. mexicana* secretan una PTP al sobrenadante. En promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* se ha identificado la presencia de una PTP secretada al sobrenadante de aproximadamente el mismo peso molecular de la PTP detectada en esta tesis y ambas tienen un patrón de inhibición similar (Escalona, 2010), por lo que se debe analizar en el futuro si se trata de la misma o las mismas PTP.

También se detectó la presencia de una proteína que contiene epítipos de la PP2C. La PP2C es una PSP no sensible a inhibidores convencionales como el ácido okadáico y la flouoperazina, aunque requiere de cationes divalentes de magnesio y un pH óptimo para su actividad óptima, tomando esto en cuenta se evaluó la actividad de los sobrenadantes en estas condiciones, sin embargo, no se pudo detectar aumento de actividad enzimática, lo que indica la ausencia de actividad enzimática debida a esta fosfatasa o que esta proteínas necesita de algún otro factor. Esta contradicción deberá ser examinada en el futuro para encontrar las condiciones óptimas de actividad

enzimática de la PP2C detectada por Western Blot y si la actividad específica de fosfotreonina se debe a ésta u otra PSP. Una posible explicación podría ser la presencia de la proteína PP2C inactiva secretada por *L. mexicana* con una función de interacción proteica, en lugar de una función catalítica. Se ha reportado la secreción de una PP2C por promastigotes metacíclicos de *L. donovani*, mientras que en *L. major* se ha identificado ésta misma en el bolsillo flagelar lo cual apoya la idea de que esta proteína se está secretando (Silverman, 2008; Escalona 2007).

La participación de fosfatasas de parásitos involucradas en la infección a sus hospederos ha sido abordada en muchos estudios (Anaya-Ruiz, 2003; Bliska, 2009; Beresford, 2009; Hanaoka, 2008; Gilbert, 2007; Nascimento, 2008; Remaley, 1984; Chen, 1997; Nozawa, 1998; Fu, 1996; entre otros). En la infección de *Leishmania* se conoce una amplia defosforilación de proteínas del fagocito, esto se debe en parte a la activación por el parásito de fosfatasas de la célula hospedera como SHP1, PP1 y PP2A (Devki 2002; Mathias, 1998). Sin embargo *Leishmania* cuenta con fosfatasas propias que podrían participar en la infección a las células hospederas, por lo anterior, la presencia de una PTP y de PSP secretada en la fase de amastigote, el estadio que reside de forma intracelular y que por lo tanto tiene mayor relevancia clínica, es de gran importancia en el estudio de los mecanismos de infección del parásito, por la posible participación que estas enzimas pueden tener en la modulación de los mecanismos leishmanicidas de la célula hospedera.

## 7.- Conclusión

- Los amastigotes de *Leishmania mexicana* secretan una PTP y una PP2C al medio de cultivo.

## 8.- Referencias

- Aebischer T., Harbecke D., y Ilg T. (1999) Proteophosphoglycan, a major secreted product of intracellular *Leishmania mexicana* amastigotes, is a poor B-cell antigen and does not elicit a specific conventional CD41 T-cell response. *Infection Immunology* 67, 5379–5385.
- Aguirre G. M., Escalona M. A., Bakalara N., Pérez T. A., Gutiérrez K. L. y Becker I. (2006) *L. major*: detection of membrane-bound protein tyrosine phosphatase. *Parasitology* 132, 641-649.
- Akuffo H. (2007) Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection. *WHO*, 1-32.
- Anaya R. M., Pérez S. J. y Talamás R. P. (2003) An ecto-protein tyrosine phosphatase of *Entamoeba histolytica* induces cellular detachment by disruption of actin filaments in HeLa cells. *International Journal for Parasitology* 33, 663-670.
- Aoki N., Jin-no S., Nakagawa Y., Asai N., Arakawa E., Tamura N., Tmaura T., y Matsuda T. (2007) Identification and characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox- and hormone dependent induction of milk fat globule-epidermal growth factor 8-associated microvesicles. *Endocrinology* 148, 3850-3862.
- Barford D., Das A. K., y Egloff M. P. (1998) The Structure and Mechanism of Protein Phosphatases: Insights into Catalysis and Regulation. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure* 27, 133-164.
- Bates P. A., Robertson C. D. Tetley L. Coombs G. H. (1992) Axenic Cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* 105, 193-202.
- Bates P. A. (1994) Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology* 108, 1–9.
- Bhardwaj S., Srivastava N., Sudan R. y Saha B. (2010) *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 1-13.
- Becker I. Carrada G., González C., Berzunza M., Rivas B., Gudiño M., y Velasco O. (2005) Análisis de Leishmaniasis en México. *Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis visceral en las Américas*, 28-33.

