



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA FOSFATASA DE *Leishmania* Y
ANÁLISIS DE SU PARTICIPACIÓN EN LA INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ESCALONA MONTAÑO ALMA REYNA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DRA. PATRICIA TATO ZALDÍVAR †
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX., MAYO, 2018.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA FOSFATASA DE *Leishmania* Y
ANÁLISIS DE SU PARTICIPACIÓN EN LA INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ESCALONA MONTAÑO ALMA REYNA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DRA. PATRICIA TATO ZALDÍVAR †
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2018.




Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 09 de octubre de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **ESCALONA MONTAÑO ALMA REYNA** con número de cuenta **96605792**, con la tesis titulada **"ESTUDIO FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA FOSFATASA DE Leishmania Y ANÁLISIS DE SU PARTICIPACIÓN EN LA INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS"** realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRE GARCÍA**:

Presidente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Vocal: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Secretario: DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO
Suplente: DRA. ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS
Suplente: DRA. GUILLERMINA ÁVILA RAMÍREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de marzo de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM), por la formación académica recibida durante mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado (Becario 165409/CVU: 165409).

Este proyecto de investigación fue financiado por los donativos 152433 del CONACyT, IN218412 y IN220816 de DGAPA-PAPIIT, UNAM. Estos fueron otorgados a la Dra. María Magdalena Aguirre García.

A la Dra. María Magdalena Aguirre García, por su asesoría y la dirección del presente trabajo.

A los miembros del Comité Tutor, el Dr. Santiago Martínez Calvillo y la Dra. Patricia Tato Zaldívar[†], por su asesoría brindada durante mi formación académica, la cual permitió enriquecer este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México, donde me formé durante mis estudios de licenciatura, maestría y doctorado.

A la Dra. María Magdalena Aguirre García, quien me brindó la oportunidad de realizar la tesis de licenciatura, maestría y doctorado; por su apoyo incondicional durante estos 15 años en el Laboratorio de Inmunoparasitología; por sus enseñanzas, consejos, palabras de aliento y, en su momento, las llamadas de atención; por enseñarme que no hay límites para aprender; por impulsarme a realizar cosas nuevas y enseñarme que, con tenacidad y constancia, se pueden lograr los objetivos que nos hemos planteado.

A la Dra. Ingeborg Becker del Laboratorio de Inmunoparasitología, quien me dio la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Gracias por permitirme realizar la parte experimental de este trabajo en su laboratorio.

A la Dra. María Magdalena Aguirre García, al Dr. Santiago Martínez Calvillo y a la Dra. Patricia Tato Zaldívar¹, quienes formaron parte de mi comité tutorial. En cada reunión de final de semestre, sus sugerencias enriquecieron mi trabajo.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo, por darme la oportunidad de realizar los parásitos *knock-out* en su laboratorio y proveer todo el material necesario para la obtención de los mismos.

A los integrantes del jurado, la Dra. Gladis del Carmen Fragoso González, la Dra. Ana María Fernández Presas, la Dra. Guillermina Ávila Ramírez, el Dr. Abraham Landa Piedra y el Dr. Santiago Martínez Calvillo, por sus comentarios y sugerencias para enriquecer esta tesis.

A la Biól. Fiordaliso Carolina Román Carraro, por su tiempo y enseñanza en la generación de los parásitos *knock-out*.

Al Biól. Arturo Wilkins Rodríguez, por proveer los parásitos de *L. mexicana* y por su asesoría durante los ensayos de infección de este proyecto de investigación; por ser un amigo extraordinario que le pone esfuerzo, entrega y dedicación a cada experimento que realiza. Gracias por brindarme tus conocimientos y por las largas pláticas que hemos compartido durante más de 10 años, asimismo, por esas discusiones que me ayudaron a enriquecer esta investigación.

Al Dr. Ricardo Mondragón Flores, a la Q.F.B. Mónica Mondragón y a la Dra. Sirenia González del Departamento de Bioquímica y Microscopía electrónica del CINVESTAV, por su gran apoyo en el procesamiento de muestras para la microscopía electrónica.

Al M. en C. José de Jesús Argueta Donohué, por su ayuda en la estadística y por las largas charlas; por los desayunos, comidas y viajes. Gracias por estar al pendiente. ¡Eres un excelente amigo!

Al Ing. Omar Agni García-Hernández, por su apoyo técnico en la digitalización de imágenes, y a la Dra. Araceli Rojas Bernabé, por su apoyo técnico en la realización del ELISA.

A la Dra. Laila Gutiérrez, por su ayuda y su disposición para corregir el inglés del artículo. También por la confianza que me ha depositado en asesorar algunos de sus alumnos en el laboratorio.

A la M. en C. Adriana Ruiz Remigio, no sé cómo agradecerte toda tu paciencia. Gracias por soportar mis estados de ánimo que, por lo general, no fueron muy buenos en este camino del doctorado; por el café, las comidas, los desayunos, los conciertos, el teatro y los viajes que hemos compartido juntas. Gracias por tu amistad; por estar al pendiente de mí durante

una etapa muy difícil que fue la cirugía hasta la recuperación. Gracias por tu apoyo técnico en la enseñanza en diversas técnicas, en el laboratorio.

A la M. en C. Rocely Cervantes Sarabia, por su ayuda y asesoría en los ensayos de dilución limitante. Eres una excelente amiga; gracias por tus consejos, los desayunos, los conciertos y por tu compañía en estos años en el laboratorio.

A la Q. F. B. Catalina Gayosso, quien me dejó ver a un ser maravilloso del cual siempre estaré muy agradecida. No tengo con qué pagarte todo tu apoyo en una etapa muy difícil de mi vida, cuando no te importó dejar tus actividades académicas para acompañarme a esas sesiones de rehabilitación física que no fueron nada sencillas. Gracias a las charlas que teníamos durante las sesiones, el dolor se hacía más ligero. Gracias por tus consejos, por tus palabras de aliento, por tu compañía y los viajes juntas.

A Julio González e Ingrid García, quienes siempre estuvieron al pendiente de mí en esta difícil etapa. Ambos son seres excepcionales, quienes cambiaron el tiempo de convivencia con su hijo por sesiones de terapia de rehabilitación. A mi querido ahijado Emiliano, sus sonrisas hicieron más ligero todo. Gracias por su compañía y apoyo durante todo este periodo.

A Selma Díaz, quien al igual que Julio, Ingrid y Cata, estuvo al pendiente de mí y de la rehabilitación que tenía que realizar. Gracias por esos ricos desayunos que me brindaste; por las caminatas que realizamos como parte de mis ejercicios de la terapia. Al igual que yo, tenía que graduarse y terminar con la escritura de su artículo y tesis, sin embargo, en ocasiones cambió su tiempo por esas largas pláticas y caminatas. Son grandes seres humanos.

A la Sra. Adelina López^t, al Dr. Chema, a Nelly y a la Sra. Verónica. Adelita, gracias por abrirme las puertas de tu casa por más de 10 años y, a los demás, por su apoyo incondicional.

A la M. en. C. Jenny Gómez Sandoval. Mi querida Juanita, gracias por toda tu ayuda; por el café, las comidas, los regalos sorpresa, las largas pláticas y los viajes juntas. Gracias por tu valiosa amistad y por tu compañía en mis citas médicas. Eres una excelente amiga.

A la Dra. Berenice Martínez Salazar. Muchas gracias por ese trabajo en equipo que realizamos y por tu confianza durante estos más de 15 años de conocernos. Gracias por tus comentarios constructivos para mejorar en muchas cosas.

Mi querida Dra. Marilú Torres Martínez, gracias por tu amistad; por tus palabras de aliento; por estar siempre al pendiente.

Al grupo de bioquímica: Marco Ornelas, Dalia Ortiz, Mariana Zúñiga, Axel Pérez, Mariana Hernández, Stefanía Medellín, Vania Sánchez, Aura Moreno, Abril Navarrete, Pamela Gómez y Erick Ordaz. Gracias, chicos, por sus sonrisas; por su gran disposición de siempre trabajar en equipo; por el ambiente que generan en el laboratorio. Aunque ustedes no lo crean, yo también he aprendido mucho de ustedes.

A Gina, Rosi, Raquel, Diego, Adriana y Margarita. Gracias por su disposición, apoyo en la parte académica y administrativa, por sus consejos y palabras de aliento en el día a día.

Al Sr. Ricardo Vargas Orozco, al MVZ Daniel Andrés Sánchez Almaraz y al Biól. Guillermo Alberto Ramos Blancas del Bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental, por su gran apoyo técnico en proporcionar los animales de laboratorio que se utilizaron en este trabajo.

Al Laboratorio de Inmunoparasitología: Dra. Norma Salaiza, Dra. Miriam Berzunza, Dr. José Sotero, M. en C. Cristina Cañeda. Por su apoyo desde que llegué al laboratorio a la fecha. A la M. en C. Laura Soto y la M. en C. Raquel Torres, porque al igual que yo, se divierten con los experimentos en el laboratorio, ambas me permitieron ver lo divertido que pueden ser viajar juntas. A la Sra. Susana Saldaña[†] y la Sra. Zaydee, por su apoyo en tener

listo el material para la realización de los experimentos. La Sra. Susana^t es un claro ejemplo de coraje, fortaleza y valentía ante la vida. Gracias por su compañía durante más de 15 años en el laboratorio.

A los que integran el Laboratorio de Patología de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental. A la Dra. Rosario López Vancell, por sus palabras de aliento, los consejos y las pláticas viajeras. Al Dr. Augusto González Canto, quién me invitó a formar parte de varios proyectos que él desarrollaba; gracias por la confianza. Al Dr. Alfonso Olivos, por las sesiones de discusión de proyectos, por la confianza que me brindó para trabajar juntos en los Western Blots. Al Biól. Mario Nequiz, por su buen sentido del humor, los días difíciles se hicieron más ligeros. A la Dra. Gabriela Tognó, por la confianza para el trabajo en equipo y por su amistad.

A Moni, Fabiola y Marisol de la Unidad de Patología Experimental. Gracias, chicas, por su amistad.

A la Dra. Haydee Torres, por su confianza en trabajar en equipo.

A Marco Gudiño Zayas, por su apoyo académico en la digitalización de imágenes. Gracias por más de 10 años de amistad ininterrumpida y por estar siempre.

A la MVZ Rocío Chávez Trejo del Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, por su apoyo y paciencia durante toda mi formación en el doctorado con la entrega de la documentación para las evaluaciones de los tutorales, el examen de candidatura y los recordatorios para la entrega de documentos para obtener el grado.

A mis queridas amigas que casi nunca veo, pero sé que siempre están al pendiente de mí: Lina Jiménez, Susana Delgado, Olga Montaña, Adriana Rodríguez, Rocío Cabrera, Ivonne Torres, Minerva Mata, Beatriz Aguilar y Sandra Cristal.

DEDICATORIA

A Dios, quien me ha dado la sabiduría y la tenacidad en los momentos más difíciles en mi formación académica y personal.

A mis padres, Pablo Escalona e Ignacia Montaña. No tengo palabras para agradecerles todo el apoyo, la confianza, el cariño, sus consejos, por escucharme a lo largo de mi vida. Ustedes siempre han sido un ejemplo a seguir. Todo lo que he logrado es gracias a Dios y a ustedes.

A mis abuelas, Luisa y Bertha, porque siempre han estado apoyándome y siempre me han dado lo mejor.

A mis hermanos, Juan Pablo, Silvia Elena, Juan Carlos y Luis Fernando. Cada uno es un ejemplo de vida, no quiero imaginar qué sería de mi vida sin ustedes.

A mis cuñadas, Adriana y Sonia, por su apoyo y compañía durante este viaje que, junto a mis hermanos, han estado siempre presentes.

A mis Sobrinos, Yael, Sergio, Itzia, Oliver, Dana, Melissa, Josué y Valentina. Desde su llegada, han llenado mi vida de luz y risas.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	II
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Leishmaniasis	3
1.2. <i>Leishmania</i> spp: ciclo de vida	3
1.3. Moléculas presentes en la membrana del parásito protozoario <i>Leishmania</i> spp.....	7
1.4. Proteínas secretadas por <i>Leishmania</i> spp.	8
1.4.1. Exosomas	9
1.5. Proteínas fosfatasa: características bioquímicas y clasificación	11
1.6. Proteínas serina-treonina fosfatasa (PSTs)	12
1.6.1. Proteína fosfatasa PP2C	13
1.7. Inhibidores de PSTs	13
2.1. Moléculas del parásito que inducen la producción de citocinas en los macrófagos.....	15
2.2. Fosfatasa que participan en el crecimiento de los parásitos	15
2.3. Caliculina y el ácido okadaico: inhibidores de serina-treonina fosfatasa que regulan el ciclo celular y la sobrevivida	17
2.4. Sanguinarina.....	17
II. HIPÓTESIS	18
III. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo general.....	19
3.2. Objetivos particulares.....	19
IV. JUSTIFICACIÓN.....	21
V. METODOLOGÍA	22
5.1. Aislamiento y cultivo de los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i> cepa MHOM/MX/2011 Lacandona.....	22
5.2. Obtención de las proteínas secretadas al medio de cultivo por los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i>	23
5.3. Viabilidad de los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i>	23
5.4. Cuantificación de proteína por el método de Bradford	24
5.5. Determinación de la actividad enzimática de fosfatasa en los MSP y MSA.....	24
5.6. Determinación de la actividad específica de PTP y PST en los sobrenadantes secretados por los promastigotes y los amastigotes	24
5.7. Efecto de inhibidores específicos de PTP y PST sobre la actividad de MSP y MSA.....	25

5.8. Obtención de los extractos totales de los promastigotes y los amastigotes después de la secreción de proteínas al medio de cultivo.....	25
5.9. Identificación de las proteínas fosfatasa PP2C en los MSP y MSA, así como en los extractos totales, las fracciones citosólicas y las fracciones membranales de los promastigotes y los amastigotes.....	26
5.10. Inmunolocalización de la proteína fosfatasa PP2C por inmune electromicroscopía (IEM).	27
5.11. Purificación de monocitos de sangre periférica humana.....	28
5.12. Producción de citocinas en los macrófagos incubados con los MSP y MSA	29
5.13. Inmunoensayo enzimático estándar sándwich (ELISA).....	29
5.13.1. Análisis estadístico.....	30
5.14. Parásito <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379.....	31
5.15. Preparación del compuesto sanguíneo.....	31
5.16. Cultivo de los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379 en presencia de la sanguíneo.....	31
5.17. Participación de la fosfatasa PP2C en la morfología de los promastigotes y amastigotes de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379	32
5.18. Obtención de los extractos totales y análisis de la actividad enzimática	32
5.19. Obtención de las células de médula ósea de ratón y diferenciación a macrófagos	33
5.20. Infección de los macrófagos con los promastigotes y los amastigotes que fueron incubados con la sanguíneo.....	34
5.21. Ensayo de transformación de los promastigotes a los amastigotes de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379.....	35
5.22. Análisis de la presencia de la PP2C en los extractos de parásitos mediante Western Blot..	35
5.23. Análisis bioinformático para conocer la región 5' y 3'-UTR de la PP2C de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379.....	36
5.24. Extracción del DNA genómico de los promastigotes de <i>L. mexicana</i>	37
5.25. Construcción de vectores para <i>knock-out</i>	38
5.26. Transfección de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379	38
5.27. Identificación de la PP2C en los <i>knock-out</i> de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379.....	39
VI. RESULTADOS	41
6.1. Fosfatasa secretada por los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i> cepas: MHOM/MX/92/UADY 68 y MHOM/MX/2011 Lacandona.....	41
6.2. Actividad enzimática específica en los MSP y MSA de <i>L. mexicana</i> MHOM/MX/2011 Lacandona	43
6.3. Análisis del efecto de inhibidores específicos de fosfatasa sobre la actividad del MSP y el MSA	43
6.4. Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en las fracciones subcelulares de los promastigotes, los amastigotes y en el MSP, MSA de <i>L. mexicana</i> MHOM/MX/2011 Lacandona	45
6.5. Localización ultraestructural de la PP2C en los amastigotes de <i>L. mexicana</i> mediante IEM	46
6.6. Producción de citocinas por los macrófagos humanos.....	48
6.7. Participación de la fosfatasa PP2C en el crecimiento de los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379.....	49

6.8. Participación de la fosfatasa PP2C de los promastigotes y amastigotes de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379 en presencia de la sanguinarina	51
6.9. Participación de la PP2C en la morfología de los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379 en presencia de la sanguinarina.....	52
6.10. Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en extractos de los promastigotes y amastigotes de <i>L. mexicana</i> incubados con diferentes concentraciones de sanguinarina	55
6.11. Participación de la proteína fosfatasa PP2C en el proceso de transformación en un cultivo <i>in vitro</i>	56
6.12. Participación de la proteína fosfatasa PP2C en el proceso de infección	57
6.13. Obtención de los parásitos <i>knock-out</i> de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379.....	59
6.14. Identificación de la PP2C en los promastigotes <i>knock-out</i> de <i>L. mexicana</i>	62
VII. DISCUSIÓN.....	63
VIII. CONCLUSIONES	74
IX. LITERATURA CITADA	75
X. ANEXOS	84
Anexo I (Artículo requisito)	84
Anexo II (Artículo derivado del proyecto doctoral)	85

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Los hospederos vertebrados y los mamíferos de <i>Leishmania</i> spp.....	4
Figura 2. Ciclo de vida de la <i>Leishmania</i> spp.....	6
Figura 3. <i>Leishmania</i> secreta microvesículas que probablemente sean una combinación de exosomas y vesículas de la membrana plasmática.....	10
Figura 4. Estructura química de la sanguinarina.....	18
Figura 5. Proteínas secretadas por los promastigotes los amastigotes de <i>L. mexicana</i> MHOM/MX/92/UADY 68 y por <i>L. mexicana</i> MHOM/MX/2011 Lacandona que presentan actividad enzimática de fosfatasa.....	42
Figura 6. Caracterización bioquímica de las proteínas presentes en el MSP y el MSA.....	44
Figura 7. Inmunodetección de la proteína fosfatasa PP2C secretada al medio de cultivo y en las fracciones subcelulares de los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i> MHOM/MX/2011 Lacandona.....	46
Figura 8. Distribución de la PP2C en los amastigotes de <i>L. mexicana</i> cepa MHOM/MX/2011 Lacandona por IEM.....	47
Figura 9. Producción de citocinas por los macrófagos humanos estimulados con el MSP y el MSA de <i>L. mexicana</i>	49
Figura 10. Participación de la fosfatasa PP2C en el crecimiento de los promastigotes y los amastigotes de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379.....	50
Figura 11. Participación de la fosfatasa PP2C de los promastigotes y amastigotes de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379 en presencia de la sanguinarina.....	52
Figura 12. Cambios morfológicos observados en los promastigotes de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379 después de la incubación con la sanguinarina.....	53
Figura 13. Cambios morfológicos observados en los amastigotes de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379.....	54
Figura 14. Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en extractos de <i>L. mexicana</i> en ambos estadios.....	55
Figura 15. Porcentaje de parásitos de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379 transformados en los amastigotes.....	56
Figura 16. Participación de la proteína fosfatasa PP2C en el proceso de infección de los macrófagos.....	58
Figura 17. Morfología de los promastigotes <i>knock-out</i> de <i>L. mexicana</i> MNYC/BZ/62/M379.....	60
Figura 18. Morfología de los promastigotes <i>knock-out</i> en diferentes días de cultivo.....	61
Figura 19. Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en los promastigotes <i>knock-out</i>	62
Tabla 1. Cuadros clínicos de Leishmaniasis.....	7
Tabla 2. Secuencias de los oligoneucleótidos para ampliar las regiones 5' y 3'-UTRs.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AG	Aparato de Golgi
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Cisteína
CD	Célula dendrítica
CPA	Célula presentadora de antígeno
CX ₅ R	Cisteína, X cualquier aminoácido y arginina
DIC	Contraste diferencial de interferencia
DSP	Fosfatasa de especificidad dual
ET	Extracto total
FC	Fracción citosólica
FCP/SCP	Fosfatasa del dominio carboxilo-terminal (CDT) del componente TFIIF asociado a la RNA polimerasa II/ pequeña fosfatasa del CTD
FM	Fracción membranal
GPILs	Glicosilinositolfosfolípidos
GPIs	Glicosilfosfatidilinositol
Gp63	Glicoproteína de 63 kDa
H	Hora
HSP	Proteína de choque térmico
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12p70
IF2	Factor de iniciación en eucariontes 2
ITS	Espaciador transcrito interno
kDa	Kilodaltones
LC	Leishmaniasis cutánea
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LMC	Leishmaniasis mucocutánea

LMW	Bajo peso molecular
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniasis visceral
M	Molar
MEM	Medio esencial mínimo
MET	Microscopia electrónica de transmisión
Min	Minutos
Mg ⁺²	Ión magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitros
Mm	Milimolar
MUP	4-metilumbeferilfosfato
MSA	Medio secretado de amastigotes
MSP	Medio secretado de promastigotes
Mφ	Macrófago
MVBs	Cuerpos multivesiculares
μL	Microlitro
μg	Microgramo
μm	Micrometros
N	Normal
Ng	Nanogramo
NK	Asesina natural
Nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico
NTDs	Enfermedades tropicales desatendidas
OA	Ácido okadaíco
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pg	Picogramo
pH	Potencial de hidrógeno

Pmol	Picomol
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -Nitrofenilfosfato
PPGs	Proteofosfoglicanos
PPM	Fosfoproteínas fosfatasas dependientes de metales
PPP	Fosfoproteína fosfatasa
PP1	Fosfoproteína fosfatasa tipo 1
PP2	Fosfoproteína fosfatasa tipo 2
PP2C	Proteína fosfatasa tipo 2C
PSTs	Proteínas serina treonina fosfatasas
PTPs	Proteínas tirosina fosfatasas
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
R	Arginina
RE	Retículo endoplásmico
RIN	Intermediarios reactivos del nitrógeno
ROI	Intermediarios reactivos del oxígeno
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SDMM	Medio Modificado Schneider's Drosophila
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
TBST	Solución amortiguadora de tween 20
Thr	Treonina
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tyr	Tirosina
V	Voltaje

RESUMEN

La actividad de fosfatasa de *Leishmania* spp. desregula las vías de señalización de la célula hospedera. En el presente trabajo, se muestra que los promastigotes y los amastigotes de *Leishmania mexicana* secretan proteínas con actividad de fosfatasa al medio de cultivo. Los resultados mostraron que las proteínas presentes en el medio de secreción de los promastigotes (MSP) presentaron la actividad más alta comparada con las proteínas presentes en el medio de secreción de los amastigotes (MSA). Esta actividad enzimática no fue debida a la lisis celular, ya que la viabilidad de los parásitos no fue afectada por este proceso de secreción. La caracterización bioquímica mostró que la actividad de fosfatasa presente en el MSP fue más alta en el péptido END (pY) INASL comparada con el péptido RRA(pT)VA. En contraste, la actividad de fosfatasa en el MSA mostró poca capacidad de desfosforilación para ambos péptidos. Los ensayos de inhibición demostraron que la actividad de fosfatasa de ambos, MSP y MSA, fue sensible solamente a inhibidores de proteínas tirosina fosfatasas (PTPs). El anticuerpo α -PP2C reconoce una fosfatasa 2C (PP2C) de *Leishmania major* mostró una reacción cruzada con una molécula de 44.9 kDa en diferentes fracciones celulares de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana*. Resultados interesantes se observaron en los MSP y MSA, pues el anticuerpo reconoció una proteína alrededor de 70 kDa. La proteína PP2C fue localizada en el bolsillo flagelar de los amastigotes mediante microscopía electrónica de transmisión. Los MSP y MSA inducen la producción de citocinas, como: TNF- α , IL-1 β , IL-12p70 e IL-10 en los macrófagos humanos, el mecanismo por el cual se está dando este proceso es desconocido.

ABSTRACT

Phosphatase activity of *Leishmania* spp. has been shown to deregulate the signalling pathways of the host cell. We here show that *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes secrete proteins with phosphatase activity to the culture medium, which was higher in the Promastigote Secretion Medium (PSM) as compared with the Amastigote Secretion Medium (ASM) and was not due to cell lysis, since parasite viability was not affected by the secretion process. The biochemical characterization showed that the phosphatase activity present in PSM was higher in dephosphorylating the peptide END (pY) INASL as compared with the peptide RRA (pT)VA. In contrast, the phosphatase activity in ASM showed little dephosphorylating capacity for both peptides. Inhibition assays demonstrated that the phosphatase activity of both PSM and ASM was sensible only to protein tyrosine phosphatases inhibitors. An antibody against a protein phosphatase 2C (PP2C) of *Leishmania major* cross-reacted with a 44.9 kDa molecule in different cellular fractions of *L. mexicana* promastigotes and amastigotes, however, in PSM and ASM, the antibody recognized a protein about 70 kDa. By electron microscopy, the PP2C was localized in the flagellar pocket of amastigotes. PSM and ASM induced the production of tumor necrosis factor alpha, IL-1 β , IL-12p70 and IL-10 in human macrophages, the mechanism of these process is unknown.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Leishmaniasis

La Leishmaniasis es un complejo de enfermedades tropicales desatendidas (NTDs) causadas por los parásitos protozoarios del género *Leishmania* spp. Estos afectan a las personas en las regiones más pobres del mundo. Nuevos estudios epidemiológicos de esta enfermedad revelan que existen 12 millones de personas infectadas en todo el mundo, 350 millones están en riesgo de infectarse y se presentan 2 millones de nuevos casos anuales (OMS, 2010a).

En México, la Leishmaniasis representa un serio problema de salud. Aunque la enfermedad se considera en gran parte desatendida, actualmente, se reconoce que 25 de 32 estados en México tienen al menos un caso reportado (Sánchez-Tejeda *et al.*, 2001). La Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL) representa la manifestación clínica más prevalente en México (Maroli *et al.*, 2013). Se estima que alrededor de 16 millones de personas viven en áreas en las que están en riesgo de transmisión de esta forma clínica de la enfermedad.

Datos oficiales de la Secretaría de Salud en México indican que 2,322 casos de LCL ocurrieron en el Estado de Campeche en el periodo de 1990-2014; estos representan el 12.5% de todos los casos registrados a nivel nacional. En adición, Hernández-Rivera *et al.* (2015) proporcionan una actualización de los casos en algunas aldeas de Calakmul. La incidencia y la prevalencia de la enfermedad son básicamente desconocidas o subestimadas, porque las Leishmaniasis son, en gran parte, no informadas a la Secretaría de Salud, ya que no están diagnosticadas o no se consideran enfermedades contagiosas.

1.2. *Leishmania* spp: ciclo de vida

La *Leishmania* spp. es un parásito protozoario que completa su ciclo dimórfico en dos organismos: el vector (la mosca de la arena, *Figura 1A*) y los hospederos mamíferos (desde

roedores y cánidos, hasta el ser humano, *Figura 1B*). En el vector, los parásitos permanecen como los promastigotes extracelulares móviles (*Figuras 1C y E*), mientras que en el hospedero mamífero existen como los amastigotes intracelulares aflagelados (*Figura 1D y F*) (Sacks y Kamhawi, 2001).

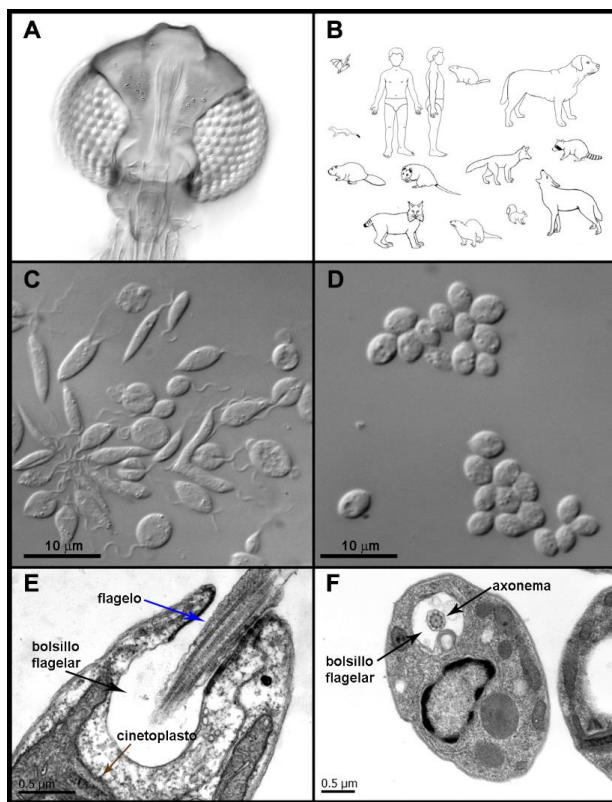


Figura 1. Los hospederos vertebrados y los mamíferos de *Leishmania* spp

A) La cabeza de *Lutzomyia shannoni*. **B)** Hospederos mamíferos, desde el humano, roedores, marsupiales, etc. **C)** Los promastigotes. Se observan las formas fusiformes del parásito y el flagelo característico, asimismo, parásitos en división. **D)** Los amastigotes de *L. mexicana*. Se observan las formas redondeadas clásicas de este estadio del parásito. Las fotos fueron tomadas mediante la técnica de Contraste Diferencial de Interferencia (DIC). **E)** Ultraestructura de los promastigotes de *L. major*. Se observa el bolsillo flagelar indicado por la flecha color negro; la flecha azul muestra el flagelo; la flecha café indica el cinetoplasto del parásito. **F)** Ultraestructura de los amastigotes de *L. mexicana*. Se observa también el bolsillo flagelar y el axonema indicado por las flechas, estructura que dará origen al flagelo. Las fotos fueron tomadas en el microscopio electrónico de transmisión (MET). Fotos tomadas en la Unidad de Investigación en Medicina Experimental y en el Departamento de Bioquímica del CINVESTAV.

En el hospedero mamífero, el estado de desarrollo del parásito es relativamente simple: el promastigote metacíclico es introducido mediante la picadura de la mosca de la arena (Sacks, 1989). Estos parásitos presentan diversos glicoconjugados en la membrana que le permiten interactuar con la membrana de los macrófagos e iniciar el proceso de fagocitosis (Lodge y Descoteaux, 2008). Los promastigotes son fagocitados, permanecen dentro de la vacuola parasitófora y, posteriormente, estos se diferencian en los amastigotes en un pH ácido donde se dividen por fisión binaria.