- Becker I., Salaiza N., Aguirre M., Delgado J., Carrillo N., Kobeh L., G. Ruiz A., Cervantes R., Torres A. P., Cabrera N., González A., Maldonado C. e Isibasi A. (2003) *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and Biochemical Parasitology* 130, 65-74.
- Bennett C. L., Misslitz A., Colledge L., Aeschbacher T. y Blackburn C. C. (2001) Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *European Journal of Immunology* 31, 876–883.
- Beresford N. J., Mulheran D., Szczepankiewicz B., Liu G., Johnson M. E., Fordham S. A. Abad Z. C. Cavet J. S. y Taberner L. (2009) Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63, 928-936.
- Besteiro S., William R. A. Coombs G. H. y Mottram J. C. (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal of Parasitology* 37, 1063-1075.
- Blackwell J. M., Ezekowitz R. A., Roberts M. B. Channon J. Y. Sim R. B. y Gordon S. (1985) Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *Journal of Experimental Medicine* 162, 324–331.
- Bliska J. B., Guan K. L., Dixon J. E. y Falkow S. (1991) Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proceedings of National Academy of USA* 88, 1187-1191.
- Bogdan C. y Rollinghoff M. (1999) How Do Protozoan Parasites Survive Inside Macrophages? *Parasitology Today* 15, 22-28.
- Brenchley R., Tarig H., McElhinner H., Szoor B., Huxley J., Stevens R., Matthews K. y Taberner L. (2007) The TriTryp Phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics* 8, 1-22.
- Brittingham A., Morrison C. J. McMaster W. R., McGwire B. S., Chang K. P. y Mosser D. M. (1995) Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement mediated lysis. *Journal Immunology* 155, 3102–3111.
- Buatois S. y Matlashewski G. (2001) General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *Journal of Immunology* 166, 3416–3422.
- Burchmore R. J. y Barrett M. P. (2001) Life in Vacuoles – Nutrient Acquisition by *Leishmania* Amastigotes. *International Journal of Parasitology* 31, 1311-1320.

- Cameron P., McGachy A., Anderson M., Paul A., Coombs G. H., Mottram J. C. Alexander J. y Plevin R. (2004) Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Journal of Immunology* 173, 3297–3304.
- Chen L. C., Pirofski L. A. y Casadevall, A. (1997) Extracellular proteins of *Cryptococcus neoformans* and host antibody response. *Infection Immunology* 65, 2599–2605.
- Colmenares M., Corbí A. L., Turco S. J. y Rivas L. (2004) The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *Journal of Immunology* 172, 1186–1190.
- Hernández C. C. (2007) *Leishmania amazonensis*: Humoral response to amastigotes excreted-antigens in murine leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 116, 492-496.
- De Souza S. L., Lang T., Prina E., Hellio R. y Antoine J. C. (1995) Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *Journal of Cell Science* 108, 3219-3231.
- Debrabant A., Joshi M. B., Pimenta P. F. y Dwyer D. M. (2003) Generation of *Leishmania donovani* axenic Amastigotes: their Growth and Biological Characteristics. *International Journal of Parasitology* 34, 205-217.
- Nandan D., Yi T., López M. Lai C. y Reiner N. E. (2002) *Leishmania* EF-1 $\alpha$  Activates the SRC Homology 2 Domain Containing Tyrosine Phosphatase SHP-1 leading to Macrophage Deactivation. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277. Pp. 50190-50197.
- Dey R., Majumder N., Battacharjee S., Majumdar S. B., Banerjee R., Ganguly S., Das P. y Majumdar S. (2007) *Leishmania donovani*-induced ceramide as the key mediator of Akt dephosphorylation in murine macrophages: role of protein kinase C $\zeta$  and phosphatase. *Infection and immunity* 15, 2136-2142.
- Doyle P. S., Engel J. C., Pimenta P. F., da Silva P. P. y Dwyer D. M. (1991) *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37°C. *Experimental Parasitology* 73, 326–334.
- Ellis M., Sharma D. K., Hilley J. D., Coombs G. H. y Mottram J. C. (2002) Processing and trafficking of *Leishmania mexicana* GP63. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 27968-27974.