Después de múltiples divisiones, los amastigotes lisan a los macrófagos liberando los parásitos que pueden infectar nuevos macrófagos. Las células infectadas son ingeridas en las siguientes picaduras por las moscas de la arena (*Figura 2*) (Borghi *et al.*, 2017). En un análisis del curso temporal de la diferenciación de *Leishmania donovani* basado en la morfología, se identificaron cuatro fases: percepción de la señal sin cambio morfológico (fase I, 0-5 h), no movimiento y agregación (fase II, 5-10 h), transformación a amastigote (fase III, 10-25 h) y maduración del amastigote (fase IV, 25-120 h) (Barak *et al.*, 2005).

Los amastigotes dentro de las moscas se dividen en los promastigotes procíclicos en el intestino que, a su vez, se dividen rápidamente para entrar en un proceso de diferenciación conocido como metaciclogénesis (Murray *et al.*, 2005; Sacks, 1989). En este proceso, los promastigotes no infectivos adquieren ciertas características morfológicas y bioquímicas a nivel de la estructura del lipofosfoglicano (LPG), una molécula presente en la membrana del parásito. Una vez diferenciados, estos migran a la probóscide de la mosca comenzando así una nueva ronda de infección (Ismaeel *et al.*, 1998; McConville y Ralton, 1997).

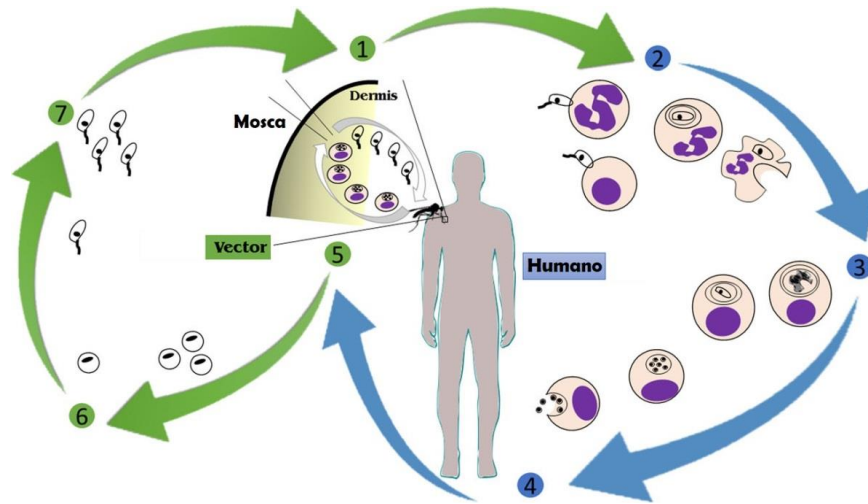


Figura 2. Ciclo de vida de la *Leishmania* spp

1) La mosca de la arena se alimenta de un hospedero infectado e inocula los promastigotes metacíclicos en la piel. 2) Los parásitos son fagocitados por los neutrófilos, quienes son los primeros en llegar al sitio de infección. 3) Los neutrófilos infectados entran en apoptosis y son fagocitados por los macrófagos. 4) Los promastigotes se transforman en amastigotes, los cuales se dividen por fisión binaria ocasionando la lisis de las células e infección de nuevas células. 5) El ciclo se completa cuando una nueva mosca ingiere células infectadas durante su alimentación. 6) En el vector, los amastigotes se transforman en los promastigotes en el intestino medio de la mosca. 7) Los parásitos proliferan y se diferencian en los promastigotes infectivos (metacíclicos) y migran a las glándulas salivales de la mosca y, de esta manera, se perpetua el ciclo. Modificada (Borghi *et al.*, 2017).

Dependiendo de la especie de parásito, los órganos afectados son diferentes ocasionando las diversas formas de la Leishmaniasis (*Tabla 1*).

Tabla 1. Cuadros clínicos de Leishmaniasis
Modificado (Chauhan *et al.*, 2017)

	Especie de <i>Leishmania</i>	Distribución Geográfica	Órgano afectado	Tipo de Leishmaniasis
Viejo mundo	<i>L. donovani</i>	África e India	Bazo, Hígado y Médula ósea	LV
	<i>Leishmania infantum/chagasi</i>	África, Asia	Bazo, Hígado y Médula ósea	LV
	<i>L. major</i>	África, Asia	Piel (Nódulos que pueden ulcerar)	LC
Nuevo mundo	<i>L. mexicana</i>	América central	Piel (Nódulos y/o úlceras)	LC
	<i>Leishmania amazonensis/Leishmania pifanoi</i>	Sur de América	Piel (Nódulos locales)	LC
	<i>Leishmania panamensis</i>	América central	Cavidad orofaríngea	LMC/LC
	<i>Leishmania braziliensis/Leishmania guyanensis</i>	Sur de América	Cavidad orofaríngea	LMC

1.3. Moléculas presentes en la membrana del parásito protozoario *Leishmania* spp

Entre las moléculas más estudiadas de *Leishmania* spp. se encuentran el LPG y la glicoproteína 63 (gp63), las cuales han sido postuladas en algunas especies de este parásito como posibles factores de virulencia. El LPG cubre la superficie del parásito y el flagelo formando un glicocálix. La estructura del LPG es diferente entre las especies de *Leishmania* y está formada, principalmente, por unidades repetidas de un disacárido y un fosfato unidos a la membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Esta molécula es muy abundante en los promastigotes en comparación con los amastigotes (Olivier *et al* 2005). Sin embargo, la gp63 se encuentra más expresada en los amastigotes que en los

promastigotes. La ausencia de LPG en los amastigotes le da relevancia al papel de la gp63 en la sobrevivencia de los amastigotes, asimismo, en la regulación de las vías de señalización de la célula hospedera, ya que esta proteasa no se ve enmascarada por el LPG (McConville *et al.*, 1995; McConville *et al.*, 1992).

Otras moléculas que se encuentran diez veces más expresadas que el LPG son los glicosilinositol fosfolípidos (GPIs), una clase de glicolípidos unidos por GPIs, cuyo pequeño tamaño los mantiene cerca de la membrana del parásito (Ferguson, 1997; McConville y Ralton, 1997). Nuestro grupo de investigación reportó que *L. major* presenta fosfatasa unidas a la membrana y la expresión proteica fue mayor en los promastigotes metacíclicos en comparación con los promastigotes procíclicos. Los datos por microscopía electrónica de transmisión de los promastigotes sugieren que la fosfatasa se localiza en el bolsillo flagelar del parásito (Aguirre-García *et al.*, 2006).

1.4. Proteínas secretadas por *Leishmania* spp

Hace algunos años, existía muy poca información sobre las proteínas secretadas por los parásitos protozoarios. Lo anterior a pesar de su papel como factores de virulencia en otros microorganismos patogénicos y en la modulación que estos ejercen en su célula hospedera.

Hasta ahora, la definición más específica del *secretoma* se refiere al agente causal de la malaria *Plasmodium falciparum*. El análisis del secretoma de este parásito describe todas las proteínas exportadas al eritrocito del hospedero mediado por una secuencia de señal del retículo endoplásmico y un elemento de exportación de *Plasmodium* (Hiller *et al.*, 2004; Van Ooij *et al.*, 2008). Para los tripanosomátidos, el término *secretoma* fue introducido por el grupo de Silverman y cols., en un enfoque proteómico para identificar una gran cantidad de proteínas extracelulares en un medio de cultivo condicionado por *L. donovani* (Silverman *et al.*, 2008).

Existen varios estudios que involucran a los tripanosomátidos que están enfocados en identificar y caracterizar factores excretados/secretados debido al potencial que

presentan para el desarrollo de vacunas y/o el desarrollo de nuevos fármacos (Corrales *et al.*, 2010). La *Leishmania* y otros patógenos intracelulares han desarrollado estrategias para invadir y persistir dentro de su célula hospedera. En algunos casos, los mecanismos implican la exportación de factores de virulencia en el citosol de esta misma célula (Silverman *et al.*, 2008). Ha pasado una década desde el primer reporte de las proteínas de secreción de *L. donovani*, el cual, mediante un marcaje isotópico estable de aminoácidos en cultivo denominado SILAC, identificaron 151 proteínas secretadas por este parásito en el medio de cultivo y pocas de ellas son secretadas mediante mecanismos clásicos (Silverman *et al.*, 2008).

En este mismo estudio, el análisis bioinformático demostró que ninguna de las proteínas fosfatasas de histidina utilizan el mecanismo clásico de secreción. Sin embargo, se encontraron diferentes proteínas con posibles funciones, entre las más importantes: proteínas que participan en el proceso de transporte vesicular; involucradas en la sobrevivencia del parásito; posibles candidatos factores de virulencia; y proteínas que participan en la transducción de señales. De entre éstas, se menciona el gen LmjF 25.0750 de *L. major*, el cual codifica para una fosfatasa serina treonina del tipo fosfoprotein fosfatasas dependiente de metales (PPM), llamada PP2C (Silverman *et al.*, 2008).

1.4.1. Exosomas

Los exosomas son organelos de 30-100 nm, los cuales son liberados por numerosas células de mamíferos, incluyendo: eritrocitos, células B, células T, células dendríticas y los macrófagos (Wang *et al.*, 2008b). Los exosomas bioactivos son liberados por células que son infectadas por virus, bacterias y por algunas células tumorales (Graner *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2003).

La liberación de los exosomas constituye un mecanismo para la secreción de las proteínas por *Leishmania* y esas vesículas permiten la comunicación con su célula hospedera (Silverman *et al.*, 2008). En otro estudio, se encontró que la metaloproteasa de 63 kDa y el factor de elongación 1 alfa (EF1- α) están contenidos en exosomas y las dos

moléculas son las responsables de la activación de las fosfatasa de tirosina de la célula hospedera, enzimas responsables de desregular vías de señalización de dicha célula (Silverman y Reiner, 2011). Otro estudio en *L. mexicana* demostró que un tipo de vesículas que son inducidas a una temperatura de 37 °C, las cuales, por tamaño, no correspondieron a los exosomas (*Figura 3*).

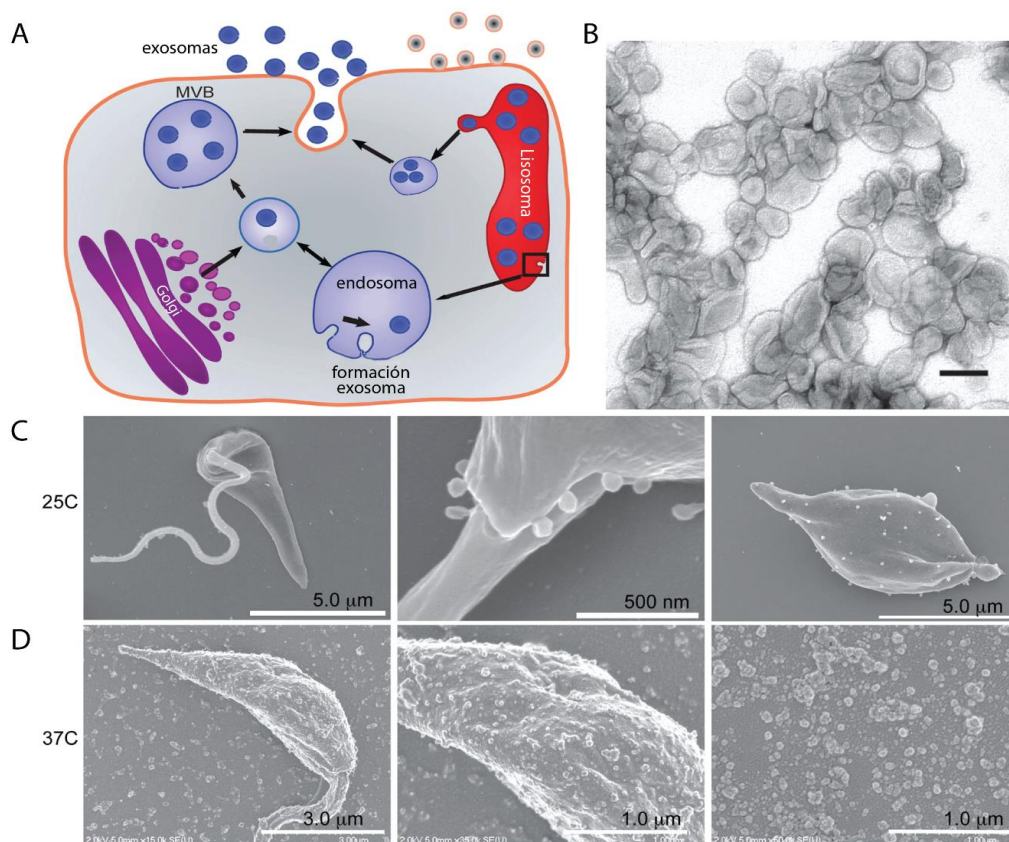


Figura 3. *Leishmania* secreta microvesículas que probablemente sean una combinación de exosomas y vesículas de la membrana plasmática

A) Un dibujo que ilustra la vía de secreción de los exosomas. **B)** Exosomas de *Leishmania* que fueron aislados en un gradiente de sucrosa. **C)** Microfotografías de los promastigotes cultivados a 25 °C; fueron tomadas en el microscopio electrónico de barrido (panel izquierdo y central). La misma muestra se analizó a 500 nm. Se observó la presencia de las vesículas en el bolsillo flagelar del parásito. Los amastigotes axénicos (panel de la derecha arriba) muestran las vesículas en el cuerpo del parásito. **D)** Microfotografías de los promastigotes incubados a 37 °C durante 4 h. Fueron tomadas en el microscopio electrónico (panel izquierdo y central) (Silverman y Reiner, 2011).

Existen otros estudios que refuerzan que *Leishmania* spp. presenta una vía de secreción no clásica. En *L. braziliensis*, mediante electroforesis de dos dimensiones, se

observó un total de 270 manchas de proteínas secretadas, de las cuales fueron identificadas 42. Los resultados mostraron que ~57% de las proteínas presentaron mecanismos de secreción no clásicos (Cuervo *et al.*, 2009).

En *L. infantum*, se encontró una diferencia en la presencia de proteínas en exovesículas de los parásitos en las fases de su crecimiento. En los parásitos, en la fase logarítmica de crecimiento, se encontraron proteínas ribosomales, lo que indica un papel importante de estas vesículas en el recambio de proteínas. Los parásitos en fase estacionaria presentaron un enriquecimiento específico de vesículas con propiedades similares a vesículas apoptóticas (Santarem *et al.*, 2007). En *L. mexicana*, se reportó que los promastigotes de este parásito secretan fosfatasa de tirosina (Escalona-Montañaño *et al.*, 2010), sin embargo, este mismo parásito secreta otras proteínas, las cuales están relacionadas con las etapas tempranas de infección (Figuera *et al.*, 2013).

En nuestro grupo de trabajo, se clonó el gen LmjF 25.0750 de *L. major* y la proteína recombinante fue purificada y caracterizada. Los resultados mostraron que la actividad enzimática de dicha proteína fue dependiente de la presencia de cationes como magnesio y manganeso; su máxima actividad enzimática se presentó a pH básico. Por otra parte, estudios de microscopía de fluorescencia y electrónica en los promastigotes demostraron que la enzima se encuentra localizada en el bolsillo flagelar y flagelo de dicho parásito. La localización de la PP2C en el flagelo de *L. major*, una estructura importante para la diferenciación en tripanosomátidos, abre otro campo de estudio para conocer el papel que pudiera desempeñar la enzima en este organelo y el papel biológico de PP2C en el parásito (Escalona-Montañaño *et al.*, 2017).

1.5. Proteínas fosfatasa: características bioquímicas y clasificación

La fosforilación y la desfosforilación de proteínas es un mecanismo implicado en la regulación de funciones celulares en muchos organismos. Está dado por proteínas cinasas y fosfatasa, las cuales actúan antagónicamente regulando los niveles de fosforilación (Anwar y Gourinath, 2016).

Las proteínas fosfatasas desfosforilan residuos fosforilados en diferentes aminoácidos como: tirosina, serina y treonina (Cohen, 2002; Wang *et al.*, 2008a). Las fosfatasas son clasificadas en tres familias basadas en la especificidad de sustrato, estructura y mecanismo catalítico: **A)** las fosfatasas que desfosforilan residuos fosforilados en tirosina son denominadas proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) y constituyen una familia caracterizada, principalmente, por la presencia de un motivo altamente conservado en su sitio catalítico denominado (I/V) HCXXGXXR (S/I), donde C es una cisteína, R una arginina y “X” puede ser cualquier aminoácido. **B)** La cisteína es esencial para la actividad catalítica (Tonks, 2003). **C)** Y las fosfatasas que se encargan de hidrolizar aminoácidos fosforilados en serina-treonina son denominadas proteínas serina-treonina fosfatasas (PST).

1.6. Proteínas serina-treonina fosfatasas (PSTs)

En estudios basados en los ensayos bioquímicos, las proteínas PST fueron inicialmente divididas en dos tipos: fosfatasas tipo 1 (PP1), encargadas de desfosforilar la subunidad β de la cinasa fosforilasa; y la fosfatasa tipo 2 (PP2), encargada de desfosforilar la subunidad alfa de la cinasa fosforilasa.

Las PP2 comprenden tres tipos de enzimas (PP2A, PP2B y PP2C), las cuales se pueden distinguir entre ellas por su requerimiento de cationes. Nuevas proteínas fosfatasas relacionadas, como PP4, PP5, PP6 y PP7, han sido caracterizadas recientemente (Wang *et al.*, 2008a). Las PSTs son las encargadas de la mayoría de los eventos de desfosforilación en los residuos de aminoácidos de serina-treonina en la célula.

Las proteínas fosfatasas dependientes de metales (PPMs) no requieren de subunidades regulatorias, como las fosfoproteínas fosfatasas (PPPs). Estas últimas necesitan ser mediadas por varias subunidades regulatorias, las cuales son importantes para la actividad enzimática, la especificidad de sustrato y la localización subcelular (Moorhead *et al.*, 2007). En ambas fosfatasas —las PPP y las PPM—, la presencia de iones es fundamental para la catálisis a través de la activación de una molécula de agua para la reacción de desfosforilación. Entre los miembros de la familia PPM, se encuentran la

proteína fosfatasa 2C y la piruvato cinasa, las cuales dependen, principalmente, de magnesio (Mg^{+2}) y manganeso (Mn^{+2}) para su actividad enzimática (Andreeva y Kutuzov, 2004; Moorhead *et al.*, 2007).

1.6.1. Proteína fosfatasa PP2C

La estructura inicial resuelta de una proteína PP2C fue: la PP2C α de humano contenía dos iones Mn^{+2} unidos y coordinados por un conjunto de residuos conservados de aspartatos (Das *et al.*, 1996). Investigaciones recientes han demostrado la unión de tres iones metálicos en estructuras de PP2Cs en bacterias y eucariotes (Pullen *et al.*, 2004; Rantanen *et al.*, 2007).

Una imagen completa de la evolución de la capacidad de unión del metal PP2C todavía no se documenta. Las PP2Cs son enzimas ubicuas entre eucariotas y existen como genes múltiples en la mayoría de los organismos, incluyendo 20 en humanos, 7 en *Saccharomyces cerevisiae* (Arino *et al.*, 2011) y una gran expansión en plantas, con 80-90 genes en *Arabidopsis thaliana* (Schweighofer *et al.*, 2004). Se sabe que las PP2C eucariotas residen en el citosol y el núcleo, y en mitocondrias aisladas (Joshi *et al.*, 2007).

1.7. Inhibidores de PSTs

En las células de mamífero, el ácido okadaico (OA) es un potente inhibidor de la proteína fosfatasa PP2A, pues la concentración inhibitoria 50 que se necesita para ejercer un efecto inhibitorio es IC50: 2 nM. Mientras que, para inhibir a la fosfatasa PP1, se necesitan concentraciones más altas de IC50: 60-200 nM. O para la inhibición de la fosfatasa PP2B, la IC50:10 mM. Sin embargo, la fosfatasa PP2C no es afectada por este inhibidor (Swingle *et al.*, 2007).

La Caliculina A es otro inhibidor de la actividad de las PSTs: inhibe a ambas fosfatasas, la PP1 y la fosfatasa PP2A, pero no inhibe a la fosfatasa PP2B o PP2C (Wera y Hemmings, 1995). La Tautomicina es un potente inhibidor de la fosfatasa PP1 a IC50: 1nM. Se requiere de 10 veces más la concentración de este inhibidor para inhibir a la

fosfatasa PP2A IC50: 10 nM. Sin embargo, a esta concentración la fosfatasa PP2B es débilmente inhibida y la actividad de la PP2C no se ve afectada con este compuesto (Rogers *et al.*, 2006).

A pesar del conocimiento generado de la participación de las proteínas serina-treonina fosfatasas en organismos eucariotas multicelulares, poco es conocido acerca de los eventos moleculares que regulan la fosforilación de proteínas en los parásitos protozoarios (Kutuzov y Andreeva, 2008). Estudios recientes han utilizado diferentes inhibidores de la actividad enzimática de la proteína para tratar de conocer el papel funcional de la enzima en la biología celular del parásito *Leishmania* spp. y la interacción con su célula hospedera (Kutuzov y Andreeva, 2008). Sin embargo, con la era de la genómica, el genoma completo de algunos microorganismos patogénicos ha sido secuenciado, lo que ha facilitado la manipulación genética de estos microorganismos y, de esta forma, se promueve el estudio de esas proteínas para determinar el papel fisiológico en el microorganismo.

El análisis del genoma de *L. major* mostró la existencia de 45 fosfatasas de la familia PPP y 15 de la familia PPM. Sin embargo, la caracterización bioquímica y función de éstas en el parásito es desconocida. Un estudio reciente en el que se analiza el fosfatoma de 15 patógenos de importancia médica y veterinaria mostró que en estos predominan las proteínas fosfatasas de serina-treonina, mientras de forma contraria, en su hospedero vertebrado, las fosfatasas que predominan son las PTPs. Cabe resaltar en este mismo estudio que el fosfatoma de *L. major* presentó 172 fosfatasas y su kinoma fue de 199 cinasas, de las cuales muy pocas han sido caracterizadas (Anwar y Gourinath, 2016).

2.1. Moléculas del parásito que inducen la producción de citocinas en los macrófagos

Nuestro grupo previamente reportó que la LPG de *L. mexicana* induce la producción de citocinas de manera diferencial en células dendríticas humanas y monocitos (Argueta-Donohué *et al.*, 2008). Adicionalmente, encontramos que LPG de *L. mexicana* activa las cinasas ERK y MAP p38 en los macrófagos e induce la producción de citocinas proinflamatorias a través de los receptores TLR-2 y TLR-4 (Rojas-Bernabé *et al.*, 2014).

Existen evidencias que demuestran que los exosomas de *Leishmania* se encuentran en el citosol de los macrófagos infectados y la incubación de los macrófagos con exosomas selectivamente induce la secreción de la citocina IL-8, pero no de TNF- α (Silverman *et al.*, 2010). En otro estudio, monocitos tratados con IFN γ y expuestos a exosomas indujeron la producción de la citocina IL-10, la cual es una potente citocina antiinflamatoria involucrada en mediar la supresión de la respuesta inmune durante la infección con *Leishmania*, sugiriendo un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

2.2. Fosfatasa que participan en el crecimiento de los parásitos

El promastigote y el amastigote de *Leishmania* spp. son morfológicamente y bioquímicamente diferentes. Dichas diferencias radican en la expresión diferencial de genes asociados con los cambios de pH y temperatura dentro de su célula hospedera. La diferenciación de la forma de amastigote es importante para la progresión de la enfermedad. El proceso que regula dicha diferenciación en *Leishmania* está poco estudiado.

Investigaciones recientes se han enfocado en estudiar la expresión heteróloga de la proteína fosfatasa llamada: tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) de humano en *L. donovani*. Se observó que esta enzima regula la diferenciación de promastigote a amastigote. En estudios realizados con ratones BALB/c (cepa susceptible a la enfermedad) infectados con los parásitos que expresan la PTP1B, se observó que la virulencia del parásito se incrementa.

Esto representa una evidencia sobre el papel que juegan las PTPs en la sobrevivencia del amastigote en el hospedero mamífero (Nascimento *et al.*, 2003).

Las evidencias experimentales sugieren que estas proteínas tirosina fosfatasa de esos protozoarios tienen un papel importante en regular sus mecanismos de diferenciación. Sin embargo, la proteína fosfatasa 2C ha sido poco estudiada en relación con el proceso de diferenciación celular y, hasta la fecha, sólo se ha descrito la presencia de la enzima PP2C en diferentes microorganismos patógenos como: *Salmonella* y *Toxoplasma gondii* (Gilbert *et al.*, 2007; Lai y Le Moual, 2005).

Los niveles de fosforilación en las proteínas de los esporozoítos de *Plasmodium* spp. son importantes en el proceso de infección. La molécula involucrada es el factor de iniciación en eucariontes llamados eIF2 α , los cuales son fosforilados por la cinasa UIS1 en la serina 59. Esta fosforilación inhibe la traducción de proteínas y, como consecuencia, mantiene la latencia del parásito. El proceso de desfosforilación en IF2 α es un mecanismo importante para que el esporozoíto cambie a merozoíto en el hígado del hospedero ocasionando la diseminación del parásito.

En células de mamífero, se encontró que esta desfosforilación es llevada a cabo por una fosfatasa llamada PP1, sin embargo, en este mismo estudio, se encontró que la fosfatasa que participa en la desfosforilación de IF2 α es de la familia PPM-PP2C, la cual es denominada UIS2. Los RNA mensajeros de fosfatasas denominados UIS1 y UIS2 fueron analizados en los esporozoítos encontrándose que están altamente expresados en este estadio del parásito (Zhang *et al.*, 2016). En el parásito *T. gondii*, se generaron parásitos *knock-out* en el gen que codifica para la proteína fosfatasa del tipo PP2C. Estos parásitos modificados genéticamente mostraron una inhibición en el crecimiento comparados con los parásitos silvestres. El crecimiento del parásito fue restablecido cuando el gen que codifica para la PP2C fue restaurado, lo que demuestra el papel crucial que esta enzima desempeña en el crecimiento del parásito (Gilbert *et al.*, 2007).

2.3. Caliculina y el ácido okadaico: inhibidores de serina-treonina fosfatasa que regulan el ciclo celular y la sobrevida

Inhibidores específicos de las proteínas serina-treonina fosfatasas son usados para estudiar el papel que desempeñan en el comportamiento y la sobrevida celular. Existen estudios que demuestran que ciertos compuestos inhiben la actividad enzimática de fosfatasa y tienen una participación importante en inhibir el crecimiento del parásito. La Caliculina y el ácido okadaico inhibieron el crecimiento *in vitro* de *P. falciparum*, parásito responsable de la malaria, por la inhibición de la fosfatasa tipo 1 en este mismo parásito (Zhang *et al.*, 2016).

Varios compuestos han sido reportados ser inhibidores de la PP2C α , los cuales están basados en un escaneo virtual y modificaciones de esteres de fosfato. Sin embargo, sólo uno de ellos se ha reportado como un inhibidor específico de la actividad enzimática de un proteína recombinante PP2C α ; este compuesto es llamado sanguinarina.

2.4. Sanguinarina

La sanguinarina se obtiene de la raíz de la planta *Sanguinarina canadiensis* (Figura 4A). En América, se le conoce con el nombre de “Chicalotl” y fue utilizada por los indios americanos como narcótico (Figura 4B). La sanguinarina presenta múltiples efectos farmacológicos incluyendo propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y es un compuesto potencial en la terapia del cáncer, ya que induce apoptosis en varias líneas tumorales (Aburai *et al.*, 2010; Hossain *et al.*, 2011).

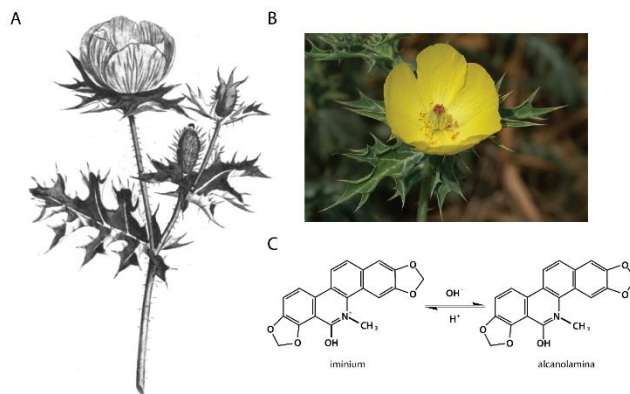


Figura 4. Estructura química de la sanguinarina

A) Planta *sanguinarina canadensis*. B) Planta conocida como Chicalotl en México. C) Forma catiónica o iminium y neutral o alcanolamina.

La sanguinarina presenta dos estructuras químicas: catiónica y aniónica. Cada una va a depender del pH en el cual se encuentra disuelta. La catiónica o iminium es una estructura que va a predominar a pH de 1 a 6. En estas condiciones, va a interaccionar con el ADN, ya que esta biomolécula tiene carga negativa (*Figura 4C*). Por otro lado, estudios recientes demostraron que la estructura aniónica o alcanolamina va a predominar a pH de 7.0 a 10. Tiene mayor afinidad por la albumina sérica bovina (BSA) y esta unión altera la conformación de la proteína (Hossain *et al.*, 2011; Maiti y Kumar, 2007).

II. HIPÓTESIS

Las proteínas fosfatasa secretadas por los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* modulan la secreción de citocinas en macrófagos humanos.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Caracterizar proteínas fosfatasa de membrana y de secreción, así como la participación de la fosfatasa PP2C en el crecimiento de *L. mexicana* y el análisis del efecto que ejerce en el macrófago.

3.2. Objetivos particulares

A. Obtener y concentrar las proteínas secretadas al medio de cultivo y analizar la viabilidad de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* después de los tiempos de secreción.

B. Caracterizar las proteínas presentes en los medios secretados: MSP y MSA.

1. Analizar la actividad de fosfatasa general y la actividad específica mediante la utilización de péptidos fosforilados en tirosina y treonina.
2. Determinar el efecto de los inhibidores específicos de proteínas tirosina fosfatasa y serina treonina fosfatasa.
3. Identificar las proteínas fosfatasas en los medios secretados de los promastigotes y los amastigotes utilizando anticuerpos α -PP2C de *L. mexicana* mediante Western Blot.

C. Localizar la proteína fosfatasa PP2C en los amastigotes de *L. mexicana* mediante microscopía electrónica de transmisión.

D. Analizar la producción de las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-12p70 e IL-10 después de incubar los macrófagos humanos con los medios secretados para los promastigotes y los amastigotes.

E. Determinar el efecto que ejerce la proteína fosfatasa PP2C mediante la utilización de la sanguinarina en:

1. El crecimiento y la viabilidad de los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* cultivados *in vitro*.
2. La actividad enzimática de los extractos de los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*.
3. El proceso de transformación de promastigote a amastigote.
4. El proceso de infección en el macrófago.

F. Generar promastigotes *knock-out* en el gen que codifica para la PP2C en los promastigotes de *L. mexicana*.

IV. JUSTIFICACIÓN

La interacción que *Leishmania* spp. tiene con su célula hospedera ocurre por medio del contacto físico célula-parásito o, de manera indirecta, a través de moléculas secretadas/excretadas que pueden liberarse en el medio extracelular o empaquetarse en vesículas extracelulares. Este parásito ha desarrollado variadas estrategias para evadir la respuesta inmune del hospedero con el objetivo de dividirse dentro de la célula hospedera y ocasionar la enfermedad.

Diversas moléculas de la superficie de los promastigotes están involucradas en la regulación de la sobrevivencia del parásito, la alteración de las vías de señalización, entre otras. Sin embargo, existen pocos reportes sobre la participación de estas moléculas secretadas y de membrana en la interacción con células de la respuesta inmune, como son los macrófagos.

Debido a lo anterior, es importante caracterizar bioquímicamente las moléculas secretadas de *Leishmania* spp y determinar su asociación con la secreción de citocinas en la célula hospedera. Asimismo, es primordial estudiar la participación de una fosfatasa mediante el uso de un inhibidor específico de su actividad enzimática; lo anterior permitirá conocer el papel que ejercen estas proteínas en la biología del parásito y en el proceso de infección en los macrófagos.

V. METODOLOGÍA

5.1. Aislamiento y cultivo de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* cepa MHOM/MX/2011 Lacandona

La cepa MHOM/MX/2011 Lacandona se aisló de una paciente mexicana que viajó a la Selva Lacandona en Chiapas, México. A su regreso, fue diagnosticada con Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL). La paciente presentaba una úlcera en la piel, a la cual se le realizó asepsia y se le administró anestesia local. Posteriormente, se tomó una biopsia del borde activo de la lesión.

Un fragmento de la biopsia se homogenizó en PBS para liberar a los amastigotes de las células infectadas. El homogeneizado resultante se inoculó vía subcutánea en el cojinete plantar de la pata trasera derecha de ratones BALB/c. Después del desarrollo de la lesión, los amastigotes se aislaron y se cultivaron como amastigotes axénicos a 33 °C en medio de cultivo *Drosophila* de Schneider (Sigma, St. Louis), pH 5,4, suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 100 U.mL⁻¹ penicilina G y 100 mg.mL⁻¹ estreptomicina (Gibco-Life Technologies), como se describió previamente (Wilkins-Rodríguez *et al.*, 2010).

Los promastigotes se cultivaron a 26 °C en medio 199, pH 7,2, suplementado con 10% de SFB, 100 U.mL⁻¹ penicilina G, 100 mg. ml⁻¹ de estreptomicina, 2 mM L-glutamina y 1% de vitaminas MEM (Sigma-Life Science). La cepa aislada fue identificada como *L. mexicana* mediante amplificación por PCR de una secuencia específica del espaciador transcrito interno (ITS) del gen ribosomal RNA (rRNA) de *L. mexicana*, como reportó anteriormente Berzunza-Cruz *et al.* (2009). La infectividad de la cepa se mantuvo por el paso regular a través de los ratones BALB /c. El cultivo de *L. mexicana* MHOM/MX/92/UADY 68 se realizó de acuerdo con lo reportado por Escalona Montaña *et al.* (2010).

5.2. Obtención de las proteínas secretadas al medio de cultivo por los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana*

Los promastigotes obtenidos del quinto día de cultivo y los amastigotes del día séptimo se lavaron dos veces en medio de cultivo modificado, 199 modificado (199MD) para promastigotes y Schneider's Drosophila Medio Modificado (SDMM) para los amastigotes. Ambos medios no contenían suero fetal bovino (SFB), fosfatos ni L-tirosina.

Las pastillas que contenían los parásitos se resuspendieron en 13 mL con sus respectivos medios de cultivo. Se separó una alícuota de parásitos de 1 mL y, posteriormente, se realizó una dilución de la cual se colocó una alícuota de 10 μ L en la cámara de Neubauer para el conteo. Los promastigotes se sembraron en una relación de 50×10^6 parásitos por mL y se incubaron a 26 °C durante 7 h; y para los amastigotes 0.50×10^6 en 0.5 mL a 33 °C durante 1 h. Después, los parásitos se centrifugaron a $2,000 \times g$ durante 10 min para obtener el sobrenadante.

Las pastillas de los parásitos se utilizaron para analizar su viabilidad y para los posteriores ensayos de Western Blot. Los sobrenadantes se centrifugaron nuevamente a $3,500 \times g$ durante 30 min, se concentraron 10 veces mediante un sistema de ultrafiltración amicon (millipore) utilizando una membrana de 10 kDa de tamaño de poro y se almacenaron a -20 °C. El sobrenadante que contiene las moléculas secretadas por los promastigotes fue denominado (MSP) y el medio que contiene las moléculas secretadas por amastigotes fue denominado (MSA). Como control negativo de los experimentos realizados, se utilizaron los medios de cultivo de ambas fases de crecimiento de los parásitos.

5.3. Viabilidad de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana*

Después de los ensayos de secreción, las pastillas de los parásitos se resuspendieron en 1 mL de PBS, se tomaron 20 μ L y se adicionó 20 μ L de eritrosina B; se completó a 100 μ L con PBS. Se realizó otra dilución 1:20, de la cual se tomaron 10 μ L para el conteo en la

cámara de Neubauer. Los parásitos que estaban teñidos de rosa se contaron como muertos; con base en esto, se calculó el porcentaje de viabilidad de los parásitos.

5.4. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Las muestras —MSP, MSA y los extractos totales— se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). En una placa de 96 pozos, se realizó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) con las concentraciones de 0 a 15 μg más el amortiguador de lisis de los parásitos hasta completar un volumen de 100 μL .

En otros pozos, se añadieron por separado 100 μL de MSP, 100 μL de MSA y 5 μL de los extractos totales y las fracciones más el amortiguador de lisis. Finalmente, se añadieron 40 μL de reactivo de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a la curva estándar y a las muestras. La placa se leyó a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Biotek®, μQuant , Winooski, VT, EUA) con un programa KC4. Todo lo anterior se realizó por duplicado.

5.5. Determinación de la actividad enzimática de fosfatasa en los MSP y MSA

La actividad enzimática se determinó siguiendo el método de Dissing (Dissing *et al.*, 1979) con algunas modificaciones. Se colocaron 1 μg de proteína de MSP ó 2 μg de proteína de MSA en una placa de 96 pozos. Se adicionó el amortiguador acetato de sodio 0.2 M y 0.1M del sustrato de fosfatasa *p*-NPP en un volumen final de 100 μL . La reacción se incubó por 1 h a 37 °C y se detuvo con 20 μL de hidróxido de sodio 2 N. Se analizó en un espectrofotómetro (Biotek®, μQuant) a una longitud de onda de 405 nm.

5.6. Determinación de la actividad específica de PTP y PST en los sobrenadantes secretados por los promastigotes y los amastigotes

En los medios secretados MSP y MSA, se analizaron las actividades enzimáticas utilizando el kit de “Ser/Thr” o “Tyrosine Phosphatase Assay System” (Promega). Como sustratos,

éste contiene péptidos específicos con un sitio de fosforilación en tirosina (END (pY) INASL) y en treonina (RRA (pT) VA), respectivamente. Se colocó 1 µg de proteína de MSP y MSA en una placa de 96 pozos con un amortiguador de acetato a pH 5. La curva patrón se realizó utilizando un estándar de fosfatos a 1 mM, el cual se diluyó para obtener diferentes concentraciones (50, 100, 200, 500 y 1000 pmol). A las muestras se les adicionó 50 µM del sustrato en un volumen total de 100 µL. La reacción se detuvo con la adición de 50 µL de una mezcla de dos reactivos “Dye/additive” y la absorbancia se registró en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 630 nm.

5.7. Efecto de inhibidores específicos de PTP y PST sobre la actividad de MSP y MSA

La actividad enzimática de fosfatasa de los MSP y MSA se realizó utilizando 1 µg de ambas muestras en presencia de acetato de sodio 0.2 M a pH 5. Los inhibidores de la actividad de PTP (ortovanadato de sodio y molibdato de amonio a 200 µM y tungstato de sodio a 100 µM), inhibidores de Ser/Thr fosfatasa (ácido okadaico a 1 µM y trifluoperazina a 100 µM) y sanguinarina a 20 µM, el inhibidor específico de la fosfatasa tipo PP2C, fueron adicionados a la reacción por separado. Seguido, se agregaron 10 µL del sustrato de fosfatasa *p*-NPP 0.1 M a cada condición. La reacción se incubó por 1 h a 37 °C y se detuvo con 20 µL de hidróxido de sodio 2 N para analizarse en un espectrofotómetro (Biotek®, µQuant) a una longitud de onda de 405 nm.

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

Las pastillas de los parásitos obtenidas después de los tiempos de secreción fueron resuspendidas en amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.4 estéril y un cóctel de inhibidores de proteasas compuesto por: leupeptina 0.002 µg/mL, aprotinina 0.01 µg/mL y benzamidina 1 mM). Las pastillas resuspendidas se lisaron por separado utilizando un sonicador (Sonics, Vibracell™ Newtown, CT, EUA) por un ciclo de 1 min a 4 °C y una amplitud de 30%. La lisis de los parásitos se verificó al microscopio. Posteriormente, se

tomó una alícuota que representó los extractos totales de los promastigotes y los amastigotes (ET); el resto se centrifugó a 18,000×g 10 min y se obtuvieron dos fracciones más: la fracción citosólica (FC) y la fracción membranal (FM). Los extractos totales y las fracciones fueron almacenados a -70 °C hasta su uso.

5.9. Identificación de las proteínas fosfatasas PP2C en los MSP y MSA, así como en los extractos totales, las fracciones citosólicas y las fracciones membranales de los promastigotes y los amastigotes

Para la identificación de la PP2C secretada en los MSP y MSA, las muestras fueron precipitadas con acetona en una proporción 1:10 durante 24 h. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron, la acetona fue retirada de las muestras y éstas se dejaron secar a temperatura ambiente. Las muestras secas se resuspendieron en agua estéril y se cuantificó la proteína. Los extractos totales de los promastigotes y los amastigotes se ajustaron a 10 µg de proteína.

Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10 %, se aplicó un voltaje de 70 V por 30 min y, después, a 120 V hasta finalizar. Transcurrido el tiempo, el gel fue equilibrado en un amortiguador de transferencia por 10 min y las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF Immobilon-P, (Millipore) previamente activada en metanol por 3 min y lavada con agua desionizada tres veces cada 5 min para después equilibrarla en amortiguador de transferencia. La membrana PVDF fue colocada en una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad Laboratories) a 20 V durante 45 min. La membrana fue bloqueada con leche semidescremada (Bio-Rad Laboratories) al 5% en TBST 1X durante una hora.

Posteriormente, la membrana fue lavada con solución amortiguadora de TBST 1X seis veces cada 10 min; después, se incubó con el anticuerpo primario α -PP2C policlonal de *L. mexicana* en una dilución (1:1000) en agitación constante a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, la membrana fue lavada con TBST 1X cada 10 min durante 1 h. Seguido, fue incubada con el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG (Cell Signaling, Danvers MA, USA)

a una dilución (1:5000) en 5% de leche durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, la membrana se lavó cada 10 min durante 2 h con TBST 1X. La membrana fue incubada usando un sustrato quimioluminiscente (Millipore) y fue expuesta a películas para rayos X (Kodak BioMax, MR).

5.10. Inmunolocalización de la proteína fosfatasa PP2C por inmune electromicroscopía (IEM)

La detección de la PP2C en el amastigote de *L. mexicana* fue realizado por microscopía electrónica como describe Gómez de León *et al.* (2014). Los amastigotes fueron lavados con PBS y fijados con una mezcla de 4% de paraformaldehído y 0.1% glutaraldehído en PBS por 1 h a temperatura ambiente. Una vez lavados, los amastigotes fueron deshidratados gradualmente en etanol y luego embebidos en resina LR (London Resin, Polysciences, Inc. USA).

Los amastigotes en resina se depositaron en moldes de plástico y se polimerizaron durante la noche bajo luz ultravioleta a 4 °C. Los bloques se utilizaron para obtener secciones delgadas en un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert Jung, Austria) y luego fueron montadas en rejillas de níquel cubiertas con Formvar. El marcaje con inmuno oro se realizó por flotación de las secciones montadas con gotas de las respectivas soluciones; el marcaje inespecífico se redujo por incubación con 1% de leche descremada y PBS-T (PBS y 0.05% Tween-20) durante 30 min. Las rejillas con las secciones se incubaron con el anticuerpo contra el PP2C de *L. major* en una dilución 1:10 en PBS-MT durante 1 h a temperatura ambiente.

Las rejillas se lavaron con PBS-T y luego se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo, anticuerpo acoplado a partículas de oro de 10 nm durante 2 h a temperatura ambiente (Zymed, Thermo Scientific, PA, EE.UU) a una dilución 1:40 en PBS-T. Después de lavados con PBS y agua destilada, las secciones se contrastaron con 2% de acetato de uranilo y una solución saturada de citrato de plomo para posteriormente ser examinadas con un microscopio electrónico de transmisión (TEM, JEOL 1400 ×, JEOL

Ltd., Japón). Como control negativo, las secciones se incubaron con suero de conejo pre-inmune diluido en PBS-T y, luego, con el anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro. La identificación de las estructuras subcelulares positivas para PP2C se realizó utilizando secciones delgadas de los parásitos que fueron procesados para preservar la ultraestructura, según lo reportado por Gómez de León *et al.* (2014).

En resumen, los amastigotes se fijaron durante 1 h en 2.5% de glutaraldehído. Después de enjuagar en PBS, los parásitos se fijaron durante 1 h en 1% de OsO₄ a 4 °C. Seguido, se deshidrató gradualmente en etanol y, para finalizar, fueron embebidos en la resina de Spurr. Secciones delgadas se obtuvieron con un ultramicrotomo Ultracut E y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las rejillas de cobre con las secciones se examinaron en El TEM a 80 keV. Se obtuvieron imágenes digitales y procesadas con el software Adobe Photoshop.

5.11. Purificación de monocitos de sangre periférica humana

A partir de sangre periférica humana de sujetos sanos, se obtuvieron paquetes celulares o “buffy coats” del banco de sangre del Hospital General de México. Las células mononucleares se separaron de la sangre total utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque, centrifugando a 850×g por 20 min a 20 °C. De las fases obtenidas, se separó la interface densa (mononucleares) por aspiración y se colocó en un tubo limpio. Las células se lavaron una vez con PBS 1X y se centrifugaron a 300×g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó y se resuspendió en solución lítica (NH₄ Cl 0.1 M, KHCO₃ 1 M, Na₂ EDTA 0.1 M) para lisar los eritrocitos.

Posteriormente, se agregó PBS frío para lavar y el tubo se centrifugó a 300×g a 4 °C durante 10 min. El paquete celular se resuspendió en plasma y se centrifugó a 130×g por 10 min a 20 °C para eliminar las plaquetas. Se retiró el sobrenadante y, para lavar las células, el paquete celular se resuspendió en PBS 1X. Las células se contaron y el volumen restante se centrifugó a 300×g durante 10 min a 4 °C. Los monocitos se separaron mediante la utilización del KIT MACS (Miltenyi Biotec Inc., USA) y la separación celular se realizó

como lo indica el fabricante con algunas modificaciones: El paquete celular se resuspendió en 20 μ L de perlas CD14; la solución se mezcló y se incubó durante 15 min a 4 °C. Transcurrido el tiempo, se adicionó 1 ó 2 mL de PBS 1X y las células marcadas se centrifugaron a 300 \times g por 10 min a 4 °C.

Después, la pastilla celular se resuspendió en 3 mL de PBS 1X y se procedió a la separación magnética por selección positiva. La columna (LS) se colocó en el separador MACS, se lavó con 3x3 mL de PBS y la suspensión celular se adicionó a la columna; las células CD14⁺ quedaron adheridas a ésta. Posteriormente, la columna fue retirada del magneto y fue lavada con PBS, las células se colectaron y se centrifugaron a 300 \times g durante 10 min a 4 °C. La pastilla celular que se obtuvo se resuspendió en medio RPMI-1640 (GIBCO) estéril, las células se contaron en una cámara de Neubauer, posteriormente, se colocó un millón de células por mililitro en cajas de baja adherencia (Costar). Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 5 días. La viabilidad celular se evaluó mediante azul de tripano.

5.12. Producción de citocinas en los macrófagos incubados con los MSP y MSA

Un total de 1x10⁶ macrófagos obtenidos de la purificación se estimularon con 1 μ g/mL de sobrenadante secretado por los promastigotes y los amastigotes de manera independiente. Como control positivo, las células se incubaron con 10 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) durante 24 h. Transcurrido el tiempo, se cuantificó la producción de las citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-12p70, como se indica en la sección siguiente.

5.13. Inmunoensayo enzimático estándar sándwich (ELISA)

Las concentraciones de citocinas se determinaron de acuerdo con BD-Pharmlingen, como se indica a continuación. Para este ensayo, se utilizaron placas de 96 pozos (Costar) de fondo plano tratadas para ELISA y el anticuerpo de captura se colocó en la placa. Previamente, cada citocina se diluyó en un regulador de unión (regulador de fosfato dibásico de sodio 0.1M a pH 9.0 (Na₂HPO₄) o PBS pH 7.4 según sea el caso para cada citocina).

El volumen se calculó de acuerdo con la citocina a determinar, por lo que se colocaron 50 μL de cada stock de citocinas por pozo, posteriormente, la caja se tapó y se dejó a 4 °C por un mínimo de 10 h. Después, la placa se lavó en un lavador de ELISA con una solución compuesta por PBS y 0.01% de tween 80 y se bloqueó con 200 μL por pozo con la solución bloqueadora (NaOH 0.1 N, caseína y PBS pH 7.4) a temperatura ambiente durante 30 min.

La placa se lavó y se colocaron 100 μL de cada una de las concentraciones de la curva estándar y de las muestras; se dejó toda una noche a 4 °C. Al día siguiente, se colocaron 100 μL por pozo del anticuerpo de detección —según la citocina— y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó y se agregó estreptavidina fosfatasa alcalina (GIBCO BRL) y se incubó durante 30 min. Después, la placa se lavó y se colocó la solución reveladora compuesta por regulador de sustrato y *p*-NPP, se agregaron 100 μL y se dejó interaccionar protegido de la luz de 15 a 60 min a temperatura ambiente. La placa se leyó por 1 h en intervalos de 5 min, aproximadamente, en un espectrofotómetro (Biotek®, Quant) a 405 nm con la ayuda de un programa KC4 para analizar los datos que proporcionan las concentraciones de las citocinas en las muestras. Finalmente, las concentraciones de cada citocina se expresaron en pg/mL y se graficaron en barras. Los resultados se expresan como la media del error estándar de al menos tres experimentos realizados por separado.

5.13.1. Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media \pm SEM (Error estándar de la media). Los resultados de las concentraciones de las citocinas se analizaron mediante la prueba de U Mann-Whitney. Se consideraron dos valores para las diferencias significativas: cuando $p < 0,05$ y $p < 0,001$.

5.14. Parásito *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379

La cepa *L. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) fue donada por el Dr. Paul Bates (Universidad de Lancaster, Lancaster, Inglaterra). La cepa se mantuvo inoculando 10×10^6 promastigotes en el cojinete plantar de los ratones de la cepa BALB/c. Las lesiones aparecieron un mes después de la inoculación, posteriormente, los parásitos fueron aislados y se sembraron en medios de cultivo específicos. La cepa se inoculó nuevamente en ratón para mantener la virulencia del parásito. El cultivo axénico de los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379 se realizó de la misma forma como se menciona para MHOM/MX/2011 Lacandona.

5.15. Preparación del compuesto sanguinarina

La sanguinarina (Sigma-Life Science) se disolvió en metanol, por lo que quedó a una concentración de 132 μM . Posteriormente, el compuesto se diluyó en medio de cultivo de los parásitos quedando a una concentración de 13,200 nM. La sanguinarina diluida se esterilizó mediante filtración y se realizaron alícuotas, las cuales se guardaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Este compuesto se utilizó en la actividad enzimática de la PP2C recombinante de *L. major* (Escalona-Montaña *et al.*, 2017).

5.16. Cultivo de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379 en presencia de la sanguinarina

Una vez que los amastigotes se transformaron en promastigotes, se realizó el primer pase en el cual se colocaron las concentraciones de 0.040, 0.080, 0.10 y 0.120 μM de la sanguinarina, respectivamente. También se realizó un control sin inhibidor durante 5 días de cultivo, el cual fue monitoreado mediante el conteo celular diariamente en presencia de la Eritrosina B; este último es un colorante que nos permite monitorear la viabilidad del parásito (ver *Sección 5.4*).

Después del primer pase, en el cultivo se colocaron los amastigotes con las concentraciones de 1, 2.5 y 5 μM de sanguinarina, respectivamente, durante 6 días de

cultivo. El crecimiento de los parásitos fue monitoreado mediante el conteo celular diariamente en presencia de la Eritrosina B.

5.17. Participación de la fosfatasa PP2C en la morfología de los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379

Los promastigotes y los amastigotes —previamente incubados con la sanguinarina a las concentraciones antes mencionadas— se observaron al microscopio óptico utilizando contraste diferencial de fase. Para esto, los parásitos se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos tres veces. Posteriormente, se incubaron con paraformaldehído y se observaron en el microscopio de luz.

Para saber si los parásitos tenían un daño a nivel de ultraestructura, se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión. Durante 1 h, se fijaron en glutaraldehído al 2,5% y luego se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos. Posteriormente, se fijaron durante 1 h en 1% de OsO₄ a 4 °C. Los parásitos se enjuagaron y se deshidrataron gradualmente en etanol y se incrustaron a través de incubaciones graduales en la concentración creciente de la resina de Spurr

Una vez polimerizados a 60 °C, se obtuvieron secciones delgadas de los bloques con ultramicrotomo Ultracut E y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las rejillas de cobre con las secciones se examinaron en un JEM-1400EX a 80 keV. Las imágenes digitales se obtuvieron y procesaron con el software Adobe Photoshop (EE.UU.).

5.18. Obtención de los extractos totales y análisis de la actividad enzimática

Los parásitos del día tres de cultivo —en el caso de los promastigotes— y del día cinco —en el caso de los amastigotes— con las diferentes concentraciones de la sanguinarina se cosecharon por centrifugación a 2000×g por 10 min. Después, se desechó el sobrenadante y los parásitos se lavaron tres veces con PBS 1X.

Las pastillas que contenían a los parásitos se resuspendieron en amortiguador de lisis frío (Imidazole pH 7.2, leupeptina 2 µg/mL, aprotinina 10 µg/mL, benzamidina 2 mM) y se sonicaron. Los extractos obtenidos se utilizaron para cuantificar la proteína por el método de Bradford y ésta se ajustó a 10 µg de proteína en cada condición para realizar la actividad enzimática (descrita en la *Sección 5.5*).

5.19. Obtención de las células de médula ósea de ratón y diferenciación a macrófagos

Los ratones BALB/c —hembras de 6 a 8 semanas de edad— se sacrificaron por dislocación cervical. Se retiró la piel que cubre las extremidades (fémur y tibia) con unas pinzas y tijeras de disección, y fue colocada en una caja bacteriológica en presencia de PBS suplementado con 25 µg de gentamicina. Se retiró la mayor parte del músculo con la ayuda de un bisturí y unas tijeras, y el tejido restante que estaba adherido al hueso se retiró con una gasa estéril.

Los huesos libres de tejido muscular y limpios se sumergieron en etanol al 70% durante 3 min, posteriormente, se colocaron en una caja Petri donde se lavaron con PBS. En la campana de flujo laminar, se cortaron la epífisis de cada hueso y se expulsó la médula ósea en un tubo de 50 mL mediante inyecciones sucesivas de PBS utilizando una jeringa de 10 mL acoplada a una aguja de 25G. La suspensión de células que se obtuvieron se centrifugó a 300 g durante 10 min a temperatura ambiente. Después del lavado con PBS, las células se contaron en una cámara de Neubauer excluyendo a las células muertas mediante azul tripán. Se obtuvieron 50×10^6 células.

La diferenciación de los macrófagos a partir de los precursores presentes en la médula ósea de ratón se realizó mediante el siguiente protocolo. El medio utilizado fue DMEM-F12 suplementado con 100 U/ mL de penicilina, 100 µg de estreptomina, 2 mM de L-glutamina, 50 µM de 2-mercaptoetanol y 10% de suero fetal bovino, el cual fue descomplementado por calor. En el día 0 de cultivo, se sembraron 5×10^6 células por cada caja Petri en 10 mL de medio de cultivo, mismo que fue suplementado con GM-SCF que

proviene de una línea celular de fibroblastos L-929. Las cajas fueron mantenidas en una incubadora para cultivo celular a 37 °C y 5% CO₂. En el día 2 de cultivo, se realizó un cambio de medio; éste consistió en retirar de la caja la mitad del volumen y, después, adicionar 10 mL de medio fresco con GM-SCF. Los macrófagos se cosecharon en el día 7 de cultivo.

5.20. Infección de los macrófagos con los promastigotes y los amastigotes que fueron incubados con la sanguinarina

Los macrófagos del día 7 de cultivo se despegaron utilizando una solución de PBS y 5 mM de EDTA. Seguido, se lavaron con PBS y se contaron en presencia de azul tripano. Las células se sembraron en cubreobjetos redondos estériles en una densidad de 0.1×10^6 células en 100 µL de medio de cultivo. Los cubreobjetos previamente se colocaron en una caja de 24 pozos estéril. Los macrófagos se dejaron adherir durante 2 h a 37 °C en la incubadora y se les adicionó 400 µL de medio de cultivo DMEM-F12 con 10% de SFB; se incubaron nuevamente durante 24 h.

Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y se le adicionó medio nuevo. Posteriormente, las células se infectaron en una relación de 5 parásitos por cada célula (5:1). Los promastigotes fueron previamente incubados con 0.080 µM durante 2 h a 26 °C, mientras que los amastigotes fueron incubados con 2.5 µM durante 2 h a 33 °C. Las células infectadas se incubaron a 33 °C con 5% de CO₂ durante 24 h. Al día siguiente, se sacaron los cubreobjetos, se lavaron tres veces con PBS y se dejaron secar. Después, se fijaron con metanol absoluto 10 min. Las células se tiñeron durante 15 min con el colorante de Giemsa diluido 1:20 con agua destilada.

Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de colorante, se dejaron secar y se montaron en portaobjetos utilizando resina sintética para observarse en un microscopio de luz y fueron fotografiadas utilizando el software AxioVision. Para contar el número de células infectadas y los amastigotes intracelulares, se fotografiaron cinco campos al azar de cada cubreobjetos y el número de células infectadas

se contó utilizando el software Image J. Los datos se expresaron como el porcentaje de células infectadas.

5.21. Ensayo de transformación de los promastigotes a los amastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379

Los parásitos incubados con 0.080 μM de sanguinarina por tres días de cultivo se lavaron con PBS y se contaron en una cámara de Neubauer; se ajustó a una densidad de 0.5×10^6 por condición y se sembraron en medio Schenider pH 5.4 con 20% de suero fetal bovino a 33 °C. Al día siguiente, se realizó el conteo para determinar el número de parásitos transformados.

5.22. Análisis de la presencia de la PP2C en los extractos de parásitos mediante Western Blot

Para este análisis, se utilizaron 10 μg de proteína de los extractos de los parásitos promastigotes y los amastigotes previamente incubados con la sanguinarina. Éstas fueron separadas en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de Immobilon P a voltaje constante utilizando un aparato para transferencia de proteínas en un sistema semi-seco. Después de la transferencia la membrana, se bloqueó con 3% de albumina sérica bovina (BSA) en TBST (Tris- buffer salino Tween, compuesto por 10 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M de NaCl y 0.05 % de Tween 20) por 1 h a temperatura ambiente.

Las membranas se lavaron en agitación con TBST cada 10 min durante 1 h y se incubaron toda la noche a 4°C y en agitación con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal anti PP2C de *L. mexicana* hecho en conejo a una dilución 1:5000 y un anticuerpo anti-tubulina hecho en ratón (Invitrogene) a una dilución 1:1000 en 5% de leche en TBST. Después de la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron tres veces durante 10 min en TBST para eliminar el anticuerpo no unido y, posteriormente, se incubaron con los anticuerpos secundarios: anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (Cell Signaling Technology, dilución

1:1000 en 1% de BSA en TBST) y un anticuerpo anti IgG de ratón peroxidado de la misma casa comercial, a una dilución 1:5000 en las condiciones antes mencionadas. Seguido, las membranas se lavaron durante 1 h con TBST cada 10 min y, finalmente, se revelaron mediante quimioluminiscencia.

5.23. Análisis bioinformático para conocer la región 5' y 3'-UTR de la PP2C de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379

La información del gen que codifica para la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* se obtuvo de la siguiente base de datos: http://tritrypdb.org/tritrypdb/Leishmania_mexicana_MHOM/GT/2001/U1103. Ésta nos proporcionó la existencia de 15 genes que codifican para proteínas fosfatasas PP2C. El gen de estudio se localiza en el cromosoma 25 y se encuentra con la siguiente nomenclatura: LmxM.250750.

La longitud de la secuencia es de 1,221 pares de bases (pb). Los genes que flanquean al gen en estudio en el extremo 5' es el LmxM 25.0740, el cual codifica para una proteína putativa de reparación del ADN, mientras que para la región 3' es 25: ncRNA: Rfamsca; se localizaron las regiones 3' y 5'-UTR's. Una vez ubicadas ambas regiones flanqueantes, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar un fragmento de 594 pb de la región 3'-UTR y de 569 pb de la región 5'-UTR. Para la generación de la construcción con el gen de resistencia a puromicina, la cual fue utilizada para el *knock-out* sencillo, se adicionaron a los oligonucleótidos los sitios de restricción *Xba*I y *Eco*RI para la región 5'-UTR (PP2C-5-for-*Xba*I y PP2C-5-rev-*Eco*RI y para la región 3'-UTR (PP2C-3-for-*Sac*I y PP2C-3-rev-*Xho*I) (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de los oligoneucleótidos para ampliar las regiones 5' y 3'-UTRs.
 Secuencias diseñadas para amplificar 569 pb de la región 5' y 594 pb de la región 3'-UTR del gen LmxM 25.0750. En negritas, se muestra el sitio de corte de las enzimas de restricción.