- Ellis S. L., Shakarian A. M. y Dwyer D. M. (1998) *Leishmania*: amastigotes synthesize conserved secretory acid phosphatases during human infection. *Experimental Parasitology* 89, 161-168.
- Emanuelsson O., Brunak S., von Heijne G. y Nielsen H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols* 2, 953-971.
- Escalona M. A. y Aguirre G. M. 2007. Clonación y purificación de la proteína fosfatasa PP2C de *Leishmania major*. Facultad de Medicina. *Tesis de Posgrado en Ciencias Biológicas*. UNAM. México, D. F.
- Escalona M. A., Pardavé A. D., Cervantes S. R., García L. P., Gutiérrez Q. M., Gutiérrez K. L., Becker I. y Aguirre G. M. (2010) *Leishmania mexicana* promastigotes secrete a protein tyrosine phosphatase. *Parasitology Research* 107,309-315.
- Fevrier B. y Raposo G. (2004) Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cellular Biology* 16, 415-421.
- Fontayne A., Dang P. M., Gougerot P. M. y El-Benna J. (2002) Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 41, 7743-7750.
- Forget G., Gregory D. J., Whitcombe L. A. y Olivier M. (2006) Role of Host Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-Induced Inhibition of Nitric Oxide Production. *Infection and Immunity* 74, 6272-62790.
- Forget G., Siminovitch K. A. Brochu S., Rivest S. Radzioch D. y Olivier M. (2001) Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. *European Journal of Immunology* 31, 3185-3196.
- Fu Y. y Gala J. E. (1998) The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Molecular Microbiology* 27, 359-368.
- Garami A. e Ilg T. (2001) Disruption of mannose isomerase in *Leishmania mexicana* phosphomannomurase and dolicholphosphate-mannose synthase gene deletion mutants. *Molecular Cell Biology* 20, 3657-3666.
- Gazzinelly R. T. y Denkers E. Y. 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signaling pathways: implication for host parasitism. *Nature Reviews* 6, 895-906.
- Gilbert L. A., Ravindran S., Turetzky J. M. Boothroyd J. C. y Bradley P. J. (2007) *Toxoplasma gondii* targets a Protein phosphatase 2C to the Nuclei of infected Host Cells. *Eukaryotic Cell* 6, 73-83.

- Glasser T. A., Baatz J. E., Kreishman G. P. y Mukkada A. J. (1988) pH homeostasis in *L. donovani* amastigotes and promastigotes. *Proceedings of National Academy of Science of USA* 85, 7602–7606.
- Gómez S. J. y Aguirre G. M. (2007) Participación de las proteínas tirosinas fosfatasas (PTPasas) en la infección de macrófagos de *Leishmania mexicana*. *Tesis de Licenciatura*. UAM, 76.
- Gupta N., Goyal N. y Rastogi A. K. (2001) In vitro Cultivation and Characterization of Axenic Amastigotes of *Leishmania*. *Trends in Parasitology* 17, 150-153.
- Hanaoka N., Umeyama T., Ueno K., Ueda K., Beppu T., Fugo H., Uehara Y. y Niimi M. (2005) A putative dual-specific protein phosphatase encoded by YVH1 controls growth, filamentation and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology* 151, 2223-2232.
- Herwaldt B. (1999) Leishmaniasis. *The Lancet* 354, 1191-1199.
- Ilg T., Stierhof Y. D., Etges R., Adrian M., Harbeckr D. y Overath P. (1991) Secreted acid Phosphatase of *Leishmania mexicana*: A filamentous phosphoglycoprotein polymer. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 88, 8774-8778.
- Ilg T., Etges R., Overath P. McConville M. J. Thomas O. J., Thomas J., Homans S. W. y Ferguson M. A. (1992) Structure of *Leishmania mexicana* Lipophosphoglycan. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 6834-6840.
- Ilg T., Stierhoff Y. D., McConville M. J. y Overath P. (1995) Purification, partial characterization and immunolocalization of a proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes. *European Journal of Cellular Biology* 66, 215–227.
- Ilg T., Stierhof Y. D., Craik D., Simpson R., Handman E. y Bacic A. (1996) Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites. *Journal of Biological Chemistry* 271, 21583–21596.
- Ilg T., Craik D., Currie G. Multhaup G. y Bacic A. (1998) Stage-specific proteophosphoglycan from *Leishmania mexicana* amastigotes. Structural characterization of novel mono-, di-, and triphosphorylated phosphodiester-linked oligosaccharides. *Journal of Biology Chemistry* 273, 13509–13523.
- Ilg T., Montgomery J. Stierhof Y. D. y Handman E. (1999) Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *L. major* gene, ppg1, that encodes a membrane associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. *Journal of Biological Chemistry* 274, 31410–31420.