Nombre de la secuencia	Secuencia 5' a 3'
PP2C- 5- for- <i>Xba</i> I	ATCTAGATTTCTGCGGCTCCTCCATCC
PP2C- 5- rev- <i>Eco</i> RI	AGAATTCCTTTGCGAGTGGTACAACCTGCT
PP2C-3-for- <i>Sac</i> I	AGAGCTCGTGTCGTGTGCTCT
PP2C- 3- rev- <i>Xho</i> I	ACTCGAGTCTCTGCTCTTGTCTTCGCC
PP2C- 5- for- <i>Cl</i> aI	AATCGATTTTCTGCGGCTCCTCCATCC
PP2C- 5- for- <i>Spe</i> I	AAGTCTTTGCGAGTGGTACAACCTGCT

Para la generación de la segunda construcción, la cual contiene un gen de resistencia a higromicina que se empleó en el *knock-out* doble, se utilizó la región 3'-UTR generada en la construcción de puromicina; sin embargo, la región 5'-UTR fue amplificada con los oligonucleótidos PP2C-5-for-*Xba*I y PP2C-5-rev-*Spe*I (Tabla 2).

5.24. Extracción del DNA genómico de los promastigotes de *L. mexicana*

De una caja de cultivo con 10 ml de medio de cultivo de los parásitos, se obtuvieron 300×10^6 de los promastigotes en fase logarítmica. Los parásitos se centrifugaron tres veces en presencia de una solución amortiguadora de fosfatos. La pastilla se resuspendió en una solución amortiguadora de lisis, la cual estaba constituida por SSC 1x (NaCl 3 M y citrato de sodio 0.6 M) 5 mL de TNE pH 8.0 (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, y NaCl 15 mM), Sarcosyl 0.5% y 100 µg de proteinasa K. Para la extracción del DNA de estos parásitos, se utilizó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción (24:24:1), respectivamente.

Las pastillas de los parásitos en presencia del amortiguador fueron mezcladas utilizando un vórtex y, después, se colocaron a una temperatura de 55 °C durante 2 h. Finalizado el tiempo de incubación, se adicionaron 0.5 volúmenes de fenol y 0.5 volúmenes

de cloroformo, posteriormente, la suspensión celular se centrifugó a 2,000×g durante 10 min a 4 °C.

La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C toda la noche. Al día siguiente, el tubo se centrifugó a 6,000×g durante 15 min a 4 °C. La pastilla resultante se lavó dos veces con etanol al 70% y, la segunda, con etanol absoluto. El DNA obtenido se resuspendió en 300 µL de Tris-EDTA p H 7.8 (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0.2 m M). La calidad del DNA genómico extraído se corrió en una electroforesis en geles de agarosa al 1% con amortiguador de TBE 1X.

5.25. Construcción de vectores para *knock-out*

Las dos copias del gen de la PP2C fueron reemplazadas por dos genes de resistencia a puromicina (*pac*) e higromicina (*hyg*) mediante recombinación homóloga siguiendo el protocolo reportado por Martínez-Calvillo *et al.* (2005). Se generaron vectores en los que los genes de los marcadores de selección quedaron flanqueados por las regiones intergénicas 5' y 3' de la PP2C. Las regiones intergénicas se generaron por PCR y su posterior clonación en el vector pGEMT de los fragmentos 5'-UTR y 3'-UTR de la PP2C y los genes *pac* e *hyg*.

Los insertos se mandaron a secuenciar para la verificación de su identidad en la Unidad de Secuenciación del Instituto Nacional de Biotecnología de la UNAM. Las regiones 5'-UTR, el gen *pac* o *hyg* y la región 3'-UTR fueron ligados y clonados en el vector pBluescript. Las construcciones resultantes fueron utilizadas para transfectar los promastigotes de *L. mexicana*.

5.26. Transfección de los promastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379

Los parásitos 1×10^8 promastigotes de *L. mexicana* fueron lavados con PBS-G y centrifugados por 12 min a 4,000 rpm a 4 °C 2X. En el último lavado, la pastilla fue

resuspendida en 10 mL de amortiguador Cytomix (Hepes 25 mM, KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, K₂HPO₄ 10 mM, EDTA 2 mM y NaCl₂ 5 mM); el homogenado fue centrifugado y la pastilla se resuspendió en 400 µL del mismo amortiguador.

Las células se colocaron en una celda de electroporación previamente fría. Posteriormente, se adicionaron 7 µg de DNA y se dejaron 10 min más en frío. Se utilizó el electroporador BTX, se dio una carga eléctrica de 1,600 V, 25 ohms y 50 µF. Las celdas fueron colocadas en hielo inmediatamente durante 10 min, posteriormente, se transfirieron en cajas de 75 cm³ con 10 mL de medio 199, 10% de SFB y 12.5 µM de la puromicina (*knock-out* sencillo) ó 12.5 µM de la puromicina y 16 µg/mL de higromicina para el *knock-out* doble.

Los cultivos se mantuvieron en observación y, en el siguiente pase, se adicionó la mitad de la concentración de los antibióticos restantes. Una vez restablecidos los cultivos, se adicionó la concentración final de cada uno de los antibióticos: puromicina e higromicina 25 µM y 32 µg/mL, respectivamente. Como control de la transfección, se utilizaron 100 millones de células de *L. mexicana* no transfectadas (electroporadas sin ningún plásmido); éstas se cultivaron en el medio de cultivo y a la concentración de puromicina anteriormente mencionada.

5.27. Identificación de la PP2C en los *knock-out* de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379

Para este análisis, se utilizaron 10 µg de proteína de los extractos de los parásitos *knock-out* de *L. mexicana*. Las proteínas fueron separadas en condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de Inmobilon de baja fluorescencia y voltaje constante utilizando un sistema semi-seco para la transferencia de proteínas.

Después de este proceso, la membrana se bloqueó con 10 mL de una solución bloqueadora comercial (Odyssey) por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se

lavaron en agitación con PBS más 0.1% de Tween 20 (PBS-T) cada 5 min durante 20 min y se incubaron toda la noche a 4 °C y en agitación con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal anti PP2C de *L. mexicana* hecho en conejo a una dilución 1:5000 y un anticuerpo anti-tubulina hecho en ratón (Invitrogene) a una dilución 1:1000 en solución bloqueadora comercial.

Al día siguiente, los anticuerpos se retiraron y las membranas se lavaron cuatro veces durante 5 min en la solución de PBS-T para eliminar el anticuerpo no unido y, seguido, se incubaron con los anticuerpos secundarios: IRDye 800 cw goat anti-rabbit IgG (H+L), (Licor Inc, dilución 1:20000 en solución bloqueadora comercial) y un anticuerpo IRDye 800 cw goat anti-mouse IgG (H+L), durante 1 h a temperatura ambiente protegidos de la luz. Después, las membranas se lavaron durante 30 min con PBS-T cada 5 min y, finalmente, las bandas se analizaron en el sistema de imágenes de infrarrojo Odyssey (Licor, Licoln LE).

VI. RESULTADOS

6.1. Fosfatasas secretadas por los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* cepas: MHOM/MX/92/UADY 68 y MHOM/MX/2011 Lacandona

Con la finalidad de conocer el tiempo óptimo de secreción de las proteínas con actividad de fosfatasa de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/92/UADY 68, se analizó la actividad enzimática de fosfatasa en MSP y MSA a diferentes tiempos.

La *Figura 5A* muestra los resultados de la actividad enzimática de las proteínas secretadas por los promastigotes desde 1 h; la actividad enzimática se incrementa conforme el tiempo de secreción aumenta. El tiempo óptimo de secreción se presentó a las 7 h de incubación. Sin embargo, las proteínas fosfatasas secretadas por los amastigotes presentaron un comportamiento diferente.

La *Figura 5B* señala la actividad de fosfatasa en el medio MSA. La mayor actividad enzimática se presentó a 1 h de incubación y ésta disminuyó conforme se incrementó el tiempo de secreción. Un resultado interesante que muestran ambas *Figuras 5A* y *5B* es que el MSP presenta mayor actividad de fosfatasa en comparación con los MSA. Una vez establecidos los tiempos óptimos de secreción de los promastigotes —7 h— y de los amastigotes —1 hora—, estos lapsos fueron los que se utilizaron para los siguientes ensayos de secreción para *L. mexicana* MHOM/MX/2011 Lacandona.

Los resultados mostraron que la mayor actividad enzimática de fosfatasa se presentó en el medio MSP en comparación con el medio MSA (*Figura 5C*). Este mismo comportamiento se observó en el MSP y MSA de *L. mexicana* MHOM/MX/92/UADY 68. Para determinar que la actividad enzimática analizada fuera un producto de secreción y no de proteínas liberadas por lisis celular, la viabilidad celular fue analizada mostrando que la

viabilidad de los parásitos de ambas fases de crecimiento no fue afectada en las condiciones experimentales antes mencionadas (Figura 5D).

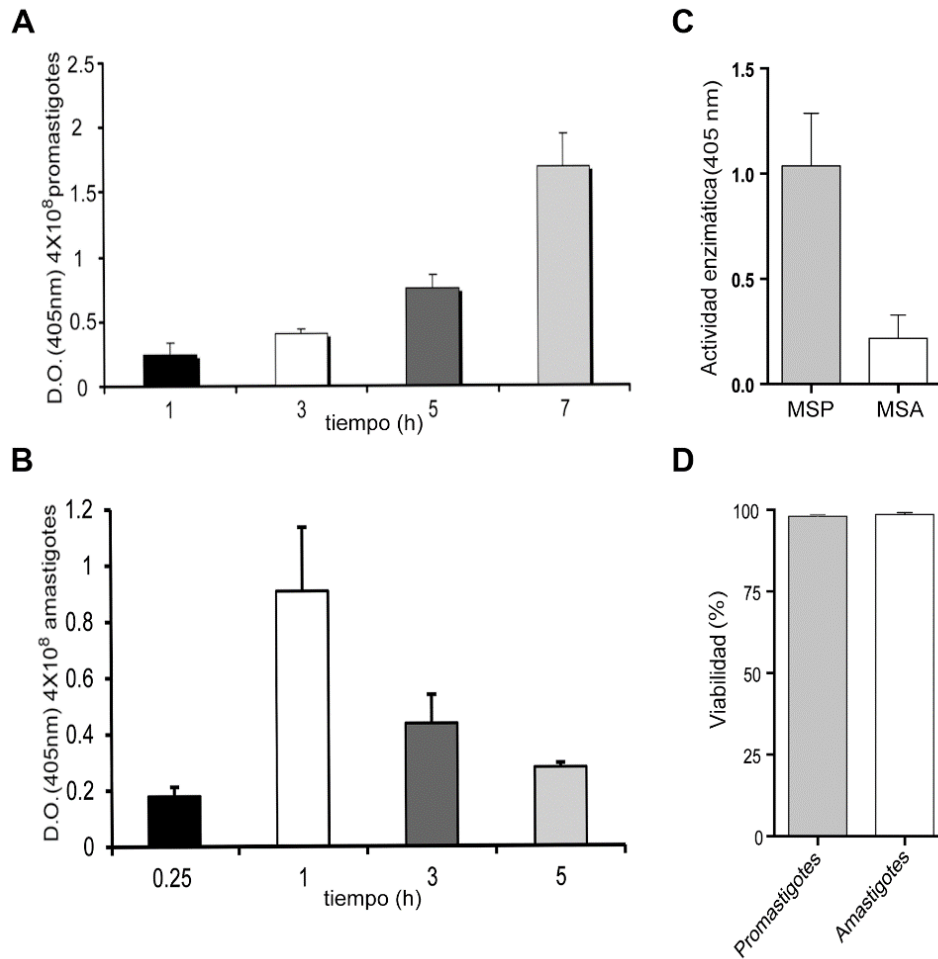


Figura 5. Proteínas secretadas por los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/92/UADY 68 y por *L. mexicana* MHOM/MX/2011 Lacandona que presentan actividad enzimática de fosfatasa

A) Actividad de fosfatasa en el medio de cultivo secretado por los promastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/92/UADY 68 a diferentes tiempos (1, 3, 5 y 7 h). **B)** Actividad de fosfatasa en el medio de cultivo secretado por los amastigotes de la misma cepa a diferentes tiempos (0.25, 1, 3 y 5 h). **C)** Actividad de fosfatasa en el MSP y en el MSA *L. mexicana* MHOM/MX/2011 Lacandona. **D)** Análisis de la viabilidad de los promastigotes y los amastigotes después del proceso de secreción. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM.

6.2. Actividad enzimática específica en los MSP y MSA de *L. mexicana* MHOM/MX/2011 Lacandona

Los resultados mostraron que el MSP y el MSA tienen preferencia por el sustrato de fosfotirosina (ENDpYINASL). La diferencia radica en que las fosfatasa presentes en el MSP desfosforilaron 55 pmol/min en comparación con el MSA que desfosforilaron 7 pmol/min. Mientras que para el sustrato de treonina (RRApTVA), el MSP la desfosforilación fue de 13 pmol/min y el MSA la desfosforilación fue de 0.9 pmol/min (*Figura 6A*).

6.3. Análisis del efecto de inhibidores específicos de fosfatasas sobre la actividad del MSP y el MSA

Continuando con la caracterización enzimática, se analizó el efecto de inhibidores específicos de la actividad de PTP y Ser/Thr fosfatasa en el MSP y el MSA. Las fosfatasas presentes en el MSP fueron inhibidas por inhibidores específicos de PTP, como fueron el ortovanadato de sodio, el tungstato de sodio y el molibdato de amonio. Estos mostraron una inhibición de alrededor del 98%, mientras que los inhibidores de Ser/Thr fosfatasa y de la fosfatasa tipo PP2C no mostraron ningún efecto inhibitorio.

En las fosfatasas presentes en el MSA, el efecto observado con los inhibidores de PTP fue el siguiente: el ortovanadato de sodio inhibió 45%, el tungstato de sodio 23% y el molibdato de amonio 26% adicionalmente. Las fosfatasas presentes en el MSA mostraron un ligero efecto de inhibición con los inhibidores de Ser/Thr fosfatasa, ácido okadaico 4.3%, trifluoperazina 5% y sanguinarina 2 % (*Figura 6 B y C*).

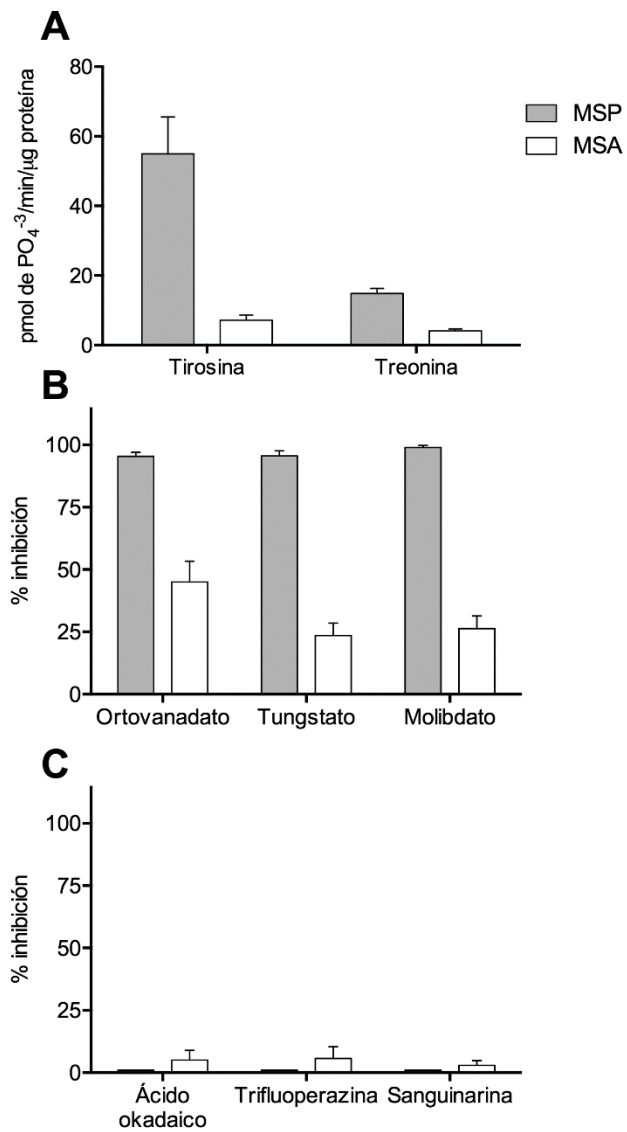


Figura 6. Caracterización bioquímica de las proteínas presentes en el MSP y el MSA
A) Actividad enzimática utilizando péptidos específicos fosforilados en el aminoácido tirosina (END) (pY) (INASL) y treonina (RRA(pT)VA). **B** y **C)** Efecto que ejercen los inhibidores de PTP y Ser/Thr en el MSP y MSA de *L. mexicana* MHOM/MX/2011 Lacandona. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM.

6.4. Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en las fracciones subcelulares de los promastigotes, los amastigotes y en el MSP, MSA de *L. mexicana* MHOM/MX/2011 Lacandona

El extracto total (ET), la fracción citosólica (FC) y la fracción membranal (FM) que se obtuvieron del fraccionamiento subcelular —el MSP y el MSA— después de los tiempos de secreción (7 y 1 h, respectivamente) de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* se analizaron mediante Western Blot utilizando un anticuerpo α -PP2C de *L. mexicana*.

Se observó el reconocimiento de una molécula de aproximadamente 45 kDa en ET y FC de los promastigotes y los amastigotes. Mientras tanto, en los MSP y MSA, el anticuerpo reconoció una molécula de aproximadamente 72 kDa, sin embargo, en la FM de los promastigotes y los amastigotes el anticuerpo α -PP2C no detectó ninguna molécula (*Figura 7A*).

Por otro lado, después de los diferentes tiempos de secreción, los promastigotes fueron utilizados para realizar un fraccionamiento subcelular. Las fracciones se analizaron en un ensayo de Western Blot utilizando un anticuerpo anti-PP2C de *L. mexicana*. Los resultados que se obtuvieron mostraron el reconocimiento de una proteína de alrededor de 44.9 kDa después de 1 h de secreción y la presencia proteica se incrementó después de 5 h de secreción de los parásitos (*Figura 7B*).

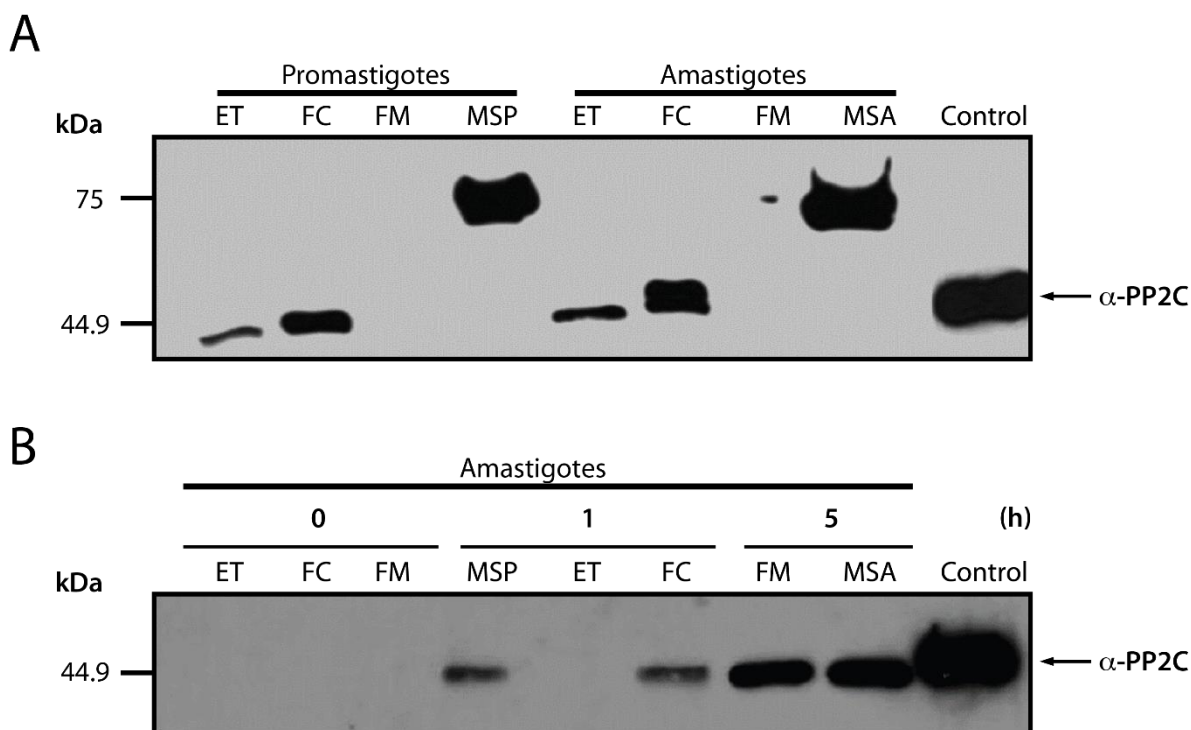


Figura 7. Inmunodetección de la proteína fosfatasa PP2C secretada al medio de cultivo y en las fracciones subcelulares de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/2011 Lacandona.

A y B) Extracto total (ET), fracción citosólica (FC) y fracción membranal (FM). Este fraccionamiento subcelular corresponde a los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana*. El medio secretado por promastigotes (MSP) y el medio secretado por amastigotes (MSA). **B)** Fraccionamiento de los parásitos después del tiempo de secreción. Como control, se utilizó una proteína fosfatasa PP2C recombinante de *L. mexicana*.

6.5. Localización ultraestructural de la PP2C en los amastigotes de *L. mexicana* mediante IEM

El análisis de la distribución de la PP2C en el amastigote de *L. mexicana* fue realizado por IEM. El flagelo es una estructura característica encontrada dentro del bolsillo y su origen está claramente identificado por la estructura axonema transversal y longitudinal que se puede observar claramente en las secciones de los parásitos (*Figura 8a-c*, puntas de flecha). La inmunotinción con el anticuerpo contra la PP2C en el amastigote mostró una abundante, específica y reproducible marca de oro dentro del bolsillo flagelar (*Figura 8e-g*). Curiosamente, el marcaje se asoció principalmente con pequeñas vesículas y con un material difuso ubicado dentro del espacio de bolsillo flagelar (flechas) y un cierto marcaje

también se detectó en la membrana flagelar. Otras estructuras y orgánulos de los amastigotes —tales como núcleos y mitocondrias— no presentaron marca, lo que indica la especificidad del anticuerpo y la localización del PP2C. Con el suero preinmune, ninguna marca fue observada (*Figura 8d*).

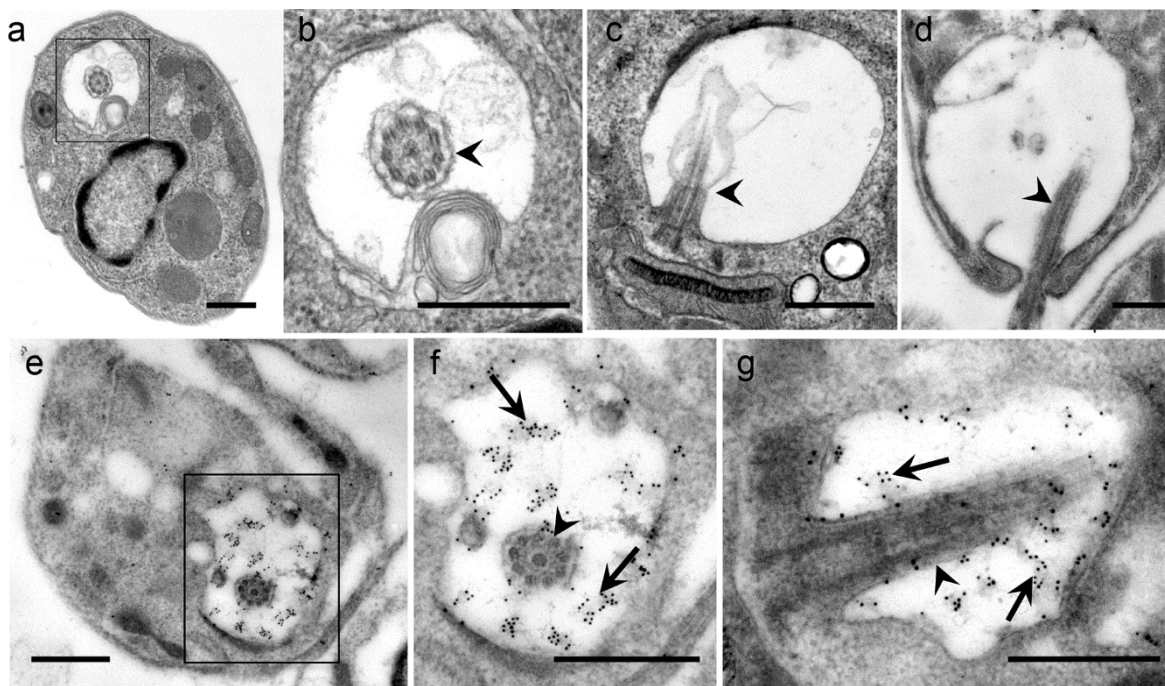


Figura 8. Distribución de la PP2C en los amastigotes de *L. mexicana* cepa MHOM/MX/2011 Lacandona por IEM.

La micrografía **a**) corresponde a la ultraestructura de los amastigotes. En el cuadro, se observa el bolsillo flagelar del parásito. La micrografía **b**) es una ampliación del bolsillo flagelar. La cabeza de flecha señala el axonema. La micrografía **c**) corresponde al control negativo. La cabeza de flecha señala el rizoplasto, nombre que se le da al pequeño flagelo que presenta el amastigote. La micrografía **d**) corresponde al control negativo y es el aumento de la región de bolsillo flagelar. La micrografía **e**) muestra el reconocimiento de proteínas fosfatasas PP2C dentro del bolsillo flagelar mostrado en el cuadro. La micrografía **f**) muestra una ampliación del bolsillo flagelar y la presencia de las partículas de oro distribuidas en el mismo. Las flechas indican la presencia de partículas de oro (10 nm) dentro del bolsillo flagelar. Las puntas de flecha indican la presencia de los flagelos en secciones transversales o longitudinales. Barras de escala = 0,5 μ m.

6.6. Producción de citocinas por los macrófagos humanos

El efecto del MSP y MSA de *L. mexicana* fue analizado en la producción de las siguientes citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-12p70 e IL-10 en los macrófagos humanos. Para todos los casos, se utilizó como control basal a los macrófagos sin estímulo (C) y, como un control positivo, a los macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS).

La producción de TNF- α después de la estimulación con el MSP incrementó cuatro veces (212.16 pg/mL) comparado con los macrófagos no estimulados (50.5 pg/mL). La incubación con el MSA mostró también un aumento de tres veces (153.66 pg/mL) (*Figura 9A*). La producción de IL-1 β , después de la incubación con el MSP, mostró un incremento de casi tres veces (139.25 pg/mL) con respecto al valor observado en los macrófagos no estimulados (46.2 pg/mL). Mientras tanto, la incubación con el MSA incrementó de manera similar a la producción de esta citocina (147.75 pg/mL) (*Figura 9B*). Después de la incubación con el MSP, la producción de IL-12p70 incrementó dos veces (85.83 pg/mL) el valor observado en los macrófagos no estimulados (48 pg/mL), mientras que el estímulo con el MSA mostró un incremento de poco más de dos veces (113.75 pg/mL) (*Figura 9C*).

Finalmente, después de la incubación con el MSP, la producción de IL-10 incrementó aproximadamente cuatro veces (219 pg/mL) el valor observado en los macrófagos no incubados (58.1 pg/mL), mientras que la incubación con el MSA mostró un incremento de aproximadamente tres veces (181.5 pg/mL) (*Figura 9D*).

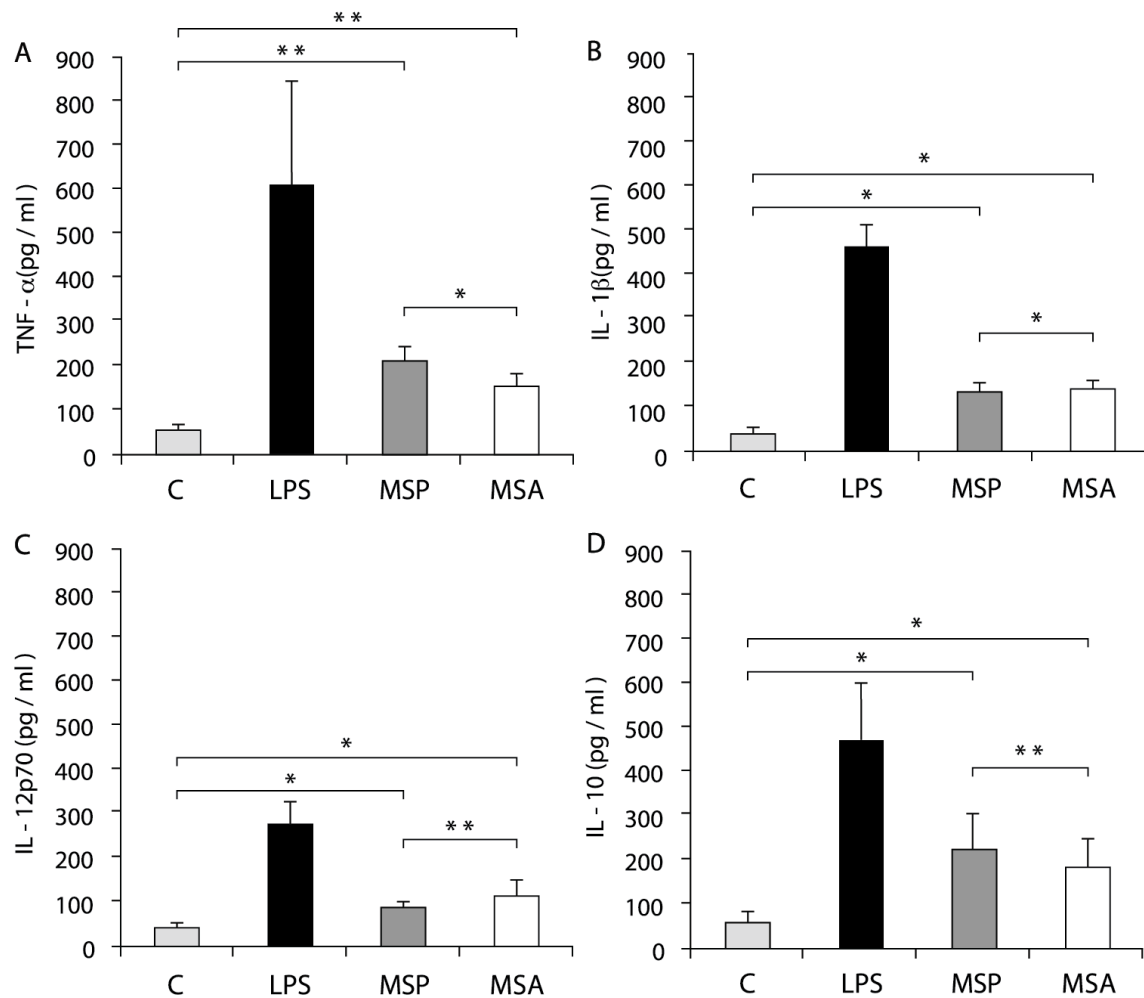


Figura 9. Producción de citocinas por los macrófagos humanos estimulados con el MSP y el MSA de *L. mexicana*.

A) TNF-α; B) IL-1β; C) IL-12p70; D) IL-10. Macrófagos basales (C), macrófagos estimulados con LPS, macrófagos estimulados con el MSP o MSA. La producción fue analizada por ELISA. Las barras representan el promedio \pm SEM de cuatro experimentos diferentes. (*) indican diferencia significativa de $p < 0,05$ y (**) diferencia significativa de $p < 0,001$.

6.7. Participación de la fosfatasa PP2C en el crecimiento de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379

Para determinar la participación de la fosfatasa PP2C en el crecimiento de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379, se utilizó un inhibidor de la actividad enzimática de esta enzima denominada sanguinarina. Los parásitos se cultivaron con diferentes concentraciones del inhibidor, como ya se mencionó en la Sección 5.16.

Los resultados mostraron que los promastigotes y los amastigotes presentaron una curva de crecimiento normal en ausencia de la sanguinarina (*Figura 10A y C*), sin embargo, los promastigotes que se cultivaron con la sanguinarina mostraron una disminución en el número de parásitos en el día tres de cultivo con la concentración de 0.8 μM (*Figura 10A*), pero sin afectar su viabilidad celular. Ésta se afectó ligeramente en las concentraciones de 0.1 y 0.120 μM , respectivamente (*Figura 10B*). En los amastigotes, se observó que el número de parásitos disminuyó en la concentración de 2.5 y 5 μM de sanguinarina (*Figura 10C*), mientras que a 5 μM , la viabilidad celular de los parásitos se afectó (*Figura 10D*).

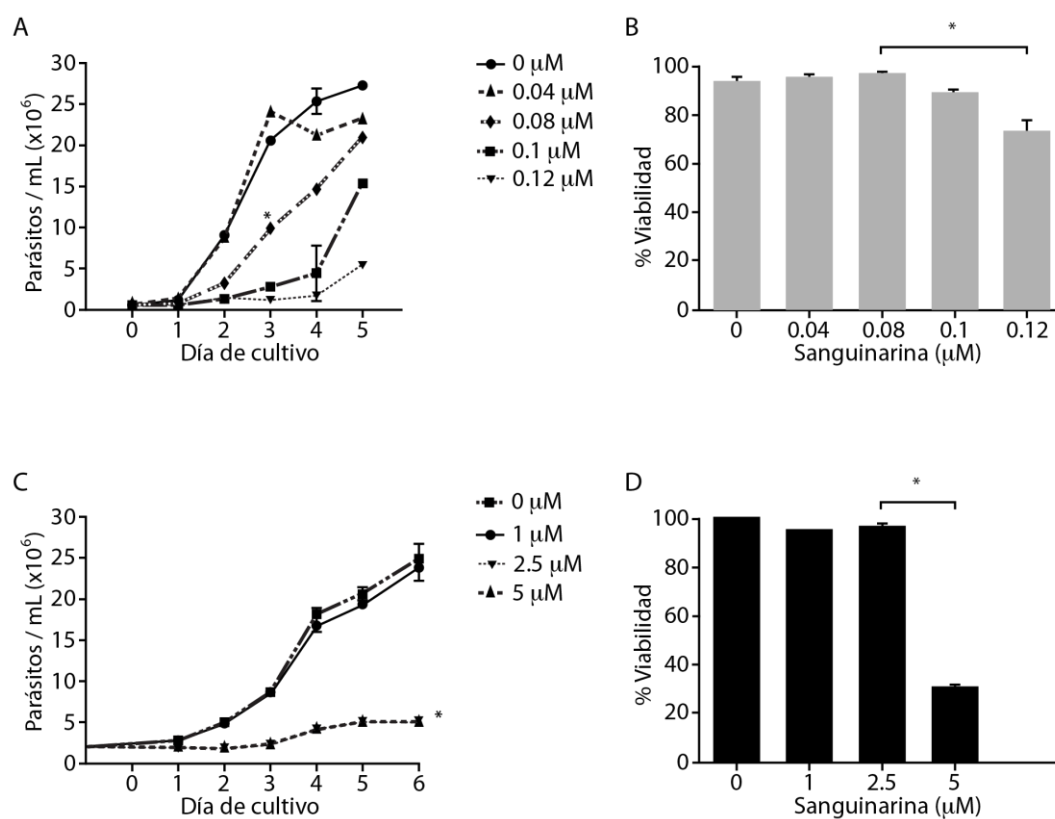


Figura 10. Participación de la fosfatasa PP2C en el crecimiento de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379.

A) Curva de crecimiento de los promastigotes en presencia de la sanguinarina a diferentes concentraciones de: 0.04, .08, 0.10 y 0.12 μM durante 5 días de cultivo. **B)** Análisis de la viabilidad con eritrosina B de los promastigotes incubados con la sanguinarina. **C)** Curva de crecimiento de los amastigotes en presencia de la sanguinarina a diferentes concentraciones de: 1, 2.5 y 5 μM durante 6 días de cultivo. **D)** Análisis de la viabilidad de los amastigotes incubados con la sanguinarina mediante eritrosina B. Las barras representan el promedio \pm SEM de cuatro experimentos diferentes. (*) indican diferencia significativa de $p < 0.05$.

6.8. Participación de la fosfatasa PP2C de los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379 en presencia de la sanguinarina

Con la finalidad de conocer si la disminución en el número de los promastigotes estaba asociada con la actividad enzimática de fosfatasa, se analizó dicha actividad en los extractos de los parásitos que fueron incubados con las diferentes concentraciones de sanguinarina.

El resultado mostró una inhibición en la actividad enzimática en los extractos de los parásitos antes mencionados de manera dosis dependiente (*Figura 11A*). En la concentración de 0.08 μM , se observó un 80% de inhibición en la actividad enzimática sin afectar la viabilidad de los parásitos (*Figura 11A y 10B*); mientras que a 0.12 μM , se observó un 90% de inhibición en la actividad enzimática, sin embargo, en esta condición, la viabilidad de los parásitos se afectó (*Figuras 11B y 10D*). En los amastigotes, la actividad enzimática disminuyó ligeramente en presencia de 1.0 y 2.5 μM de sanguinarina (*Figura 11B*).

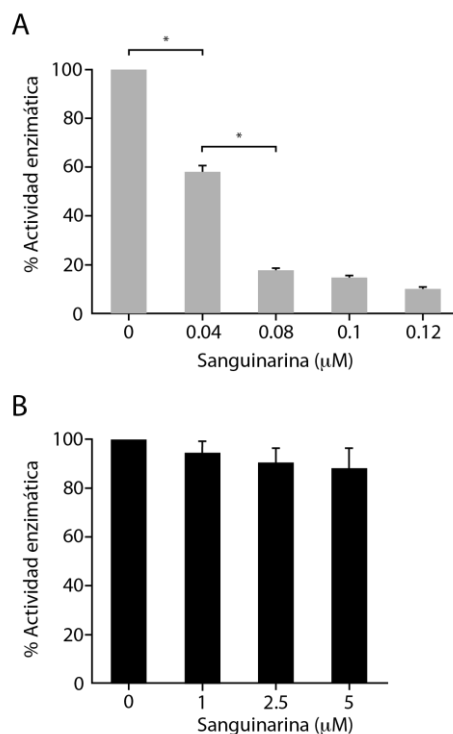


Figura 11. Participación de la fosfatasa PP2C de los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379 en presencia de la sanguinarina.

A) Actividad enzimática en los extractos de los promastigotes incubados con 0.04, 0.08, 0.1 y 0.12 μM de sanguinarina. B) Actividad enzimática en los extractos de los amastigotes incubados con 1, 2.5 y 5 μM de sanguinarina. Las barras representan el promedio ±SEM de cuatro experimentos diferentes. (*) indican diferencia significativa de p<0,05.

6.9. Participación de la PP2C en la morfología de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379 en presencia de la sanguinarina

Los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379 se incubaron con las diferentes concentraciones de la sanguinarina y fueron monitoreados en el microscopio mediante la técnica de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) o Nomarski.

Los promastigotes mostraron cambios morfológicos en el cuerpo del parásito a partir de la concentración de 0.08 μM, donde se observó un ligero hinchamiento en el cuerpo de los promastigotes (Figura 12C). Estos cambios se presentaron de manera dosis dependiente (Figura 12D y E). En los amastigotes incubados con las diferentes

concentraciones de la sanguinarina, no observamos cambios morfológicos (*Figura 13B, C y D*). En los controles de ambos estadios, la morfología no se vio alterada (*Figura 12A y 13A*).

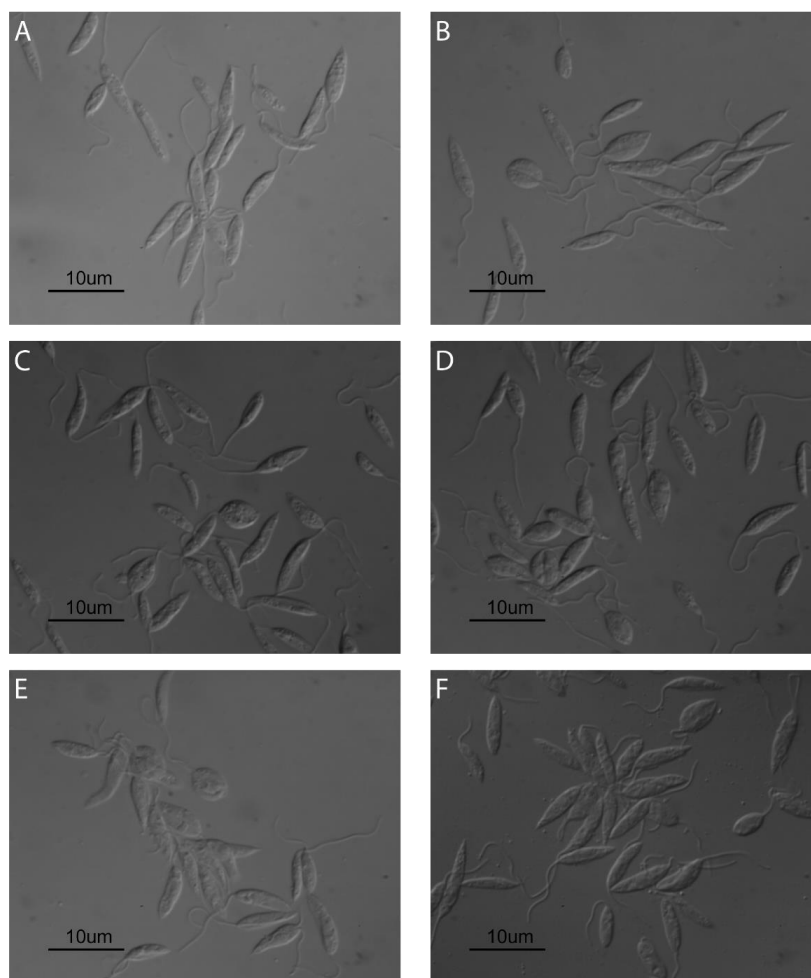


Figura 12. Cambios morfológicos observados en los promastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379 después de la incubación con la sanguinarina.

A) Los parásitos fueron cultivados en ausencia de la sanguinarina. **B)** Los promastigotes incubados con 0.04µM. **C)** Los promastigotes incubados con 0.08µM. **D)** Los promastigotes incubados con 0.1µM. **E)** 0.12 µM de sanguinarina. **F)** Los promastigotes incubados con metanol.

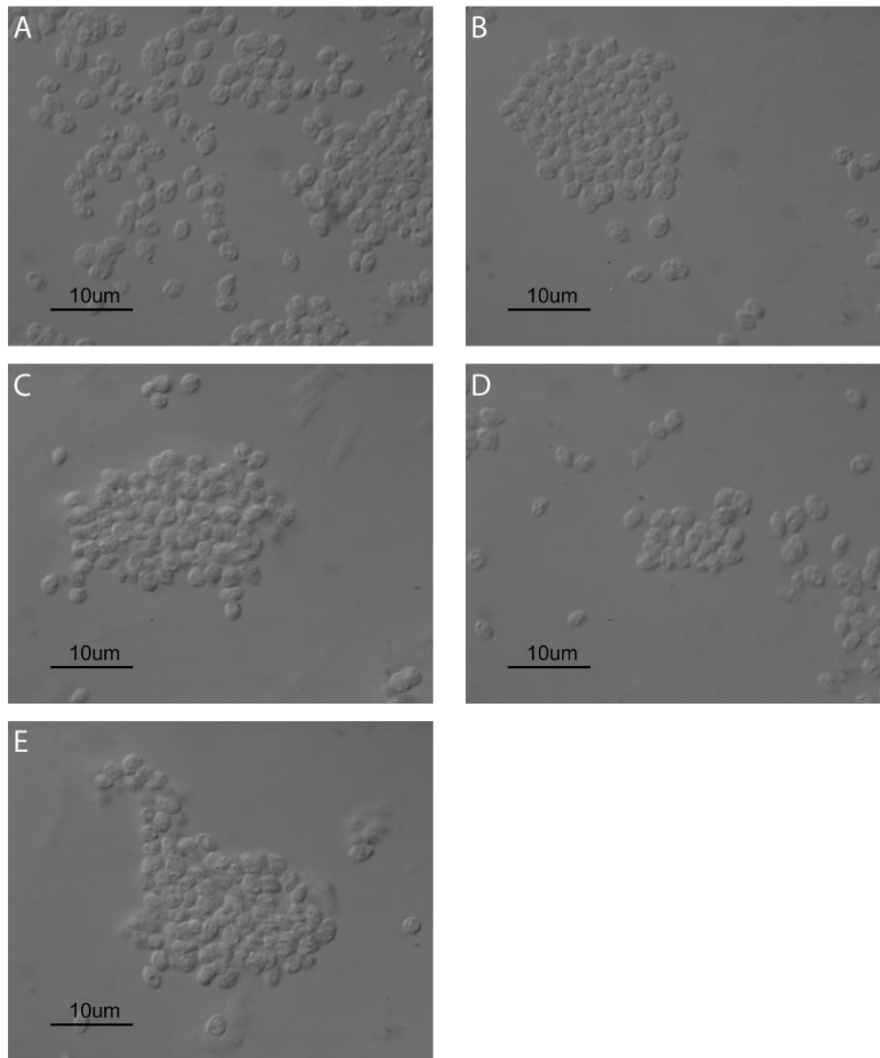


Figura 13. Cambios morfológicos observados en los amastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379
A) Los amastigotes sin sanguinarina. B) Los amastigotes incubados con 1 μ M. C) Los amastigotes incubados con 2.5 μ M. D) Los amastigotes incubados con 5.0 μ M de sanguinarina. E) Los amastigotes incubados con metanol. Las fotomicrografías fueron tomadas mediante la técnica de contraste diferencial de fase (DIC) en un microscopio de epifluorescencia.

6.10. Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en extractos de los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* incubados con diferentes concentraciones de sanguinarina

La siguiente pregunta a contestar fue: ¿La sanguinarina tiene un efecto en la presencia de proteínas en ambos estadios del parásito? Para responder dicho cuestionamiento, se analizó la presencia de la proteína fosfatasa PP2C en estos parásitos. Se realizó un Western Blot utilizando los extractos proteicos de los parásitos incubados con las diferentes concentraciones de la sanguinarina. Los resultados mostraron que la presencia de la proteína es homogénea en los diferentes extractos de los parásitos incubados con la sanguinarina (Figura 14 A y B), respectivamente.

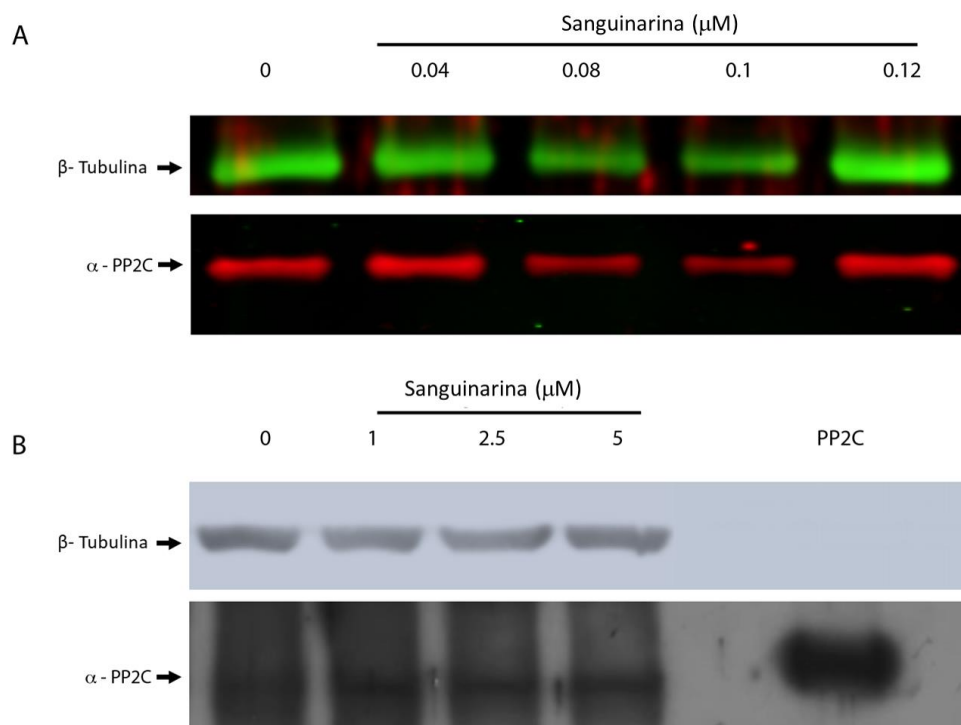


Figura 14. Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en extractos de *L. mexicana* en ambos estadios
A) Extractos de los promastigotes incubados con 0.04, 0.08, 0.01 y 0.12 μM de sanguinarina. B) Extractos de los amastigotes incubados con 1, 2.5 y 5 μM de sanguinarina.

6.11. Participación de la proteína fosfatasa PP2C en el proceso de transformación en un cultivo *in vitro*

Para determinar si la sanguinarina presenta un efecto en la inhibición en el proceso de transformación de los promastigotes a amastigotes, los promastigotes de *L. mexicana* — incubados con las diferentes concentraciones de sanguinarina durante tres días de cultivo— se transformaron en amastigotes con las condiciones mencionadas en la metodología.

El análisis de la transformación mostró que el 98% de los parásitos se transformó en amastigotes (*Figura 15*), sin embargo, la morfología del parásito no era la misma. Se observaron parásitos amorfos y con diferentes tamaños (dato no mostrado). Los parásitos se incubaron a diferentes tiempos con la sanguinarina: 1, 3, 6, 9, 12 y 24 h. En cada tiempo, se analizó la actividad enzimática y la transformación de los promastigotes a amastigotes. En las primeras 24 h de interacción, no se observó una inhibición en la transformación, lo cual nos permite concluir que la PP2C del parásito no participa de forma directa en la transformación de promastigote a amastigote (datos no mostrados).

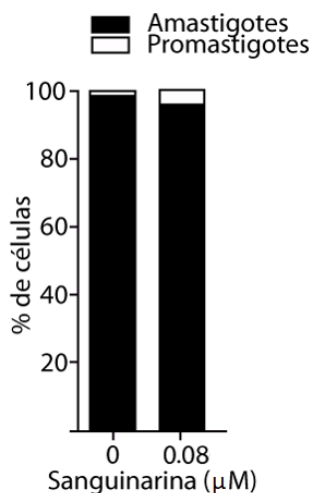


Figura 15. Porcentaje de parásitos de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379 transformados en los amastigotes.

Los promastigotes fueron incubados por tres días con 0.08 μM de sanguinarina. La barra negra representa a los amastigotes y, la barra blanca, a los promastigotes.

6.12. Participación de la proteína fosfatasa PP2C en el proceso de infección

Con la finalidad de conocer si la PP2C participa en el proceso de infección, los macrófagos fueron infectados con los promastigotes incubados en presencia y ausencia de sanguinarina a una concentración de 0.08 μM . Los resultados señalaron que los macrófagos infectados con los parásitos sin tratamiento mostraron alrededor del 60% de infección (*Figura 16A*). Por otro lado, el porcentaje de infección disminuyó al 20% con los parásitos que fueron incubados con 0.08 μM de sanguinarina (*Figura 16B*).

Los datos del experimento se indican en la *Figura 16C*. El mismo comportamiento fue observado para los amastigotes. Los macrófagos que se infectaron con los amastigotes en ausencia de la sanguinarina mostraron un porcentaje de infección del 55% (*Figura 16D*). Por otro lado, en el caso de los parásitos incubados con la sanguinarina, el porcentaje de infección disminuyó al 25% (*Figura 16E*). Los porcentajes de infección se representan en la *Figura 16F*.

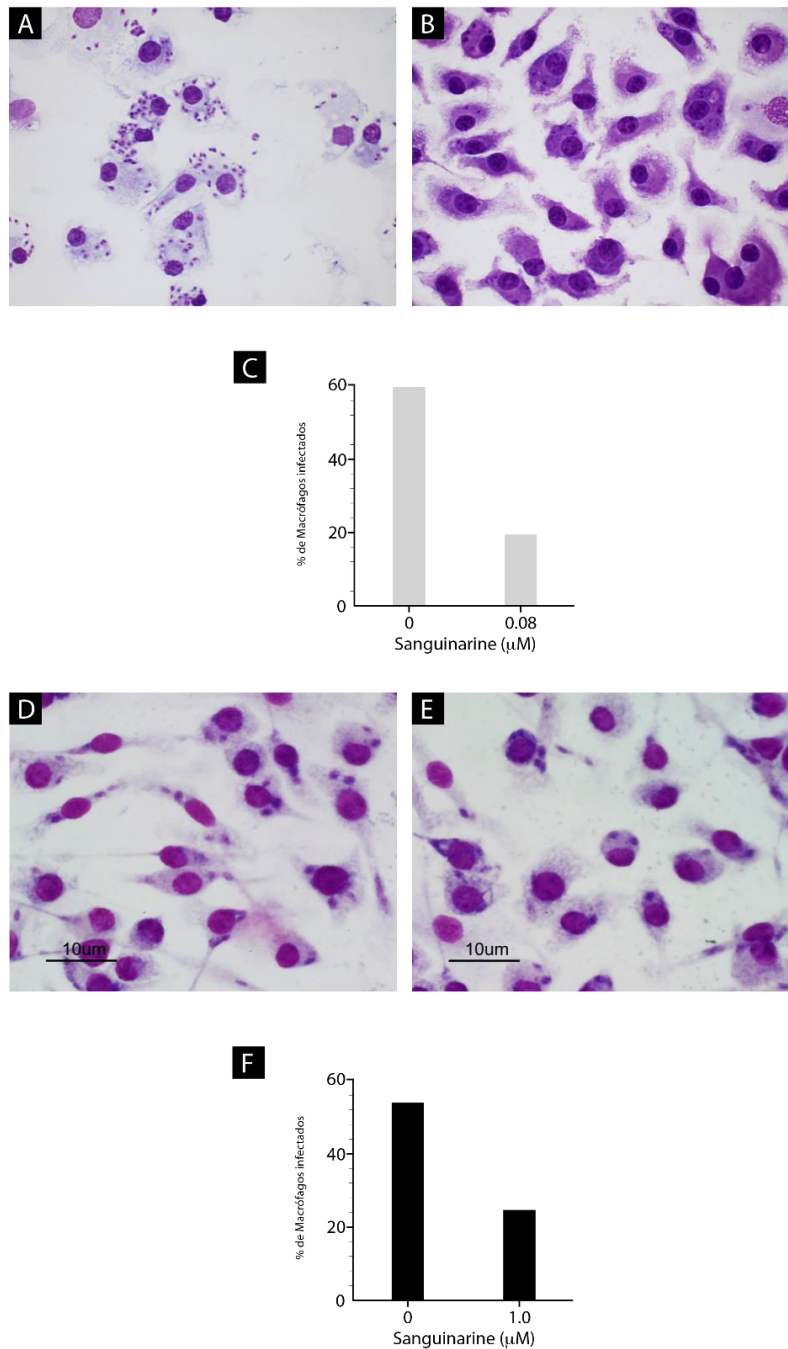


Figura 16. Participación de la proteína fosfatasa PP2C en el proceso de infección de los macrófagos
A) Macrófagos murinos infectados con los promastigotes de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379 en una relación 1:5 (relación célula-parásito). **B)** Macrófagos murinos infectados con los promastigotes de *L. mexicana* previamente incubados con 0.08 μM de la sanguinarina. **C)** Gráfica que representa el porcentaje de infección de los promastigotes en presencia de la sanguinarina. **D)** Macrófagos murinos infectados con los amastigotes de *L. mexicana*. **E)** Macrófagos murinos infectados con los amastigotes previamente incubados con 1.0 μM de la sanguinarina. **F)** Gráfica que representa el porcentaje de infección en parásitos incubados con la sanguinarina.

6.13. Obtención de los parásitos *knock-out* de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379

Con la finalidad de conocer la función de la PP2C en el parásito, se procedió a generar parásitos *knock-out* en el gen LmxM 25.07.50, el cual codifica para la proteína fosfatasa PP2C. Los dos alelos del gen de la PP2C fueron sustituidos mediante recombinación homóloga por los genes de resistencia a puromicina e higromicina.

Para la obtención del *knock-out* sencillo, promastigotes de *L. mexicana* fueron electroporados con el vector que contiene el gen de resistencia a puromicina. Los resultados que se obtuvieron de este procedimiento fueron los siguientes: parásitos que fueron sometidos a las mismas condiciones de electroporación sin la adición del plásmido murieron en presencia del antibiótico puromicina, lo que indica que no tenían incorporados los genes de resistencia y, por lo tanto, no lograron sobrevivir (*Figura 17B*). Sin embargo, los parásitos que contenían el plásmido lograron dividirse (*Figura 17C*). En los siguientes pases de los parásitos, estos no presentaron la forma fusiforme clásica del promastigote, sino que se observó una forma redondeada y la pérdida del flagelo. (*Figura 17A, C y D*).

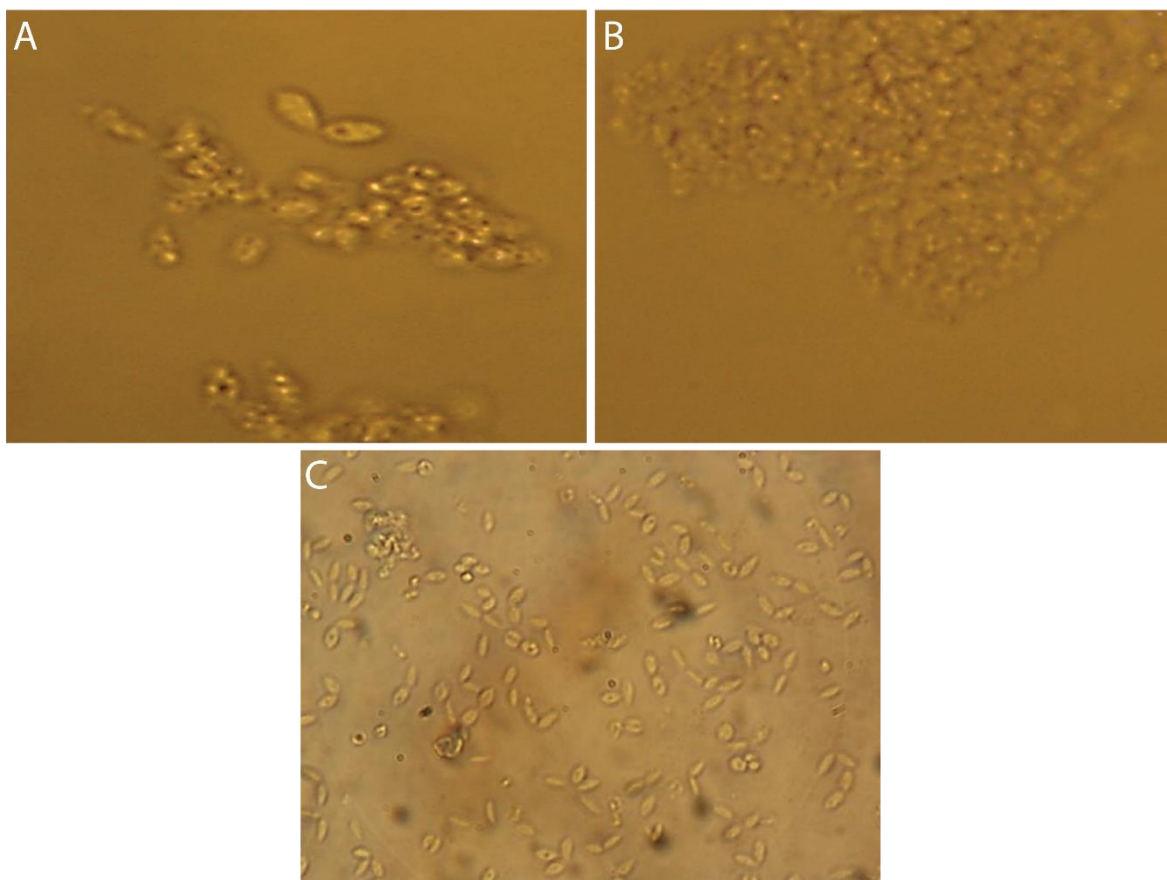


Figura 17. Morfología de los promastigotes *knock-out* de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379

A) A los promastigotes se les incorporó la construcción que contiene el gen de resistencia a puromicina mediante electroporación. B) Parásitos que fueron utilizados como control de electroporación. C) Promastigotes *knock-out* observados después de haber realizado varios pases de cultivo.

Posteriormente, se procedió a la generación del *knock-out* doble, para lo cual los parásitos *knock-out* sencillo fueron electroporados con el vector de higromicina. Para el crecimiento de los parásitos silvestres, el *knock-out* sencillo y el *knock-out* doble fue monitoreado durante cuatro días de cultivo en el microscopio de luz.