- Ilg T. (2000) Lipophosphoglycan is not Required for Infection of Macrophages or Mice by *Leishmania mexicana*. *The EMBO Journal* 19, 1953-1962.
- Ilg T. (2000) Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitology Today* 16, 489-497.
- Kane M. M. y Mosser D. M. (2000) *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Current Opinion in Hematology* 7, 26–31.
- Kassani K., Antoniak E., Jardim A. y Oliver M. (2011) Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. *Plos One* 6, 1-10.
- Kellina O. I. (1973) Differences in the sensitivity of inbred mice of different lines to *Leishmania tropica major*. *Medical Parasitology* 42, 279–285.
- Killick K. R. (1979) Biology of *Leishmania* in Phlebotomine sandflies. In *Biology of the Kinetoplastid*. Ed. WHR Lumsden, DA Evans, London: Academic, 395–460.
- Killick K. R. (1990) Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical Veterinary and Entomology* 4, 1–24.
- Kima P. E. (2007) The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal of Parasitology* 37, 1087-1096.
- Kovbasnjuk O. N. y Spring K.R. (2000) The apical membrane glycoalkyl of MDCK cells. *Journal of Membrane Biology* 176, 19–29.
- Low P. G. (1991) The mevalonate pathway in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Identification of dolichols containing 11 and 12 isoprene residues. *Journal of Biological Chemistry* 266, 19250–19257.
- Lukes A. G. et al. 2007. *Toxoplasma gondii* targets a Protein phosphatase 2C to the Nuclei of infected Host Cells. *Eukaryotic Cell* 6, 73-83.
- Lukes J. et al. 1997. Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic. *Journal of Molecular Evolution* 44, 521–527.
- Lynn, M. A. y McMaster R. W. (2008) *Leishmania*: Conserved Evolution – Diverse diseases. *Cell Press. Trends in Parasitology* 24, 103-105.
- Martiny A., Vannier S. M., Borges V. M. Meyer F. J., Assreuy J., Cunha e Silva N. L. y de Souza. (1996) *Leishmania* induced tyrosine phosphorylation in the host macrophage and its implication to infection. *European Journal Cellular Biology* 71, 206–215.
- Martiny A., Meyer F. J., de Souza W. y Vannier S. M. (1999) Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania* amastigotes. *Molecular Biochemistry Parasitology* 102, 1–12.

- McConville M. J. y Ralton J. E. (1997) Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of *Leishmania* parasites. *Behring Institute Mitteilungen* 99, 34–43.
- McConville M. J., Mullin K. A., Ilgoutz S. C. y Teasdale R. D. (2002) Secretary Pathway of Trypanosomatid Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66, 122-154.
- McConville M. J. y Handman E. (2007) The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *International Journal of Parasitology* 37, 1047–1051.
- McMaster W. R (1994) Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology* 108, S29–S36.
- Medina A. E., Karess R. E., Schwarts H. y Russel D. G. (1989) The Promastigote Surface Protease (gp63) of *Leishmania* is Expressed but Differentially Processed and Localized in the Amastigote Stage. *Molecular and biochemical Parasitology* 37, 263-274.
- Mensa W. K., Garq N., McGwire B. S., Lu H. G., Zhong L. Armah D. A. (1999) Roles of free GPIs in amastigotes of *Leishmania*. *Molecular Biochemistry Parasitology* 99, 103–116.
- Menz B., Winter G., Ilg T., Lottspeich F. y Overath P. (1991) Purification and Characterization of a membrane-bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 47, 101-10.
- Murray H. W. (2006) Responses to *Leishmania Donovanii* in mice deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *American Journal of Tropical Medical Hygiene* 74, 1013-1015.
- Nandan D., Yi T., López M., Lai C. y Reiner N. E. (2002) *Leishmania* EF1- $\alpha$  Activates the Src Homology 2 Domain Containing Tyrosine Phosphatase SHP-1 Leading to Macrophage Deactivation. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 50190-50197.
- Nandan D. y Reiner N. E. 2005. *Leishmania donovani* engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Clinical Immunology* 114, 266–277.
- Nascimento M., Abourjeily N., Ghosh A., Zhang W. W. y Matlashewski G. (2003) Heterologous expression of a mammalian protein tyrosine phosphatase gene. *Molecular Microbiology* 50, 1517-1526.
- Nascimento M., Zhang W. W., Ghosh A., Houston D. R. Berghuis A. M. Olivier M. y Matlashewski G. et al. (2006) Identification and Characterization of a protein-Tyrosine