En el día dos, tres y cuatro, los parásitos silvestres mostraron la forma clásica del parásito —fusiforme y la presencia del flagelo— (Figura 18A, D y G), mientras que los promastigotes *knock-out* sencillos presentaron un ligero acortamiento del flagelo en el día dos de cultivo (Figura 18B). Asimismo, el tamaño de éste se fue incrementando conforme avanzó el día de cultivo (Figura 18E y H). Los parásitos *knock-out* doble presentaron forma oval y ausencia de flagelo (Figura 18C) y empezaron adquirir la forma fusiforme, el flagelo

apareció y el tamaño de éste se incrementó conforme avanzó el día de cultivo (Figura 178 e I).

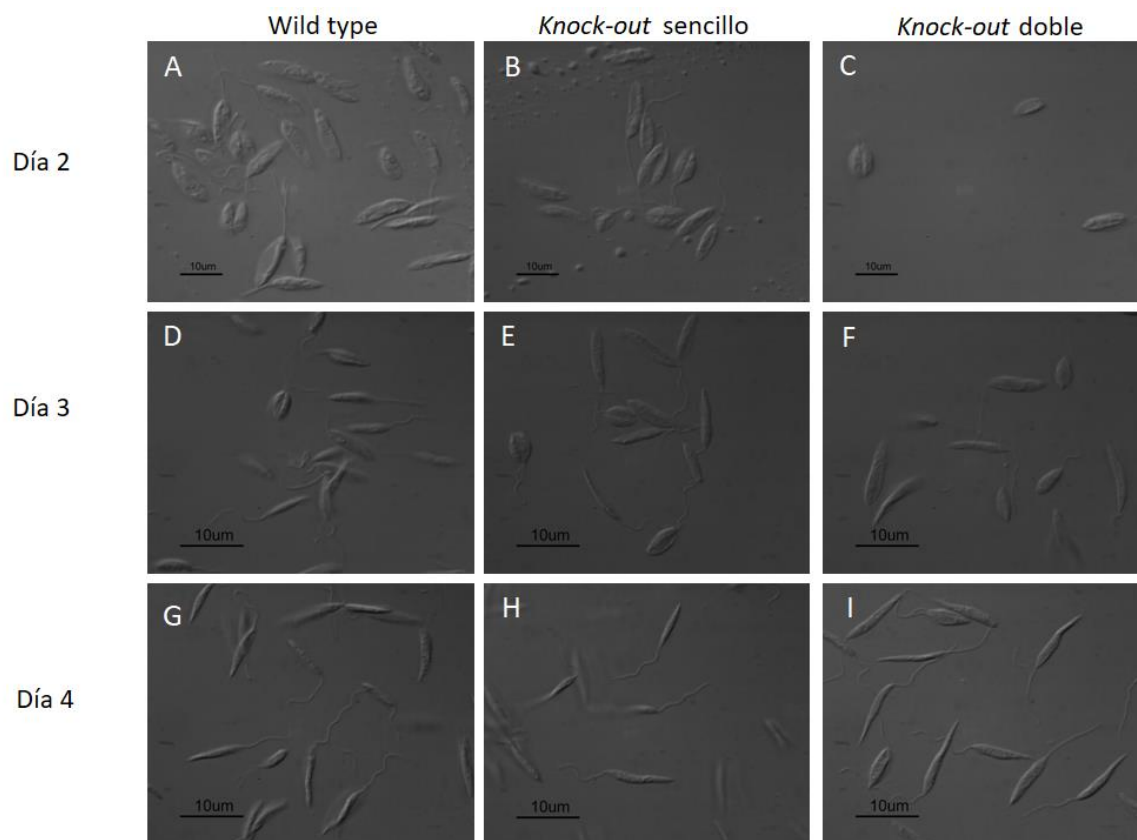


Figura 18. Morfología de los promastigotes *knock-out* en diferentes días de cultivo

A, B y C) Los parásitos *wild type*, *knock-out* sencillo y doble, respectivamente, tomadas en el día dos de cultivo. Los parásitos *knock-out* sencillo sin el flagelo. **D, E y F)** Microfotografías de los parásitos *wild type*, *knock-out* sencillo y doble, respectivamente, tomadas en el día tres de cultivo. **G, H e I)** Microfotografías de los parásitos *wild type*, *knock-out* sencillo y doble, respectivamente, tomadas en el cuarto día de cultivo.

6.14. Identificación de la PP2C en los promastigotes *knock-out* de *L. mexicana*

En los extractos obtenidos de los parásitos *knock-out* sencillo sin flagelo, con flagelo y los *knock-out* doble mediante Western Blot, se observó una expresión diferencial de la proteína fosfatasa PP2C en las diferentes condiciones. En los parásitos *knock-out* sencillo sin flagelo, se presentó una disminución en la presencia de la proteína PP2C comparada con los parásitos *wild type*, donde se presentó el reconocimiento de una molécula de alrededor de 44.9 kDa, el tamaño de la proteína fosfatasa recombinante de *L. mexicana*. Un resultado interesante se encontró con los parásitos *knock-out* sencillo con flagelo y *knock-out* doble, pues no se observó una disminución aparente en la abundancia de la proteína fosfatasa PP2C (Figura 19).

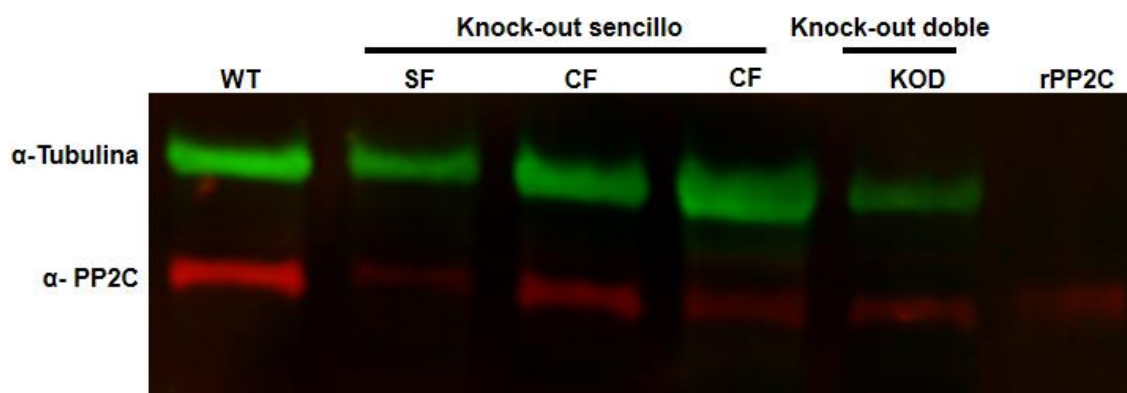


Figura 19. Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en los promastigotes *knock-out*
WT) Extracto de parásitos silvestres. SF) Extracto de parásitos *knock-out* sencillo sin flagelo. CF) Extracto de parásitos *knock-out* sencillo con flagelo. KOD) Extracto de parásitos *knock-out* doble. rPP2C) Proteína recombinante PP2C.

VII. DISCUSIÓN

La *Leishmania* spp. sintetiza y secreta moléculas de superficie como el LPG y la GP63 (McConville *et al.*, 2002). Es bien conocido que este parásito usa una secuencia amino terminal clásica para direccionar la exportación de más proteínas secretadas a través del bolsillo flagelar. Sin embargo, existen diversos reportes que mencionan que las proteínas secretadas por la *Leishmania* no presentan péptido señal, lo cual sugiere la existencia de una vía no clásica de secreción (Bates y Dwyer, 1987; McConville *et al.*, 2002). Esta vía de secreción no convencional ha sido observada en los parásitos como: *Trypanosoma* spp y *Leishmania* spp. (Cuervo *et al.*, 2009; Trocoli Torrecilhas *et al.*, 2009). En *Leishmania (viannia) braziliensis*, se identificaron 42 proteínas, las cuales no presentaron el péptido señal y también fueron reportadas por Silverman (2008). El análisis del exoproteoma mostró que solamente dos proteínas posiblemente fueron secretadas por vía clásica (Cuervo *et al.*, 2009).

Se ha demostrado la presencia de la actividad enzimática en extractos celulares de otros microorganismos como es el caso de *Trypanosoma cruzi*; en dicho parásito, se analizó la actividad enzimática en unas vesículas secretadas por éste, las cuales presentaron actividad de fosfatasa que correlacionó con el incremento de la adhesión del parásito y la infección de macrófagos (Neves *et al.*, 2014). En el caso de la *Leishmania*, la virulencia ha sido relacionada con tres grupos diferentes de moléculas del parásito: uno compuesto de moléculas de secreción, moléculas de superficie e intracelulares (Chang *et al.*, 2003). Las moléculas secretadas tienen un papel central en el establecimiento de la infección, ya que protegen al parásito de la acción temprana del sistema inmune del hospedero (Chang *et al.*, 2003; Santarem *et al.*, 2007).

Varias fosfatasas han sido descritas en varios microorganismos patógenos tales como: *Yersinia*, *Mycobacterium* y *Plasmodium*. Su papel se ve involucrado en las vías de transducción de señales del hospedero (Bliska *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 2016; Theriault y Richard, 2017).

La fosfatasa ácida secretada (SAcP) es liberada del bolsillo flagelar de los promastigotes y los amastigotes de la *Leishmania* y ha sido caracterizada previamente e implicada en la desfosforilación de sustratos orgánicos (Bates y Dwyer, 1987; Bates *et al.*, 1989). El papel de esta fosfatasa en la Leishmaniasis no ha sido caracterizado. Se ha sugerido que la PKC de *L. amazonensis* puede modular la infección de la célula hospedera (Vannier-Santos *et al.*, 1995). Las actividades de ectofosfatasas de la *Leishmania* pueden participar en nutrición, crecimiento, entre otros (Cosentino-Gomes y Meyer-Fernandes, 2011). En la *L. donovani*, se ha demostrado que la fosfatasa de los promastigotes correlaciona con el grado de virulencia (Singla *et al.*, 1992). También en la *L. amazonensis*, varias fosfatasas secretadas han sido caracterizadas (Freitas-Mesquita *et al.*, 2014). Nuestro grupo demostró que los promastigotes de la *L. mexicana* secretan fosfatasas con actividad de tirosina fosfatasas (PTP) al medio en el cual estuvieron incubados los parásitos (Escalona-Montaña *et al.*, 2010).

Existen otros grupos de investigación los cuales mencionan que la *Leishmania* secreta el factor de elongación 1 alfa y que este factor activa la fosfatasa del macrófago denominada SHP1, responsable de inhibir las vías de señalización del macrófago (Nandan *et al.*, 2002).

En este trabajo, nosotros analizamos la actividad de la fosfatasa secretada por ambos estadios de crecimiento del parásito. Encontramos que los promastigotes secretan proteínas con la actividad de fosfatasa máxima a las 7 h de incubación y, para los amastigotes, la actividad de fosfatasa máxima fue de 1 h. Después del proceso de secreción, la viabilidad de los parásitos fue analizada y se encontró que los parásitos presentaban una viabilidad del 95% después del proceso de secreción. Lo anterior indica que la actividad de la fosfatasa analizada es el resultado de un proceso de secreción activa por parte del parásito y no debido a la lisis del mismo.

La actividad enzimática encontrada en los medios secretados en ambas fases de crecimiento del parásito mostró ser más alta en los promastigotes en comparación con los

amastigotes a pesar de que en esta última se analizó el doble de concentración de proteína. Estos resultados correlacionan con otras moléculas que presenta el promastigote como es: el lipofosfoglicano (LPG), el cual se sabe que se encuentra muy abundante en la membrana y en el glicocalix en esta fase de crecimiento del parásito y, en el amastigote, la cantidad de esta molécula disminuye (McConville y Blackwell, 1991). Para el caso de la GP63, una metaloproteasa dependiente de zinc, ésta se encuentra de manera muy abundante en el amastigote, mientras que, en el promastigote, su presencia se ve disminuida (Isnard *et al.*, 2012).

Esta diferencia en la expresión de las moléculas que presenta el parásito en su superficie no sólo ha sido observada en ambos estadios, sino también en un estadio como: el promastigote no infectivo (promastigote procíclico) e infectivo (promastigote metacíclico). En estas dos fases de crecimiento, se observó una diferencia en la presencia proteica de la fosfatasa de tirosina en los promastigotes infectivos de *L. major*, los cuales mostraron mayor presencia de esta proteína en comparación con los promastigotes no infectivos, la cual posiblemente tenga una participación importante en el proceso de infección en su célula hospedera (Aguirre-García *et al.*, 2006). Es bien conocido que los promastigotes y los amastigotes alteran la señalización en el macrófago de manera diferente, la fosfatasa 1B de la célula hospedera es activada sólo por las diferentes especies de promastigotes de la *Leishmania* (Abu-Dayyeh *et al.*, 2010).

La caracterización bioquímica realizada a las proteínas presentes en el medio secretado por los promastigotes (MSP) y en el medio secretado por los amastigotes (MSA) mostró que la actividad enzimática en el MSP —utilizando péptidos fosforilados en tirosina y treonina— indicó mayor desfosforilación en presencia de los péptidos fosforilados en tirosina, en comparación con treonina, mientras para el MSA mostró una disminución en la desfosforilación para ambos sustratos.

El uso de inhibidores específicos para la actividad enzimática es una herramienta fundamental para la caracterización enzimática. En este trabajo, se utilizaron inhibidores de

la actividad tirosina fosfatasa y de serina treonina fosfatasa, los cuales se saben que a concentraciones micromolares —para el caso de los inhibidores de PTPs— y nanomolares —para el caso de los inhibidores de serina treonina fosfatasa— inhiben la actividad enzimática de dichas proteínas. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que los inhibidores de la actividad de PTP sólo inhibieron la actividad de fosfatasa presente en PSM, no así en ASM, mientras los inhibidores de serina-treonina fosfatasa no mostraron ningún efecto. La caracterización de fosfatasas con estos compuestos ha sido reportada en otros estudios (Aguirre-García *et al.*, 2003; Aguirre-García *et al.*, 2006; Escalona-Montaño *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2013).

Siguiendo con la caracterización enzimática, se realizó un Western Blot en el PSM, el ASM y en los extractos totales del parásito utilizando un anticuerpo que reconoce la proteína fosfatasa recombinante PP2C de *L. major*. Los resultados mostraron que el anticuerpo reconoció una proteína de 44.9 kDa, la cual está presente en los extractos totales y en la fracción citosólica de los promastigotes y los amastigotes. Mientras tanto, en el MSP y el MSA, reconoció una molécula de 72 kDa. Los resultados obtenidos en el MSP y en el MSA señalan el reconocimiento de una proteína con un peso molecular más alto; posiblemente indiquen que esta molécula es el resultado de una modificación postraduccional.

El secretoma de la *Leishmania* ha sido analizado en la búsqueda de potenciales factores de virulencia (Silverman *et al.*, 2008). En este estudio, los candidatos a factores de virulencia fueron divididos en cuatro grupos: proteínas putativas involucradas en la sobrevivencia intracelular, proteínas con funciones inmunosupresoras, proteínas involucradas en la transducción de señales y proteínas involucradas en los procesos de transporte. En el grupo de proteínas involucradas en transducción de señales, se encontró una proteína fosfatasa 2C, la cual es codificada por el gen LmjF25.0750 de *L. major*. La secuencia de esta proteína fue analizada en el GeneDB y mostró ser similar a la fosfatasa 2C de *L. chagasi* (Lc PP2C), la cual está presente como una proteína de 42 kDa (Burns *et al.*, 1993).

Los anticuerpos en contra de la PP2C de *L. major* usados en este trabajo fueron generados en contra de una proteína PP2C recombinante de *L. major*, la cual tiene un peso molecular de 44.9 kDa; éste corresponde al peso molecular detectado, sin embargo, es importante destacar que dicho anticuerpo también reconoció un peso de 72 kDa en MSP y MSA. Posiblemente, lo anterior indique que esta molécula es el resultado de un proceso de glicosilación o una secuencia peptídica señal aminoterminal clásica para direccionar la exportación de más proteínas secretadas través del bolsillo flagelar.

Experimentos adicionales fueron realizados analizando el extracto total, la fracción citosólica y la fracción membranal de los amastigotes que fueron sometidos a diferentes tiempos de secreción. Los resultados que se obtuvieron de este experimento mostraron que el anticuerpo reconoció una molécula de 44.9 kDa solamente en los amastigotes después de 1 h y 5 h de secreción. Este resultado fue interesante debido a que esta proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* pudiera ser activada como resultado a una respuesta a estrés del amastigote debido al proceso de secreción. Existen diversos reportes que mencionan que esta proteína PP2C participa de manera importante en regular el proceso de estrés en plantas, la más estudiada es *Arabidopsis thaliana*, donde se ha demostrado que la PP2C de esta planta regula negativamente la señalización del ácido abscísico. Esta vía de señalización regula el crecimiento y el desarrollo de la planta, así como también la tolerancia a condiciones ambientales adversas (Sugimoto *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos mostraron que los amastigotes de *L. mexicana* secretaron una fosfatasa del tipo PP2C. El siguiente paso fue determinar su localización en el parásito mediante microscopía electrónica de transmisión. Lo anterior puso en evidencia que la enzima se localiza en el bolsillo flagelar del parásito, así como también en pequeñas vesículas sugiriendo que posiblemente esta enzima pudiera ser secretada del bolsillo flagelar al espacio extracelular. Lo que falta por conocer es si la enzima puede secretarse de forma soluble o estar asociada con vesículas secretorias. Estos resultados fueron similares a los que se encontraron en los promastigotes de *L. major* utilizando microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión. Se encontró que la enzima fue

localizada en el bolsillo flagelar y el flagelo de dicho parásito (Escalona-Montaña *et al.*, 2017). Con la finalidad de conocer si los productos secretados por este parásito en ambos estadios de crecimiento tienen una regulación en la modulación de las citocinas en los macrófagos humanos, analizamos el efecto de MSP y MSA en la producción de citocinas por los macrófagos humanos. Los resultados mostraron que ambos —MSP y MSA— presentaron diferencias en la producción de citocinas como: $TNF\alpha$, IL-12p70, e IL-10. Esta secreción de citocinas es dada por moléculas secretadas por el parásito; no tenemos la certeza si proteínas fosfatasa están involucradas en este proceso.

Existen reportes de que los exosomas de *L. donovani* inducen la producción de la interleucina 8 de manera dosis dependiente. Esta inducción puede ser importante en la patogénesis de la enfermedad, ya que se ha observado el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de infección. Un modelo que ha surgido recientemente sugiere que la *Leishmania* spp. usa a los neutrófilos como caballos de troya para evitar la activación celular; de esta manera, pasan desapercibidos por el sistema inmune y pueden diseminarse a nuevas células hospederas (Van Zandbergen *et al.*, 2004).

Los resultados sugieren que la secreción de los exosomas por *Leishmania* juegan un papel en la patogénesis de la enfermedad. Lo anterior nos permite especular que los exosomas pueden ser un mecanismo de modulación de la respuesta inmune del hospedero usada principalmente por patógenos intracelulares y extracelulares (Silverman *et al.*, 2010). Por otra parte, antígenos secretados semi-purificados por *L. major* suprimieron en un 60% la proliferación de los linfocitos, asimismo, disminuyeron la producción de $IFN\gamma$ e incrementaron la producción de IL-4. También se presentó una baja regulación en la producción de óxido nítrico en los macrófagos activados. Estos resultados sugieren que *L. major* secreta proteínas que pudieran estar funcionando como factores inmunosupresores que desregulan el sistema inmune (Tabatabaee *et al.*, 2011).

Los antígenos de secreción de *L. donovani* fueron altamente inmunogénicos en una línea celular de macrófagos murinos denominada Raw 264.7. Las especies reactivas del

oxígeno —como la superóxido dismutasa (SOD)— y las especies reactivas del nitrógeno — como el óxido nítrico— se produjeron en la presencia de los antígenos de secreción de estos parásitos. A su vez, se observó la producción de citocinas como: $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ e IL-12. Los resultados sugieren fuertemente el papel potencial de estos antígenos en las funciones efectoras del macrófago y de la respuesta TH1, lo cual dan una pauta en el desarrollo de una vacuna para la Leishmaniasis visceral (Gour *et al.*, 2012).

Nosotros también observamos que la producción de citocinas en los macrófagos fue inducida de manera diferencial por las proteínas secretadas de los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana*. Esta información abre una nueva línea de investigación. El análisis de proteínas secretadas —especialmente de los parásitos aislados de pacientes con diferentes grados de severidad, como se observa en los pacientes LCL y LCD— posiblemente muestren una nueva luz en su papel como inmunomoduladores. Por otra parte, será muy interesante explorar la participación de proteínas fosfatasa secretadas como PTP y PP2C en diferentes vías de señalización de la célula hospedera.

El principal tratamiento quimioterapéutico contra la Leishmaniasis es el medicamento basado en antimoniales pentavalentes (Bifeld y Clos, 2015). Sin embargo, estos tienen efectos secundarios severos como son: cardiotóxicos, hepatotóxicos y nefrotóxicos (Sundar y Chakravarty, 2010). Debido a lo anterior, existe la necesidad de buscar nuevos blancos quimioterapéuticos para el nuevo diseño de fármacos. En la mayoría de los lugares endémicos de la Leishmaniasis en México, las personas recurren a la utilización de plantas medicinales (Alamilla-Fonseca *et al.*, 2018); en muchas regiones del mundo, la herbolaria constituye la primera opción; y en algunos países, es la única alternativa para el tratamiento de esta enfermedad.

La sanguinarina es un alcaloide cuaternario benzophenanthridina que se encuentra en muchas especies botánicas (Graf *et al.*, 2007) y se le han atribuido diferentes efectos farmacológicos como son: antimicrobianos y antiinflamatorios (Godowski, 1989; Lenfeld *et al.*, 1981). En parásitos, sólo existe un reporte en larvas de *Toxocara canis*, en el cual

estos alcaloides mostraron un efecto nematocida contra este parásito (Satou *et al.*, 2002). La sanguinarina fue identificada como un potente y específico inhibidor de la proteína fosfatasa PP2C. Este compuesto mostró selectividad hacia la proteína PP2C comparada con las fosfatasas PP1, PP2A y PP2B en ensayos *in vitro*. Este compuesto indujo apoptosis en una línea celular de Leucemia HL60, posiblemente, mediante un mecanismo dependiente de cinasas MAP p38 (Aburai *et al.*, 2010).

En esta investigación, se analizó la participación de la proteína fosfatasa PP2C de *L. mexicana* mediante el uso de un inhibidor específico que tiene su efecto en las fosfatasas tipo PP2C. Uno de los parámetros que se analizó fue en el crecimiento de los promastigotes y amastigotes de este mismo parásito. Los resultados mostraron que los promastigotes necesitan concentraciones menores de sanguinarina para inhibir el crecimiento, sin embargo, el crecimiento de los amastigotes fue ligeramente disminuida a una concentración de 2.5 μ M. Esta es una concentración 1,000 veces más grande que la encontrada para los promastigotes. Estas diferencias en el efecto de otros compuestos con propiedades leishmanicidas presentan mayor efecto en los promastigotes en comparación con los amastigotes que ya ha sido reportada en otros estudios (Torres-Santos *et al.*, 1999).

Con la finalidad de conocer si la proteína fosfatasa era la responsable de la disminución en el número de parásitos con las diferentes concentraciones del inhibidor, se analizó la actividad enzimática de fosfatasa en estos parásitos. En los promastigotes, se encontró que existe una inhibición de dicha actividad de manera dosis dependiente: a mayor concentración de sanguinarina, mayor inhibición. Sólo un reporte atribuye un efecto directo en la inhibición de la actividad enzimática de fosfatasa de la PP2C (Aburai *et al.*, 2010). Es bien conocido que la sanguinarina a pH alcalino predomina la forma alcalonamina, la cual favorece la unión a proteínas; mientras que a un pH ácido predomina la forma iminium, la cual interacciona con el ADN (Hossain *et al.*, 2011).

La mayoría de los reportes demuestran que la sanguinarina tiene un efecto anticancerígeno y que la forma responsable de este efecto es la forma iminum, ya que se

intercala en el ADN de manera preferencial entre los pares de bases GC (Sen y Maiti, 1994). La inhibición de la actividad enzimática en los amastigotes se presentó a concentraciones mayores del inhibidor. Posiblemente, las diferencias en la inhibición de la actividad enzimática encontradas en este parásito sean atribuidas a las diferentes formas de la sanguinarina presentes en los diferentes pHs. El cultivo axénico de los promastigotes se realizó a un pH de 7.2 y el cultivo de los amastigotes a 5.4, lo que indica que las dos formas de la sanguinarina estuvieron presentes en los diferentes estadios del parásito. El análisis de los parásitos en el microscopio de luz sólo nos permitió conocer los cambios morfológicos de manera superficial en ambos estadios del parásito. Sin embargo, los cambios más drásticos se observaron cuando las muestras fueron analizadas en el microscopio electrónico de transmisión. Los promastigotes presentaron alteraciones en la morfología del parásito en la integridad de la membrana plasmática; posiblemente, la síntesis de esteroides se afectó. Para poder atribuir este fenómeno, es importante utilizar un inhibidor en la síntesis de esteroides y monitorear la ultraestructura del parásito. Este efecto en la síntesis de esteroides se observó utilizando amiodarona en *T. cruzi* y *L. mexicana* (Benaim *et al.*, 2006; Serrano-Martin *et al.*, 2009), asimismo, el cinetoplasto mostró una ligera hinchazón y la presencia de vesículas alrededor de este organelo.

Los amastigotes mostraron alteraciones ultraestructurales, las cuales incluyeron: la presencia de cuerpos lipídicos y la presencia de vacuolas. Estas alteraciones se observaron en los amastigotes de *L. amazonensis* (de Macedo-Silva *et al.*, 2011). La síntesis de la proteína en los promastigotes y amastigotes incubados con la sanguinarina no se afectó. Los ensayos de infección mostraron que los parásitos que fueron incubados con la sanguinarina, de ambos estadios, tuvieron un porcentaje menor de infección, lo que posiblemente nos indica que los mecanismos microbicidas lograron eliminar a los parásitos, ya que estos perdieron la capacidad de regular la vía de señalización de su célula hospedera.

Los flagelos y cilios de eucariontes son organelos altamente conservados que se proyectan de la membrana de muchas células y están involucrados en la motilidad celular. Estas estructuras pueden también presentar proteínas receptoras, proteínas de señalización,

las cuales están involucradas como un mecanismo sensor (Scholey y Anderson, 2006). Estas estructuras contienen un axonema basado en microtúbulos y una membrana especializada que presenta una composición proteica y lipídica diferente a las presentes en las membranas plasmáticas (Vieira *et al.*, 2006).

El ensamblaje y el mantenimiento flagelar son procesos altamente dinámicos que son dependientes del reciclamiento de proteínas de membrana y de la matriz (Rosenbaum y Witman, 2002). Las proteínas de matriz y del axonema son sintetizadas en el citosol y transportadas al flagelo mediante un complejo de proteínas que participa en el transporte intraflagelar; mientras que las proteínas de membrana son sintetizadas en el retículo endoplasmático y son transportadas a las membranas plasmática y flagelar vía el complejo de Golgi.

El estadio móvil de los tripanosomátidos está dado por un flagelo único, el cual emerge de una invaginación de la membrana denominada “bolsillo flagelar”. El flagelo contiene un axonema típico 9+2 de microtúbulos que es soportado por una estructura paracrística llamada red paraflagelar que es importante para la motilidad. El flagelo y el bolsillo flagelar de estos parásitos están involucrados en la motilidad, exocitosis, endocitosis y citocinesis. Las proteínas involucradas en el transporte hacia la membrana han mostrado tener un papel en la regulación del proceso de ensamblaje del flagelo.

Estudios en el laboratorio han demostrado que la proteína fosfatasa PP2C de *L. major* y *L. mexicana* se encuentra localizada en el flagelo y bolsillo flagelar de los promastigotes y los amastigotes, respectivamente (Escalona-Montano *et al.*, 2016). Resultados interesantes se obtuvieron en los parásitos *knock-out* de los promastigotes de *L. mexicana*, pues estos indican que la proteína puede estar regulando la formación del flagelo. Estudios realizados en los promastigotes de *L. mexicana* demostraron que la delección de una subunidad σ de la proteína 1 ocasionó el acortamiento del flagelo (Vince *et al.*, 2008). Estudios similares mediante la inhibición farmacológica o genética de la biosíntesis de esteroides y esfingolípidos resultó, como consecuencia, en defectos en la

biogénesis y la función del flagelo (Zhang *et al.*, 2003). La *Leishmania spp.* contiene además una proteína abundante en la membrana flagelar denominada: proteína-1 pequeña miristoilada (SMP-1). La SMP-1 es una proteína de 15 kDa inicialmente identificada en un análisis proteómico en *L. major*. Esta proteína se localiza exclusivamente en el flagelo y el número de copias estimado es de 10^5 /célula. Estudios recientes han mostrado que la proteína SMP-1 estabiliza la membrana flagelar, asimismo, es requerida para la función y la elongación del flagelo en el proceso de diferenciación de amastigote a promastigote de este parásito.

VIII. CONCLUSIONES

La caracterización bioquímica de las proteínas secretadas en los medios MSP y MSA de ambas formas de crecimiento de *L. mexicana* reveló la presencia de fosfatasas de tirosina y de serina treonina fosfatasas tipo PP2C.

La síntesis proteica de la fosfatasa PP2C en los amastigotes se presentó en condiciones de estrés, ya que, a mayor tiempo de secreción, la expresión de la proteína fue mayor e, interesantemente, la fosfatasa se encuentra localizada de manera importante en el bolsillo flagelar del parásito.

Las proteínas presentes en MSP y MSA indujeron la producción de citocinas, como IL-12p70, TNF α e IL-1 β e IL-10. El mecanismo por el cual se lleva a cabo es desconocido.

Existe una participación diferencial de la PP2C de los promastigotes y los amastigotes en el crecimiento a concentraciones micromolares de la sanguinarina; mientras la actividad enzimática de estos parásitos sólo se afectó en los extractos de los promastigotes. Sin embargo, el porcentaje de infección en macrófagos murinos disminuyó en presencia de parásitos que fueron preincubados con la sanguinarina con respecto a los macrófagos infectados con parásitos no tratados.

La utilización de los parásitos *knok out* permitirá conocer la posible participación de la proteína fosfatasa PP2C en el promastigotes de *L. mexicana*.

IX. LITERATURA CITADA

Abu-Dayyeh, I., Hassani, K., Westra, E.R., Mottram, J.C., Olivier, M. (2010). Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. *Infect Immun* 78(6):2438-2445.

Aburai, N., Yoshida, M., Ohnishi, M., Kimura, K. (2010). Sanguinarine as a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 2C in vitro and induces apoptosis via phosphorylation of p38 in HL60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 74(3):548-552.

Aguirre-García, M.M., Anaya-Ruiz, M., Talamas-Rohana, P. (2003). Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. *Parasitology* 126 (Pt 3):195-202.

Aguirre-García, M.M., Escalona-Montaña, A.R., Bakalara, N., Perez-Torres, A., Gutierrez-Kobeh, L., Becker, I. (2006). *Leishmania major* : detection of membrane-bound protein tyrosine phosphatase. *Parasitology* 132 (Pt5): 641-649.

Alamilla-Fonseca, L.N., Delgado-Dominguez, J., Zamora-Chimal, J., Cervantes-Sarabia, R.B., Jimenez-Arellanes, A., Rivero-Cruz, J.F., Becker, I. (2018). *Leishmania mexicana* cell death achieved by *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Iltis: Learning from Maya healers. *J Ethnopharmacol* 211:180-187.

Andreeva, A.V., Kutuzov, M.A. (2004). Widespread presence of "bacterial-like" PPP phosphatases in eukaryotes. *BMC Evol Biol*: 4, 47.

Anwar, T., Gourinath, S. (2016). Deep Insight into the Phosphatomes of Parasitic Protozoa and a Web Resource ProtozPhosDB. *PLoS One* 8: 11 (12), e0167594.

Argueta-Donohue, J., Carrillo, N., Valdes-Reyes, L., Zentella, A., Aguirre-Garcia, M., Becker, I., Gutierrez-Kobeh, L. (2008). *Leishmania mexicana*: participation of NF-kappaB in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Exp Parasitol* 120(1):1-9.

Arino, J., Casamayor, A., Gonzalez, A. (2011). Type 2C protein phosphatases in fungi. *Eukaryot Cell* 10 (1):21-33.

Barak, E., Amin-Spector, S., Gerliak, E., Goyard, S., Holland, N., Zilberstein, D. (2005). Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. *Mol Biochem Parasitol* 141(1):99-108.

Bates, P.A., Dwyer, D.M. (1987). Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 26(3):289-296.

- Bates, P.A., Hermes, I., Dwyer, D.M. (1989). *Leishmania donovani*: immunochemical localization and secretory mechanism of soluble acid phosphatase. *Exp Parasitol* 68(3): 335-346.
- Benaim, G., Sanders, J.M., Garcia-Marchan, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A.R., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J.M., Leon-Rossell, A., Concepcion, J.L., Schijman, A.G., Levin, M., Oldfield, E., Urbina, J.A. (2006). Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J Med Chem* 49 (3):892-899.
- Berzunza-Cruz, M., Bricaire, G., Salaiza Suazo, N., Perez-Montfort, R., Becker, I. (2009). PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Res* 104(3):691-699.
- Bifeld, E., Clos, J. (2015). The genetics of *Leishmania* virulence. *Medical Microbiol Immunol* 204 (6):619-634.
- Bliska, J.B., Guan, K.L., Dixon, J.E., Falkow, S. (1991). Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(4):1187-1191.
- Borghi, S.M., Fattori, V., Conchon-Costa, I., Pinge-Filho, P., Pavanelli, W.R., Verri, W.A., Jr. (2017). *Leishmania* infection: painful or painless? *Parasitol Res* 116: 465-475.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Burns, J.M., Jr., Parsons, M., Rosman, D.E., Reed, S.G. (1993). Molecular cloning and characterization of a 42-kDa protein phosphatase of *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem* 268: 17155-17161.
- Chang, K.P., Reed, S.G., McGwire, B.S., Soong, L. (2003). *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop* 85 (3):375-390.
- Chauhan, P., Shukla, D., Chattopadhyay, D., Saha, B. (2017). Redundant and regulatory roles for Toll-like receptors in *Leishmania* infection. *Clin Exp Immunol* 190 (2):167-186.
- Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* 4(5): E127-130.
- Corrales, R.M., Sereno, D., Mathieu-Daude, F. (2010). Deciphering the *Leishmania* exoproteome: what we know and what we can learn. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58(1):27-38.

Cosentino-Gomes, D., Meyer-Fernandes, J.R. (2011). Ecto-phosphatases in protozoan parasites: possible roles in nutrition, growth and ROS sensing. *J Bioenerg Biomembr* 43(1):89-92.

Cuervo, P., De Jesus, J.B., Saboia-Vahia, L., Mendonca-Lima, L., Domont, G.B., Cupolillo, E. (2009). Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *J Proteomics* 73(1):79-92.

Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T., Barford, D. (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J* 15(24):6798-6809.

de Macedo-Silva, S.T., de Oliveira Silva, T.L., Urbina, J.A., de Souza, W., Rodrigues, J.C. (2011). Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. *Mol Biol Int.* 2011, 876021.

Dissing, J., Dahl, O., Svensmark, O. (1979). Phosphonic and arsonic acids as inhibitors of human red cell acid phosphatase and their use in affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 569(2):159-176.

Escalona-Montano, A.R., Ortiz-Lozano, D.M., Rojas-Bernabe, A., Wilkins-Rodriguez, A.A., Torres-Guerrero, H., Mondragon-Flores, R., Mondragon-Gonzalez, R., Becker, I., Gutierrez-Kobeh, L., Aguirre-Garcia, M.M. (2016). *Leishmania mexicana*: promastigotes and amastigotes secrete protein phosphatases and this correlates with the production of inflammatory cytokines in macrophages. *Parasitology* 143 (11):1409-142.

Escalona-Montaña, A.R., Pardave-Alejandre, D., Cervantes-Sarabia, R., Garcia-Lopez, P., Gutierrez-Quiroz, M., Gutierrez-Kobeh, L., Becker-Fausser, I., Aguirre-Garcia, M.M. (2010). *Leishmania mexicana* promastigotes secrete a protein tyrosine phosphatase. *Parasitol Res* 107(2):309-315.

Escalona-Montaña, A.R., Pérez-Montfort, R., Cabrera N., Mondragón-Flores, R., Vélez-Ramírez, D.E., Gómez-Sandoval, J.N., Gutiérrez-Kobeh, L., Becker, I., and Aguirre-García, MM. (2012). Protein phosphatase PP2C in the flagellum of *Leishmania major*: Cloning and characterization. *Parasitology open* 3, e15:1-9

Ferguson, M.A. (1997). The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352(1359):1295-1302.

Fernandes, A.C., Soares, D.C., Saraiva, E.M., Meyer-Fernandes, J.R., Souto-Padron, T. (2013). Different secreted phosphatase activities in *Leishmania amazonensis*. *FEMS Microbiol Lett* 340(2):117-128.

- Freitas-Mesquita, A.L., Fonseca-de-Souza, A.L., Meyer-Fernandes, J.R. (2014). *Leishmania amazonensis*: characterization of an ecto-pyrophosphatase activity. *Exp Parasitol* 137:8-13.
- Gilbert, L.A., Ravindran, S., Turetzky, J.M., Boothroyd, J.C., Bradley, P.J. (2007). *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryot Cell* 6(1):73-83.
- Godowski, K.C. (1989). Antimicrobial action of sanguinarine. *J Clin Dent* 1(4):96-101.
- Gomez de Leon, C.T., Diaz Martin, R.D., Mendoza Hernandez, G., Gonzalez Pozos, S., Ambrosio, J.R., Mondragon Flores, R. (2014). Proteomic characterization of the subpellicular cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J Proteomics* 111:86-99.
- Gour, J.K., Kumar, V., Singh, N., Bajpai, S., Pandey, H.P., Singh, R.K. (2012). Identification of Th1-responsive leishmanial excretory-secretory antigens (LESAs). *Exp Parasitol* 132(3):355-361.
- Graf, T.N., Levine, K.E., Andrews, M.E., Perlmutter, J.M., Nielsen, S.J., Davis, J.M., Wani, M.C., Oberlies, N.H. (2007). Variability in the yield of benzophenanthridine alkaloids in wildcrafted vs cultivated bloodroot (*Sanguinaria canadensis* L.). *J Agric Food Chem* 55(4):1205-1211.
- Graner, M.W., Alzate, O., Dechkovskaia, A.M., Keene, J.D., Sampson, J.H., Mitchell, D.A., Bigner, D.D. (2009). Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB journal : official publication of the FASEB J* 23(5):1541-1557.
- Hernandez-Rivera, M.P., Hernandez-Montes, O., Chinas-Perez, A., Batiza-Avelar, J.M., Sanchez-Tejeda, G., Wong-Ramirez, C., Monroy-Ostria, A. (2015). Study of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche (Yucatan Peninsula), Mexico, over a period of two years. *Salud Publica Mex* 57(1):58-65.
- Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C., Haldar, K. (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* 306(5703):1934-1937.
- Hossain, M., Khan, A.Y., Suresh Kumar, G. (2011). Interaction of the anticancer plant alkaloid sanguinarine with bovine serum albumin. *PLoS One* 6(4): e18333.
- Ismaeel, A.Y., Garmson, J.C., Molyneux, D.H., Bates, P.A. (1998). Transformation, development, and transmission of axenically cultured amastigotes of *Leishmania mexicana* in vitro and in *Lutzomyia longipalpis*. *Am J Trop Med Hyg* 59(3):421-425.
- Isnard, A., Shio, M.T., Olivier, M. (2012). Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 72.

- Joshi, M., Jeoung, N.H., Popov, K.M., Harris, R.A. (2007). Identification of a novel PP2C-type mitochondrial phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 356(1):38-44.
- Kaufner, A., Ellis, J., Stark, D., Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasit Vectors* 10(1):287.
- Kutuzov, M.A., Andreeva, A.V. (2008). Protein Ser/Thr phosphatases of parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 161(2):81-90.
- Lai, S.M., Le Moual, H. (2005). PrpZ, a *Salmonella enterica* serovar Typhi serine/threonine protein phosphatase 2C with dual substrate specificity. *Microbiology* 15 (Pt 4):1159-1167.
- Lenfeld, J., Kroutil, M., Marsalek, E., Slavik, J., Preininger, V., Simanek, V. (1981). Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*. *Planta Med* 43 (2):161-165.
- Lodge, R., Descoteaux, A. (2008). *Leishmania* invasion and phagosome biogenesis. *Subcell Biochem* 47:174-181.
- Maiti, M., Kumar, G.S. (2007). Molecular aspects on the interaction of protoberberine, benzophenanthridine, and aristolochia group of alkaloids with nucleic acid structures and biological perspectives. *Med Res Rev* 27(5):649-695.
- Martinez-Calvillo, S., Stuart, K., Myler, P.J. (2005). Ploidy changes associated with disruption of two adjacent genes on *Leishmania major* chromosome 1. *Int J Parasitol* 35(4): 419-429.
- McConville, M.J., Blackwell, J.M. (1991). Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem* 266(23): 15170-15179.
- McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A., Sacks, D.L. (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J* 11(10): 3593-3600.
- McConville, M.J., Schnur, L.F., Jaffe, C., Schneider, P. (1995.) Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J* 310 (Pt 3):807-818.
- McConville, M.J., Ralton, J.E. (1997). Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of *Leishmania* parasites. *Behring Inst Mitt*(99): 34-43.
- McConville, M.J., Mullin, K.A., Ilgoutz, S.C., Teasdale, R.D. (2002). Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(1): 122-154;

Moorhead, G.B., Trinkle-Mulcahy, L., Ulke-Lemee, A. (2007). Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3): 234-244.

Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577.

Nandan, D., Yi, T., Lopez, M., Lai, C., Reiner, N.E. (2002). *Leishmania* EF-1 α activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. *J Biol Chem* 277(51): 50190-50197.

Nascimento, M., Abourjeily, N., Ghosh, A., Zhang, W.W., Matlashewski, G. (2003). Heterologous expression of a mammalian protein tyrosine phosphatase gene in *Leishmania*: effect on differentiation. *Mol Microbiol* 50(5): 1517-1526.

Neves, R.F., Fernandes, A.C., Meyer-Fernandes, J.R., Souto-Padron, T. (2014). *Trypanosoma cruzi*-secreted vesicles have acid and alkaline phosphatase activities capable of increasing parasite adhesion and infection. *Parasitol Res* 113:2961-2972.

Nguyen, D.G., Booth, A., Gould, S.J., Hildreth, J.E. (2003). Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* 278(52): 52347-52354.

Pullen, K.E., Ng, H.L., Sung, P.Y., Good, M.C., Smith, S.M., Alber, T. (2004). An alternate conformation and a third metal in PstP/Ppp, the *M. tuberculosis* PP2C-Family Ser/Thr protein phosphatase. *Structure* 12(11):1947-1954.

Rantanen, M.K., Lehtio, L., Rajagopal, L., Rubens, C.E., Goldman, A. (2007). Structure of *Streptococcus agalactiae* serine/threonine phosphatase. The subdomain conformation is coupled to the binding of a third metal ion. *FEBS J* 274(12):3128-3137.

Rogers, J.P., Beuscher, A.E.t., Flajolet, M., McAvoy, T., Nairn, A.C., Olson, A.J., Greengard, P. (2006). Discovery of protein phosphatase 2C inhibitors by virtual screening. *J Med Chem* 49(5):1658-1667.

Rojas-Bernabe, A., Garcia-Hernandez, O., Maldonado-Bernal, C., Delegado-Dominguez, J., Ortega, E., Gutierrez-Kobeh, L., Becker, I., Aguirre-Garcia, M. (2014). *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. *Parasitology* 141(6):788-800.

Rosenbaum, J.L., Witman, G.B. (2002). Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* 3:813-825.

Sacks, D., Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Ann Rev Microbiol* 55:453-483.

- Sacks, D.L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 69(1): 100-103.
- Sanchez-Tejeda, G., Rodriguez, N., Parra, C.I., Hernandez-Montes, O., Barker, D.C., Monroy-Ostria, A. (2001). Cutaneous leishmaniasis caused by members of *Leishmania* complex in Nayarit, State of Mexico. *Mem Instit Oswaldo Cruz* 96(1):15-19.
- Santarem, N., Silvestre, R., Tavares, J., Silva, M., Cabral, S., Maciel, J., Cordeiro-da-Silva, A. (2007). Immune response regulation by leishmania secreted and nonsecreted antigens. *J Biomed Biotechnol* 2007(6), 85154.
- Satou, T., Akao, N., Matsushashi, R., Koike, K., Fujita, K., Nikaido, T. (2002). Inhibitory effect of isoquinoline alkaloids on movement of second-stage larvae of *Toxocara canis*. *Biol Pharm Bull* 25 (12):1651-1654.
- Scholey, J.M., Anderson, K.V. (2006). Intraflagellar transport and cilium-based signaling. *Cell* 125 (3):439-442.
- Schweighofer, A., Hirt, H., Meskiene, I. (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* 9(5):236-243.
- Sen, A., Maiti, M. (1994). Interaction of sanguinarine iminium and alkanolamine form with calf thymus DNA. *Biochem Pharmacol* 48(11):2097-2102.
- Serrano-Martin, X., Garcia-Marchan, Y., Fernandez, A., Rodriguez, N., Rojas, H., Visbal, G., Benaim, G. (2009). Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother* 53(4): 1403-1410.
- Sharma, A.K., Arora, D., Singh, L.K., Gangwal, A., Sajid, A., Molle, V., Singh, Y., Nandicoori, V.K. (2016). Serine/Threonine Protein Phosphatase PstP of *Mycobacterium tuberculosis* Is Necessary for Accurate Cell Division and Survival of Pathogen. *J Biol Chem* 291(46):24215-24230.
- Silverman, J.M., Clos, J., de'Oliveira, C.C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L.J., Reiner, N.E. (2010). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *JCell Sci* 123(Pt6):842-852.
- Silverman, J.M., Chan, S.K., Robinson, D.P., Dwyer, D.M., Nandan, D., Foster, L.J., Reiner, N.E. (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol* 9 (2):R35.
- Silverman, J.M., Reiner, N.E. (2011). *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Front Cell Infect Microbiol* 1, 26.

- Singla, N., Khuller, G.K., Vinayak, V.K. (1992). Acid phosphatase activity of promastigotes of *Leishmania donovani*: a marker of virulence. *FEMS Microbiol Lett* 73(3):221-225.
- Sugimoto, H., Kondo, S., Tanaka, T., Imamura, C., Muramoto, N., Hattori, E., Ogawa, K., Mitsukawa, N., Ohto, C. (2014). Overexpression of a novel Arabidopsis PP2C isoform, AtPP2CF1, enhances plant biomass production by increasing inflorescence stem growth. *J Exp Bot* 65 (18):5385-5400.
- Sundar, S., Chakravarty, J. (2010). Antimony toxicity. *Int J Environ Res Public Health* 7: 4267-4277.
- Swingle, M., Ni, L., Honkanen, R.E. (2007). Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Methods Mol Biol* 365:23-38.
- Tabatabaee, P.A., Abolhassani, M., Mahdavi, M., Nahrevanian, H., Azadmanesh, K. (2011). *Leishmania major*: secreted antigens of *Leishmania major* promastigotes shift the immune response of the C57BL/6 mice toward Th2 in vitro. *Exp Parasitol* 127(1):46-51.
- Theriault, C., Richard, D. (2017). Characterization of a putative *Plasmodium falciparum* SAC1 phosphoinositide-phosphatase homologue potentially required for survival during the asexual erythrocytic stages. *Sci Rep* 7(1):12710.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D., Bron, S., van Dijl, J.M. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(3):515-547.
- Tonks, N.K. (2003). PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett.* 546(1):140-8
- Torres-Santos, E.C., Rodrigues, J.M., Jr., Moreira, D.L., Kaplan, M.A., Rossi-Bergmann, B. (1999). Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly(D,L-lactide) nanoparticles. *Antimicrob Agents Chemother* 43(7):1776-1778.
- Trocoli Torrecilhas, A.C., Tonelli, R.R., Pavanelli, W.R., da Silva, J.S., Schumacher, R.I., de Souza, W., NC, E.S., de Almeida Abrahamsohn, I., Colli, W., Manso Alves, M.J. (2009). *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect* 11 (1):29-39.
- van Ooij, C., Tamez, P., Bhattacharjee, S., Hiller, N.L., Harrison, T., Liolios, K., Kooij, T., Ramesar, J., Balu, B., Adams, J., Waters, A.P., Janse, C.J., Haldar, K. (2008). The malaria secretome: from algorithms to essential function in blood stage infection. *PLoS Pathog* 4(6):e1000084.

van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal Immunology* 173(11):6521-6525.

Vannier-Santos, M.A., Martiny, A., Meyer-Fernandes, J.R., de Souza, W. (1995). *Leishmanial* protein kinase C modulates host cell infection via secreted acid phosphatase. *Eur J Cell Biol* 67(2):112-119.

Vieira, O.V., Gaus, K., Verkade, P., Fullekrug, J., Vaz, W.L., Simons, K. (2006). FAPP2, cilium formation, and compartmentalization of the apical membrane in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(49):18556-18561.

Vince, J.E., Tull, D.L., Spurck, T., Derby, M.C., McFadden, G.I., Gleeson, P.A., Gokool, S., McConville, M.J. (2008). *Leishmania* adaptor protein-1 subunits are required for normal lysosome traffic, flagellum biogenesis, lipid homeostasis, and adaptation to temperatures encountered in the mammalian host. *Eukaryot Cell* 7(8):1256-1267.

Wang, B., Zhang, P., Wei, Q. (2008a). Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases. *Sci China C Life Sci* 51(6):487-494.

Wang, G.J., Liu, Y., Qin, A., Shah, S.V., Deng, Z.B., Xiang, X., Cheng, Z., Liu, C., Wang, J., Zhang, L., Grizzle, W.E., Zhang, H.G. (2008b). Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells. *J Immunol* 181(8):5242-5248.

Wera, S., Hemmings, B.A. (1995). Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemical J* 311(Pt 1):17-29.

Wheeler, R.J., Gluenz, E., Gull, K. (2013). The limits on trypanosomatid morphological diversity. *PLoS One* 8(11):e79581.

Zhang, K., Showalter, M., Revollo, J., Hsu, F.F., Turk, J., Beverley, S.M. (2003). Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in *Leishmania*. *The EMBO J* 22(22):6016-6026.

Zhang, M., Mishra, S., Sakthivel, R., Fontoura, B.M., Nussenzweig, V. (2016). UIS2: A Unique Phosphatase Required for the Development of *Plasmodium Liver* Stages. *PLoS Pathog* 12(1):e1005370.

X. ANEXOS

ANEXO I (ARTÍCULO REQUISITO)

Escalona-Montaño, A. R., Ortiz-Lozano, D. M., Rojas-Bernabé, A., Wilkins-Rodríguez, A. A., Torres-Guerrero, H., Mondragón-Flores, R., Mondragón-González, R., Becker, I., Gutiérrez-Kobeh, L., Aguirre-García, M. M. (2016). *Leishmania mexicana*: Promastigotes and Amastigotes Secrete Protein Phosphatases and this Correlates with the Production of Inflammatory Cytokines in Macrophages.: *Parasitology*, 143(11), 1409-20.
Doi: 10.1017/S0031182016000949.

Leishmania mexicana: promastigotes and amastigotes secrete protein phosphatases and this correlates with the production of inflammatory cytokines in macrophages

A. R. ESCALONA-MONTAÑO¹, D. M. ORTIZ-LOZANO¹, A. ROJAS-BERNABÉ¹, A. A. WILKINS-RODRIGUEZ¹, H. TORRES-GUERRERO¹, R. MONDRAGÓN-FLORES², R. MONDRAGÓN-GONZALEZ³, I. BECKER¹, L. GUTIÉRREZ-KOBEH¹ and M. M. AGUIRRE-GARCIA^{1*}

¹ Facultad de Medicina, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México

² Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México, DF, México

³ Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México, DF, México

(Received 19 January 2016; revised 21 April 2016; accepted 24 April 2016; first published online 25 May 2016)

SUMMARY

Phosphatase activity of *Leishmania* spp. has been shown to deregulate the signalling pathways of the host cell. We here show that *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes secrete proteins with phosphatase activity to the culture medium, which was higher in the Promastigote Secretion Medium (PSM) as compared with the Amastigote Secretion Medium (ASM) and was not due to cell lysis, since parasite viability was not affected by the secretion process. The biochemical characterization showed that the phosphatase activity present in PSM was higher in dephosphorylating the peptide END (pY) INASL as compared with the peptide RRA (pT)VA. In contrast, the phosphatase activity in ASM showed little dephosphorylating capacity for both peptides. Inhibition assays demonstrated that the phosphatase activity of both PSM and ASM was sensible only to protein tyrosine phosphatases inhibitors. An antibody against a protein phosphatase 2C (PP2C) of *Leishmania major* cross-reacted with a 44·9 kDa molecule in different cellular fractions of *L. mexicana* promastigotes and amastigotes, however, in PSM and ASM, the antibody recognized a protein about 70 kDa. By electron microscopy, the PP2C was localized in the flagellar pocket of amastigotes. PSM and ASM induced the production of tumor necrosis factor alpha, IL-1 β , IL-12p70 and IL-10 in human macrophages.

Key words: *Leishmania mexicana*, protein tyrosine phosphatase, protein phosphatase PP2C, inflammatory cytokines.

INTRODUCTION

In Mexico, *Leishmania mexicana* parasites cause cutaneous leishmaniasis (CL), resulting in localized cutaneous leishmaniasis (LCL) or diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). This parasite is a digenetic protozoan that is transmitted to the mammalian host by sandflies of the genus *Lutzomyia* in the New World. In the alimentary tract of the insect vector, the parasites are found as extracellular flagellated promastigotes. During the insect blood meal, infective promastigotes are injected into the dermis of the mammalian host and phagocytosed by resident macrophages where they are differentiated into non-motile amastigotes that multiply within them. In addition to macrophages, other cells such as dendritic cells (DCs) and fibroblasts may also harbour parasites (Solbach and Laskay, 2000).

* Corresponding author: Facultad de Medicina, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, UNAM, Dr. Balmis 148, Colonia Doctores, México, DF 06726, México. E-mail: maguirre@unam.mx

Leishmania promastigotes are known to synthesize and traffic most surface molecules such as lipophosphoglycan (LPG), surface protease gp63 and acid phosphatases (McConville *et al.* 2002). LPG and gp63 have been widely studied and are considered *Leishmania* virulence factors (McConville and Blackwell, 1991). Our group previously reported that *L. mexicana* LPG induced a differential production of cytokines in human DCs and monocytes (Argueta-Donohue *et al.* 2008). Additionally, we found that *L. mexicana* LPG activates ERK and p38 MAP kinase in macrophages and induces pro-inflammatory cytokine production through TLR2 and TLR4 signalling (Rojas-Bernabe *et al.* 2014).

It is well known that *Leishmania* species secrete proteins and other molecules that affect the host immune system facilitating the infection process (Santarem *et al.* 2007). In this regard, Silverman *et al.* identified 151 proteins from *Leishmania donovani* that were actively secreted and whose general properties allowed them to postulate potential mechanisms of secretion as well as functional roles within the infection (Silverman *et al.* 2008).

Additionally, to these secreted proteins, other proteins of the sandfly saliva play an important role in the establishment of the infection (Rohousova *et al.* 2005; Santarem *et al.* 2007).

Other proteins present in *Leishmania* parasites are phosphatases, which have been identified as virulence factors in many pathogenic microorganisms such as virus, bacteria and parasites (Bliska *et al.* 1991; Shibata *et al.* 1994; Green *et al.* 1995). Phosphatases are enzymes that remove phosphate groups from amino acid residues of proteins and are classified in terms of substrate specificity in: protein tyrosine phosphatases (PTPs) and serine/threonine phosphatases, which can be subdivided in phosphoprotein phosphatases (PPP) and metal-dependent protein phosphatases (PPM), which include protein phosphatase 2C (PP2C).

In *Leishmania* different PTPs have been reported to play a role in the pathogenesis of this parasite through the activation of PTPs of the host cells (Blanchette *et al.* 1999).

Previously, we reported the presence of a membrane-bound PTP in *Leishmania major* promastigotes. We cloned and sequenced the gene, purified and characterized the protein phosphatase 2C and determined by immunolocalization that the molecule is present in the flagellum of promastigotes (manuscript in preparation). Also, we have reported that *L. mexicana* promastigotes are able to secrete a PTP activity in the culture medium (CM) (Escalona-Montaño *et al.* 2010).

The vast majority of studies involving *Leishmania* membrane-bound or secreted molecules have been done with the promastigote, although the amastigote is responsible for maintaining and spreading infection within the host.

In the present work, we give evidence that *L. mexicana* promastigotes and amastigotes are able to secrete a PTP and PP2C in the CM. The phosphatase activity secreted in the CM was higher in promastigotes as compared with the activity secreted by amastigotes. The phosphatase activity secreted by both morphological stages was inhibited by specific PTP inhibitors. On the other hand, the ultrastructural localization of PP2C in *L. mexicana* amastigotes showed that it is present in the flagellar pocket. Finally, we show that the secreted proteins of promastigotes and amastigotes induced the production of inflammatory cytokines in human macrophages.

MATERIALS AND METHODS

Parasite culture

Leishmania mexicana strains MHOM/MX/92/UADY 68 and MHOM/MX/2011/Lacandona were used throughout experiments. MHOM/MX/92/UADY 68 strain was a generous gift from

Dr Fernando Andrade, Centro de Investigaciones Regionales 'Dr Hideyo Noguchi' from Universidad Autónoma de Yucatán and culture conditions were previously reported (Escalona-Montaño *et al.* 2010). MHOM/MX/2011/Lacandona was used throughout the experiments. The strain was isolated from a Mexican patient diagnosed with LCL after returning from a trip to the Lacandona rainforest region of the Mexican State of Chiapas. Informed written consent was obtained from the patient and a 3 mm punch biopsy was taken from the active edge of the skin ulcer after previous asepsis and local anaesthesia administration. A fragment of the biopsy was homogenized in phosphate-buffered saline (PBS) by grinding the tissue with a pestle in a 1.5 mL conical tube to release amastigotes from infected cells. The resultant homogenate was inoculated subcutaneously in the right hind footpad of BALB/c mice. After lesion development, amastigotes were isolated from infected footpads and cultured as axenic amastigotes at 33 °C in Schneider's *Drosophila* insect cell CM (Sigma, St. Louis, MO, USA), pH 5.4, supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U mL⁻¹ penicillin G and 100 µg mL⁻¹ streptomycin (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY, USA), as previously described (Wilkins-Rodriguez *et al.* 2010). Promastigotes were transformed from footpad-derived amastigotes and cultured at 26 °C in medium 199, pH 7.2, supplemented with 10% FBS, 100 U mL⁻¹ penicillin G, 100 µg mL⁻¹ streptomycin, 2 mM L-glutamine and 1% BME vitamins (Gibco-Life Technologies). The isolated strain was identified as *L. mexicana* by PCR amplification of a *L. mexicana*-specific sequence of the internal transcribed spacer of the ribosomal RNA gene, as previously reported (Berzunza-Cruz *et al.* 2009). Infectivity of the strain was maintained by regular passage through BALB/c mice.

Leishmania secreted proteins

Promastigotes. Promastigote secreted phosphatases were analysed according to Escalona-Montaño *et al.* (2010). Briefly, *L. mexicana* promastigotes strain MHOM/MX/92/UADY 68 were cultured during 5 days, after which the parasites were washed two times with 199 medium without FBS. The parasites were incubated (50×10^6 parasites mL⁻¹) in medium 199 free of serum, tyrosine and phosphate) for 1, 3, 5 and 7 h at 26 °C. After each time, parasites were harvested by centrifugation at 2000 g for 10 min at 4 °C. Supernatants were centrifuged at 11 000 g for 15 min and concentrated 10-fold by pressure ultrafiltration using an Amicon system with 10-kDa ultrafiltration regenerated cellulose membrane (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Since *L. mexicana* strain 68 showed optimal secretion at 7 h, this time point was also used for the Lacandona strain in all the experiments with promastigotes. Concentrated

medium is referred as Promastigotes Secretion Medium (PSM⁷).