- Phosphatase in *Leishmania*. Involvement in virulence. *The journal of biological Chemistry* 281, 36257-36268.
- Nozawa S. R., McCheroni W., Stábeli R. G. Thedei G. y Rossi A. (1998) Purification and properties of pi-repressible acid phosphatases from *Aspergillus nidulans*. *Phytochemistry* 49, 1517–1523.
- Olivier M., Gregory D. J. y Forget. G. (2005) Subversion Mechanisms by which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clinical Microbiology Review* 18, 293-305.
- Olivier M., Romero G. B., Matte C. y Faure R. (1980) Modulation of Interferón- $\gamma$ -induced Macrophage Activation by Phosphotyrosine Phosphatases Inhibition. *Journal of Biochemistry* 273, 13944-13949.
- Overath P. y Aebischer T. (1999) Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathogens. *Parasitology Today* 15, 325–332.
- Pardavé A. H. y Aguirre G. M. (2008) Secreción de la Proteína Tirosina Fosfatasa por promastigotes de *Leishmania mexicana*. *Tesis de Licenciatura*. UNAM, 82.
- Parodi A. J. (1993) N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology* 3, 193–199.
- Peters C., Stierhof Y. D. y Ilg T. (1997) Proteophosphoglycan Secreted by *Leishmania mexicana* Amastigotes Causes Vacuole Formation in Macrophages. *Infection and immunity* 65, 783-786.
- Prina E., Antoine J. C., Wiederanders B. y Kirschke H. (1990) Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis* infected macrophages. *Infection Immunology* 58, 1730–1737.
- Reithinger R., Dujardin J. C., Louzir H., Pirmez C. M., Alexander B. y Brooker S. (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infection Disease* 9, 581-596.
- Remaley A. T., Kuhns D. B., Basford R. E., Glew R. H. y Kaplan S. S. (1984) Leishmanial Phosphatase Blocks Neutrophil O-2 Production. *Journal of Biological Chemistry* 259, 11173-11175.
- Remaley A. T., Das S., Campbell P. I., LaRocca G. M., Pope M. T. y Glew R. H. (1985) Characterization of *Leishmania donovani* Acid Phosphatases. *The journal of Biological Chemistry* 260, 880-886.
- Rodriguez N. E., Gaur U. y Wilson M. E. (2006) Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages. *Cellular Microbiology* 8, 1106–1120.

- Sharma D. K., Hilley J. D., Bangs J. D., Coombs G. H., Mottram J. C. y Menon A. K. (2000) Soluble GPI8 restores glycosylphosphatidylinositol anchoring in a trypanosome cell-free system depleted of luminal endoplasmic reticulum proteins. *Biochemistry Journal* 351, 717–722.
- Silverman J. M., Chan S. K., Robinson D. P., Dwyer D. M., Nandan D., Foster L. J. y Reiner N. E. (2008) Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biology* 9, 21.
- Stierhof Y. D., Ilg T., Russell D. G., Hohenberg H. y Overath P. (1994) Characterization of polymer release from the flagellar pocket of *Leishmania mexicana* promastigotes. *The Journal of cell biology* 125, 321-31.
- Szoor B., Wilson J., McElhinney H., Taberner L. y Matthews K. R. (2006) Protein Tyrosine phosphatase TbPTP1: a molecular switch controlling life cycle differentiation in trypanosomes. *The Journal of Cell Biology* 175, 293-303.
- They C., Boussac M., Garin J. y Amigorena S. (2001) Proteomic analysis of dendritic cell derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of Immunology* 166, 7309-7318.
- Turco S. J. (1999) Adversarial relationship between the *Leishmania* lipophosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Parasite Immunology* 21, 597–600.
- Wanderley J. L., Moreira M. E., Benjamin A., Bonomo A. C. y Barcinski M. A. (2006) Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* in mammalian hosts. *Journal of Immunology* 176, 1834–1839.
- Wiese M., Ilg T., Lottspeich F. y Overath P. (1995) Ser/Thr-rich repetitive motifs as targets for phosphoglycan modifications in *Leishmania mexicana* secretes acid phosphatase. *The EMBO Journal* 14, 1067-1074.
- Yang Z., Mosser D.M. y Zhang X. (2007) Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. *Journal of Immunology* 178, 1077–1085.