Amastigotes. *Leishmania mexicana* strain MHOM/MX/2011/Lacandona amastigotes were cultured during seven days, after which the parasites were washed two times with Schneider's *Drosophila* medium (SDM), without FBS. The parasites were incubated (50×10^6 parasites 0.5 mL^{-1}) in SDM free of serum, tyrosine and phosphate for 0.25, 1, 3 and 5 h at 33 °C. The parasites were harvested by centrifugation at 2000 *g* for 10 min at 4 °C in each time. Cell-free supernatant was concentrated 10-fold by pressure ultrafiltration using an Amicon system with 10-kDa ultrafiltration regenerated cellulose membranes (Millipore Corp.). This concentrated medium is referred as Amastigotes Secretion Medium (ASM¹). PSM⁷ and ASM¹ were used in the different assays. Viability of promastigotes and amastigotes was analysed by erythrosin B, a vital dye used to determine cell viability. Viable cells actively exclude the dye, while nonviable cells (those whose plasma membrane is damaged) take up the dye and appear red (Ruffolo *et al.* 1986). CM without parasites was used as negative control for all assays. The protein concentration of PSM⁷ and ASM¹ was determined by the Bradford method with bovine serum albumin (BSA) as standard (Bradford, 1976).

Mice. BALB/c mice were purchased from Charles Rivers Laboratories (Wilmington, MA, USA) and bred at the animal facility of the Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM following the national guidelines for animal care. Mice were used at 8–10 weeks of age and all the procedures for the experiments were approved by the Ethics Committee of the Facultad de Medicina, UNAM.

Phosphatase activity assays

***p*-NPP substrate.** Acid phosphatase activity was determined as described by Dissing *et al.* (1979). Briefly, 1 μg of PSM⁷ protein, obtained after 7 h secretion [PSM^(1/7)] and 2 μg of ASM¹ protein obtained after 1 h secretion [ASM^(2/1)] were incubated in buffer (200 mM sodium acetate pH 5) + 10 mM of *p*-nitrophenyl phosphate [*p*-NPP] in a final volume of 100 μL for 60 min at 37 °C. Afterwards, the reaction was stopped with 20 μL of 2 N NaOH. The absorbance at 405 nm was read using a microtitre plate reader.

Phosphopeptides. Tyrosine and serine/threonine phosphatase activity was assayed using Promega's (non-radioactive tyrosine phosphatase assay system). The release of inorganic phosphate (P_i), was monitored by measuring the absorbance of

the molybdate–malachitegreen–phosphate complex. PSM^(1/7) or ASM^(2/1) were incubated in a total volume of 100 μL of assay buffer containing 200 mM sodium acetate pH 5. The reaction was started by adding 50 μM Tyr phosphopeptide-1 substrate [END (pY) INASL], 50 μM Thr [RRA (pT)VA] during 30 min at room temperature (RT) and was stopped with 50 μL molybdate dye/additive mixture. The optical density of the samples was read at 630 nm, using a curve of phosphates as standard (Aguirre-Garcia *et al.* 2006).

Effect of inhibitors of phosphatases in PSM^(1/7) and ASM^(2/1)

The phosphatase activity of PSM^(1/7) and ASM^(2/1) was analysed in presence of specific PTP inhibitors such as 200 μM sodium orthovanadate, 200 μM ammonium molybdate and 200 μM sodium tungstate. Additionally, serine/threonine phosphatase inhibitors were tested such as 100 μM trifluoperazine and 1 μM okadaic acid. Also, sanguinarine, a specific inhibitor for PP2C, was used at a concentration of 20 μM . For the inhibition assays, 100 μL of the reaction mixture was pre-incubated for 15 min at RT before adding the *p*-NPP substrate (all reagents of Sigma-Aldrich) and were incubated thereafter for another 60 min at 37 °C. Afterwards, the reaction was stopped with 20 μL of 2 N NaOH. The absorbance at 405 nm was read using a microtitre plate reader.

Total extracts of promastigotes and amastigotes

After the secretion process 3.5×10^9 promastigotes and 2.5×10^6 amastigotes were harvested by centrifugation at 2000 *g* for 10 min and then washed three times with PBS. The pellet containing the parasites was suspended in cold lysis buffer (10 mM Imidazole pH 7.2, 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aprotinin, 2 mM benzamidine) and then sonicated [total extract (TE)]. The TE was centrifuged in order to separate a cytosolic fraction (CF) and a membrane fraction (MF). The protein contents of the TE, CF and MF was quantified by the Bradford method and adjusted to 10 μg of protein.

Western blot analysis

In our laboratory, a PP2C of *L. major* was cloned, the recombinant protein was purified (*Lm*PP2C) and antibodies against the recombinant protein were generated (α -*Lm* PP2C). Both *Lm*PP2C and α -*Lm* PP2C were used in this work (manuscript in preparation).

PSM⁷ and ASM¹ were precipitated with acetone at a 1:10 ratio. Afterwards, 5 μg of the TE, SF, MF and 1 μg of *Lm* PP2C were used in this experiment. The samples were analysed by sodium

dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis in 10% acrylamide gels and then electrotransferred onto immobilon-P transfer membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were washed with TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20) and membranes were blocked by treatment with 5% milk in TBS-T for 1 h. They were then immunoblotted with an antibody against the PP2C of *L. major* at a 1:1000 dilution in 1% milk in TBS-T overnight at 4 °C. After 1 h of washing with TBS-T, membranes were incubated with secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cell Signaling, Danvers MA, USA) at a 1:5000 dilution in TBST with 3% of milk) and washed ten times in TBS-T. Bands were detected using enhanced chemiluminescent substrate (Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford IL, USA), according to the manufacturer's instructions.

Macrophages differentiation from peripheral blood monocytes

Peripheral blood monocytes were obtained from voluntary healthy donors. Peripheral blood mononuclear cells were separated by using Ficoll-Hypaque (Sigma) density gradient centrifugation at 300 g for 20 min at 20 °C, and suspended in pyrogen-free and sterile PBS pH 7.2. They were then incubated with CD14 MACS microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) during 15 min and purified by magnetic sorting. CD14⁺ monocytes (1×10^6) were washed and left overnight in pyrogen-free and sterile RPMI-1640 medium (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, USA) supplemented with 10% (v/v) FBS and 2 mM L-glutamine (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). They were then cultured in six-well tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA, USA) for 5 days at 37 °C, with 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Cell viability was assessed using Alamar Blue (Gregoraszczyk *et al.* 2015). After a 4 h-incubation of the cells with the dye, the absorbance of the medium was measured at 570 and 600 nm using a microplate reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) (data not shown).

Cytokine assays

Human macrophages were plated at a concentration of 1×10^6 in 1 mL of RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS during 24 h at 37 °C and 5% CO₂ in 24-well culture plates (Corning Life Sciences, NY, USA). Macrophages were incubated under different conditions: with PSM⁷, ASM¹ or RPMI medium (C) for 24 h. For positive controls, cells were stimulated with 100 ng mL⁻¹ of lipopolysaccharide for 24 h. Cell-free

culture supernatants were harvested and the concentrations of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-1 β , IL-12p70 and IL-10 were determined by standard sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to BD-Pharmingen Cytokine ELISA Protocol. In brief, 96-well microtitre plates (Costar, Corning, NY, USA) were coated with an unconjugated anti-TNF- α capture antibody (clone Mab1, 6 μ g mL⁻¹), anti-IL-1 β (clone Mab 1, 4 μ g mL⁻¹), anti-IL-10 capture antibody (clone JES3-19F1, 4 μ g mL⁻¹) and anti-IL-12 p70 (clone 20C2, 2 μ g mL⁻¹) in 100 mM Na₂HPO₄, pH 9 for 12 h at 4 °C, and blocked with PBS pH 7.4, supplemented with 5% casein, dissolved in 0.1 N NaOH. Cell supernatants and the standard curves prepared with recombinant hTNF- α , hIL-1 β , hIL-10, hIL-12p70 were incubated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS for 2 h at RT. Bound human TNF- α , IL-1 β , IL-12 p70 were detected using a biotinylated anti-mouse antibody in 1% BSA for 1 h. Human IL-10 was detected using a biotinylated rat anti-hIL-10. All antibodies and recombinant cytokines were from BD-Pharmingen (San Jose, CA, USA). The plate was developed using streptavidin-alkaline phosphatase conjugate with *p*-nitrophenyl phosphate 5.0 μ g mL⁻¹) (Life Technologies) as substrate. Plates were read at 405 nm using a microtiter (BioTek Instruments Inc.) and the concentrations were calculated from the standard curves. The concentration of each sample was calculated by regression analysis using the mean absorbance (based on the average of triplicates of each sample). After the time incubations, the viability of the human macrophages was tested by alamar blue (data not shown).

Immunolocalization of PP2C by immune electron microscopy (IEM)

Detection of the PP2C in the amastigote of *L. mexicana* was achieved by electron microscopy (Gomez de Leon *et al.* 2014). Briefly, amastigotes were washed with PBS and fixed with a mixture of 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in PBS for 1 h at RT. Once washed, the amastigotes were gradually dehydrated in ethanol and then embedded in LR White resin (London Resin, Polysciences, Inc. USA). Amastigotes in resin were deposited in plastic moulds and were polymerized overnight, under ultraviolet light, at 4 °C. Thin sections of the blocks were obtained in an ultracut E ultramicrotome (Reichert Jung, Austria) and then mounted on Formvar-covered nickel grids. Immunogold labelling was carried out by flotation of the mounted sections on drops of the respective solutions; unspecific labelling was diminished by incubation with 1% skim milk and PBS-T (PBS and 0.05% Tween-20) for 30 min. Grids with the sections were incubated with the antibody against the PP2C of *L. major* at

a 1:10 dilution in PBS-MT for 1 h at RT and overnight at 4 °C. Grids were washed with PBS-T and then incubated with a goat anti-rabbit polyclonal antibody coupled to 10 nm gold particles for 2 h at RT (Zymed, Thermo Scientific, PA, USA) (1:40 dilution in PBS-T). After thorough washings in PBS and distilled water, sections were contrasted with 2% uranyl acetate and a saturated solution of lead citrate and then examined with a transmission electron microscope (TEM, JEOL 1400×, JEOL Ltd., Japan). As negative control, sections were incubated with pre-immune rabbit serum diluted in PBS-T and then with the secondary antibody coupled to gold particles.

The identification of the subcellular structures positive for PP2C was performed using thin sections of parasites that were processed to preserve the ultrastructure as reported by (Gomez de Leon *et al.* 2014). Briefly, amastigotes were fixed for 1 h in 2.5% glutaraldehyde. After through rinsing in PBS, parasites were post fixed for 1 h in 1% OsO₄ at 4 °C, rinsed, gradually dehydrated in ethanol, and finally embedded in Spurr's resin. Thin sections were obtained with an Ultracut E ultramicrotome and stained with uranyl acetate and lead citrate. Copper grids with the sections were examined in the TEM at 80 keV. Digital images were obtained and processed with Adobe Photoshop software (USA).

Statistical analysis

All data are expressed as mean ± SD (standard deviation). Statistical evaluation of the data was performed by the Mann–Whitney *U*-test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Phosphatase activity secreted by promastigotes and amastigotes from *L. mexicana*

According to our previous results with *L. mexicana* strain 68 (Escalona-Montaño *et al.* 2010), *promastigotes* showed optimal secretion of phosphatase activity after 7 h of incubation showing high phosphatase activity (Fig. 1A). The activity of the phosphatase secreted by amastigotes of *L. mexicana* 68 strain was highest after 1 h of incubation, yet it was much lower as compared with the activity found in promastigotes (Fig. 1B). Analysis of the phosphatase activity of PSM^(1/7) and ASM^(2/1) in the Lacandona strain showed that the enzymatic activity of PSM^(1/7) was higher as compared with that observed in the ASM^(2/1) (Fig. 1C). The secreted phosphatase activity was not due to parasite lysis, since the viability was analysed in both strains showing that the parasites were not affected (Fig. 1D).

Biochemical characterization of phosphatases secreted by promastigotes and amastigotes

Substrate. PSM^(1/7) and ASM^(2/1) were analysed for PTP activity using phosphotyrosine as a substrate. As shown in Fig. 2A, PSM^(1/7) showed a higher dephosphorylation (55 *p* moles phosphate min⁻¹ μg protein⁻¹) in comparison with ASM^(2/1), which only showed a minor dephosphorylation (7 *p* moles phosphate min⁻¹ μg protein⁻¹). However, after analysing the serine/threonine activity using phosphothreonine as a substrate, PSM^(1/7) and ASM^(2/1) showed minor dephosphorylation both cases: 15 and 4 *p* moles phosphate min⁻¹ μg protein⁻¹, respectively (Fig. 2A).

Inhibitors for different PTPs and serine/threonine phosphatases. The effect of different PTP and serine/threonine phosphatase inhibitors on phosphatase activity present in PSM^(1/7) and ASM^(2/1) were tested. We observed that the phosphatase activity present in PSM^(1/7) was completely inhibited by specific PTP inhibitors such as sodium orthovanadate (95%), sodium tungstate (96%) and ammonium molybdate (98%) (Fig. 2B). In contrast serine/threonine inhibitors such as okadaic acid, trifluoperazine and sanguinarine did not show any inhibitory effect (Fig. 2C). The percentages of inhibition of the phosphatase activity of ASM^(2/1) were 45% for sodium orthovanadate, 24% for sodium tungstate and 26% for ammonium molybdate (Fig. 2B). On the other hand, serine/threonine inhibitors showed a very low effect on ASM^(2/1) phosphatase activity (Fig. 2C).

Detection of PP2C in secreted proteins and extracts of *L. mexicana* promastigotes and amastigotes

Previously our group reported that a monoclonal antibody anti-human placental PTP1B recognized a 50 kDa molecule secreted by promastigotes to the CM (Escalona-Montaño *et al.* 2010). In this work, we used an antibody against the PP2C of *L. major* and it recognized a 70 kDa molecule secreted by PSM⁷ and ASM¹ (Fig. 3A, lanes 4 and 8, respectively).

TE of promastigotes and amastigotes were prepared after the secretion process and centrifuged in order to separate the CF from the MF. TE (Fig. 3A, lanes 1 and 5) and CF (Fig. 3A, lanes 2 and 6) from promastigotes and amastigotes were analysed with an antibody anti-*L. major* PP2C. In this cellular fraction, a 44.9 kDa molecule was identified. This molecule has a similar molecular weight as the recombinant protein PP2C from *L. major* (Fig. 3A, lane 9).

Amastigotes were left to secrete proteins to the CM for different times: 0, 1 and 5 h, afterwards a TE, CF and MF were prepared and analysed with the antibody anti-*L. major* PP2C that recognized a molecule of 44.9 kDa in TE (Fig. 3B, lanes d

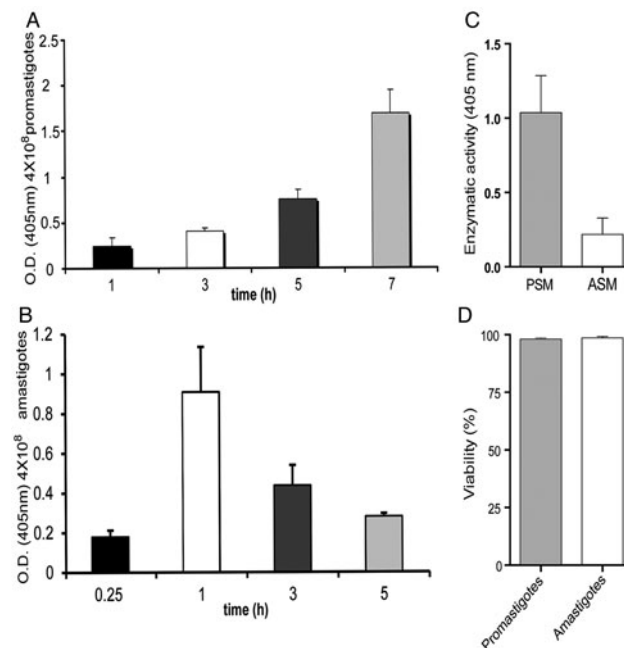


Fig. 1. Secretion of phosphatases by *L. mexicana* promastigotes and amastigotes to the culture medium. (A) Secretion of phosphatase by *L. mexicana* promastigotes 68 strain to the culture medium (PSM) at different times (1, 3, 5, and 7 h). This figure is reprinted with permission from Escalona-Montaña *et al.* (2010); (B) Secretion of phosphatases by *L. mexicana* amastigotes 68 strain, ASM at different times (0.25, 1, 3, and 5 h); (C) Enzymatic activity of PSM^(1/7) or ASM^(2/1) of *L. mexicana* (Lacandona strain). All experiments were determined using *p*-NPP as substrate; (D) Cell viability in promastigotes and amastigotes after the secretion process was analyzed by eritrosine B. Bars represent the mean \pm SE of three independent experiments.

and g); CF (Fig. 3B, lane h) and MF (Fig. 3B, lane f). Interestingly, this molecule of 44.9 kDa molecule was not identified in the different amastigote fractions (Fig. 3B, lanes a, b and c). This molecule has a similar molecular weight as the recombinant protein PP2C from *L. major* that was used as control (Fig. 3B lane i).

Ultrastructural localization of PP2C in amastigotes of *L. mexicana*

The analysis of the distribution of the PP2C in amastigotes of *L. mexicana* was achieved by IEM. A characteristic structure found inside the pocket is the flagellum and its origin is clearly identified by the axonemal structure in transverse and longitudinal sections of the parasites (Fig. 4A–C, arrowheads). The immunostaining with the antibody against the PP2C in the amastigote form showed an abundant, specific and reproducible localization of the gold labelling within the flagellar pocket (Fig. 4E–G). Interestingly, the labelling was mostly associated with small vesicles and with a fuzzy material located within the flagellar pocket space (arrows) and a certain labelling was also detected at the flagellar membrane. Other structures and organelles of the amastigotes such as nuclei and mitochondria were not labelled, indicating the specificity of the antibody and the location of the PP2C. Other structures of the amastigotes seemed not to be labelled. The negative control with the pre-immune serum

was negative for the flagellar pocket, which was virtually free of the gold labelling showing only few isolated particles found dispersed in the studied sections (Fig. 4d).

Cytokine production induced by secreted proteins of promastigotes and amastigotes

The effect of PSM⁷ and ASM¹ of *L. mexicana* on the production of IL-1 β , TNF- α , IL-12p70 and IL-10 by human macrophages was tested. As shown in Fig. 5, the production of TNF- α after incubation with PSM⁷ increased 4-fold (212.166 pg mL⁻¹), as compared with macrophages that were incubated in medium alone (50.5 pg mL⁻¹). PSM⁷ also increased the production of IL-1 β (139.25 pg mL⁻¹, 3-fold), IL-12p70 (85.83 pg mL⁻¹, 2.5-fold) and IL-10 (219 pg mL⁻¹, 4-fold). While the production of TNF- α after incubation with ASM¹ increased 3-fold (153.66 pg mL⁻¹) as compared to macrophages that were incubated in medium alone (50.5 pg mL⁻¹) and also increased the production IL-1 β (147.75 pg mL⁻¹, 3-fold), IL-12p70 (113.75 pg mL⁻¹, 2.5-fold) and IL-10 (181.5 pg mL⁻¹, 4-fold) as compared with macrophages that were incubated in medium alone. When comparing the effect of PSM⁷ and ASM¹ on the production of cytokines with the values obtained from macrophages that were incubated in medium alone, only the production of IL-1 β , IL-12p70 and IL-10 increased significantly ($P < 0.05$).

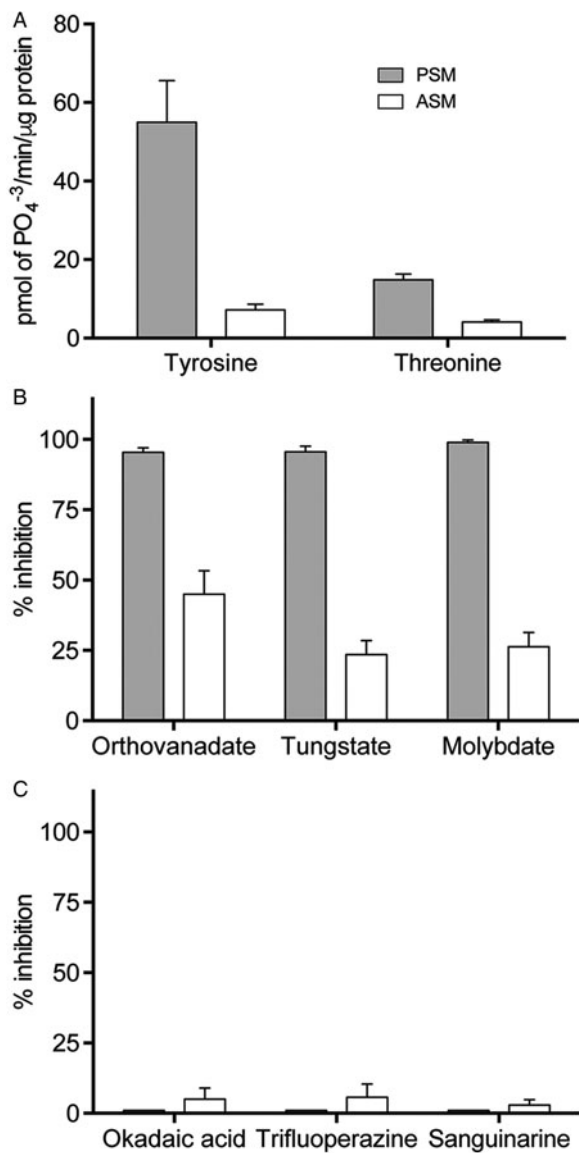


Fig. 2. Biochemical characterization of the phosphatase activity in PSM^(1/7) and ASM^(2/1) of *L. mexicana* (Lacandona strain). (A) PTP and serine/threonine phosphatase activity was performed with Tyr phosphopeptide-1 substrate [END(pY) INASL] and Thr [RRA(pT)VA]. (B) Effect of different PTP inhibitors on phosphatase activity of PSM^(1/7) and ASM^(2/1) of *L. mexicana*. (C) Effect of different serine/threonine inhibitors on phosphatase activity of PSM^(1/7) and ASM^(2/1). Bars represent the mean ± SE of three independent experiments.

DISCUSSION

Leishmania spp are known to synthesize and traffic most surface molecules such as LPG and gp63, along the classical endoplasmic reticulum-Golgi apparatus-plasma membrane pathway (McConville *et al.* 2002). As mentioned, these surface molecules are ultimately delivered to the flagellar pocket and it is thought that the pocket retains its role as the primary, if not sole, site of secretion in nonflagellated amastigotes (McConville *et al.* 2002). Also, it is known that *Leishmania* parasites use a classical

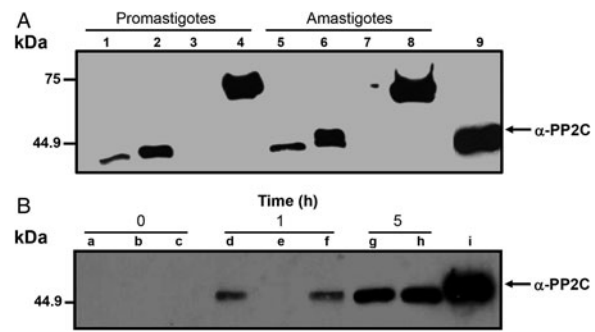


Fig. 3. Immunodetection of PP2C. (A) Immunodetection of PP2C in PSM⁷ and ASM¹ and subcellular fractions of *L. mexicana* (Lacandona strain) promastigotes and amastigotes: Total extract (TE) of promastigotes and amastigotes (lanes 1 and 5), Cytosolic fraction (CF) of promastigotes and amastigotes (lanes 2 and 6), culture medium (CM) (lanes 3 and 7), PSM⁷ and ASM¹ (lanes 4 and 8). (B) Immunodetection of PP2C in extracts of *L. mexicana* amastigotes at different times of secretion. TE of amastigotes at 0, 1 and 5 h after secretion (a, d and g); CF at 0, 1 and 5 h after secretion (b, e, h); MF at 0, 1h after secretion (c, f). Recombinant PP2C of *L. major* was used as control (lane 9 in A and lane i in B).

amino-terminal signal sequence peptide to direct the export of most secreted proteins through the flagellar pocket. However, the vast majority of the characterized *Leishmania* secreted proteins have no identifiable secretion signal sequence and mostly lack an amino-terminal secretion signal sequence which suggests the existence of important non-classical pathways of secretion (Bates and Dwyer, 1987; McConville *et al.* 2002). In this regard, non-conventional secretion pathways have been observed in *Trypanosoma* and *Leishmania* parasites (Cuervo *et al.* 2009; Trocoli Torrecilhas *et al.* 2009; Geiger *et al.* 2010). In the released secreted proteins by *Leishmania (Viannia) braziliensis*, 42 secreted proteins were identified that lack a classical secretion signal peptide, which has also been reported by Silverman *et al.* (2008). Their exoproteome analysis showed that only two proteins were possibly secreted through the classical pathway (Cuervo *et al.* 2009).

In different microorganisms, secreted proteins may function as an evasion mechanism against the immune response, thereby participating in the infection. Thus, *Trypanosoma cruzi* secrete vesicles having phosphatase activities, which increas parasite adhesion and infection of macrophages (Neves *et al.* 2014) Proteins secreted by *Trypanosoma brucei* inhibit the maturation of DCs and their ability to induce lymphocytic allogenic responses (Geiger *et al.* 2010). In the case of *Leishmania*, virulence has been related to two different groups of parasite molecules: one composed of the secreted and surface molecules and the other by the intracellular molecules (Chang *et al.* 2003). Secreted molecules have a central role in the establishment of infection, protecting the parasite form the early action of the

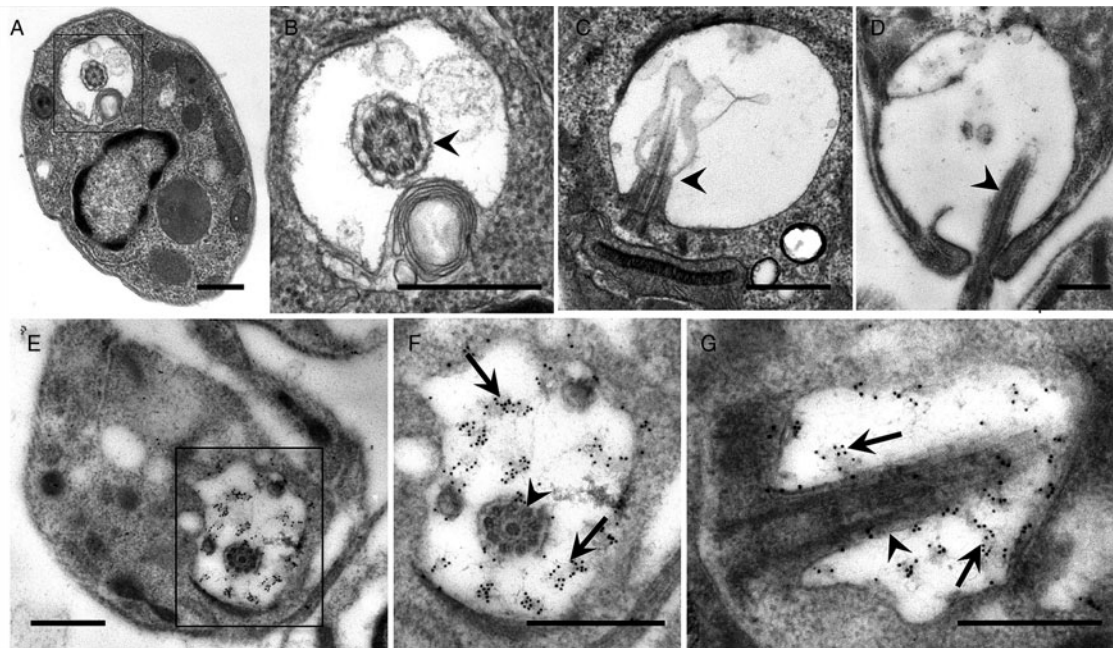


Fig. 4. Distribution of PP2C in amastigotes of *L. mexicana* (Lacandona strain) by IEM. Figures (A–C) correspond to amastigotes processed to preserve the ultrastructure in order to identify those structures positive to the labelling of PP2C. Micrograph (B) is a high magnification of the region marked in figure 4A; (D) Corresponds to the negative control of the labelling of amastigotes with the antibody against the PP2C; (F) is a high magnification of the flagellar pocket region delimited in figure 4E. Arrows indicate the presence of gold particles (10 nm) within the flagellar pocket, arrowheads indicate the presence of the flagella in transverse or longitudinal sections. Scale bars = 0.5 μm.

host immune system (Chang *et al.* 2003; Santarem *et al.* 2007).

Various phosphatases are present in several pathogenic microorganisms such as a *Yersinia*, *Mycobacterium* and *Plasmodium*, where they appear to be involved in signal transduction pathways of the host immune system.

The secreted acid phosphatase (SACP), released from the flagellar pocket of *leishmania* promastigotes and amastigotes, has been previously characterized and found implicated in dephosphorylating organic substrates (Bates and Dwyer, 1987; Bates *et al.* 1989). Yet the role of SACP in leishmania pathogenesis has not been characterized. It has been suggested that *Leishmania amazonensis* PKC activity may modulate the host cell infection via SACP (Vannier-Santos *et al.* 1995). Furthermore, activities of *Leishmania* ecto-phosphatases can participate in nutrition, growth and ROS (reactive oxygen species) sensing (Cosentino-Gomes and Meyer-Fernandes, 2011).

In *L. donovani* it has been shown that a phosphatase from promastigotes correlates with the degree of virulence (Singla *et al.* 1992). Also, in *L. amazonensis* several secreted phosphatase activities have been characterized (Fernandes *et al.* 2013). Recently, we have shown that *L. mexicana* promastigotes secrete a PTP to the CM (Escalona-Montañó *et al.* 2010). Interestingly, also host PTPs have been implicated in *Leishmania* pathogenesis. In particular, PTP1B

and T cell PTP have been shown to be activated and post-translationally modified in *L. mexicana*-infected macrophages (Gomez *et al.* 2009).

In the present work, we extended the analysis of the phosphatases secreted by both morphological stages of *Leishmania* and found that *L. mexicana* promastigotes and amastigotes secrete a protein with PTP activity to the CM. In promastigotes the maximal phosphatase activity was secreted after 7 h of incubation in conditioned medium, whereas in amastigotes the maximal phosphatase activity was secreted at 1 h. After the secretion process the viability of the parasites was determined and showed to be optimal, which proved that the presence of the phosphatase activity was the result of an active secretion process and not due to parasite lysis. The enzymatic activity was higher in PSM than in ASM, although for amastigotes the concentration of protein analysed was the double the amount as that of the protein analysed for promastigotes. The lower secretion of phosphatase activity in amastigotes, as compared with promastigotes, correlates with that of other molecules that can be secreted such as LPG which has been shown to be produced in low quantity by amastigotes as compared with promastigotes (McConville and Blackwell, 1991). The fact that promastigotes and amastigotes differ in their surface and secreted molecules may correlate with other differential capacities. It has been shown that *L. mexicana* promastigotes and amastigotes differ

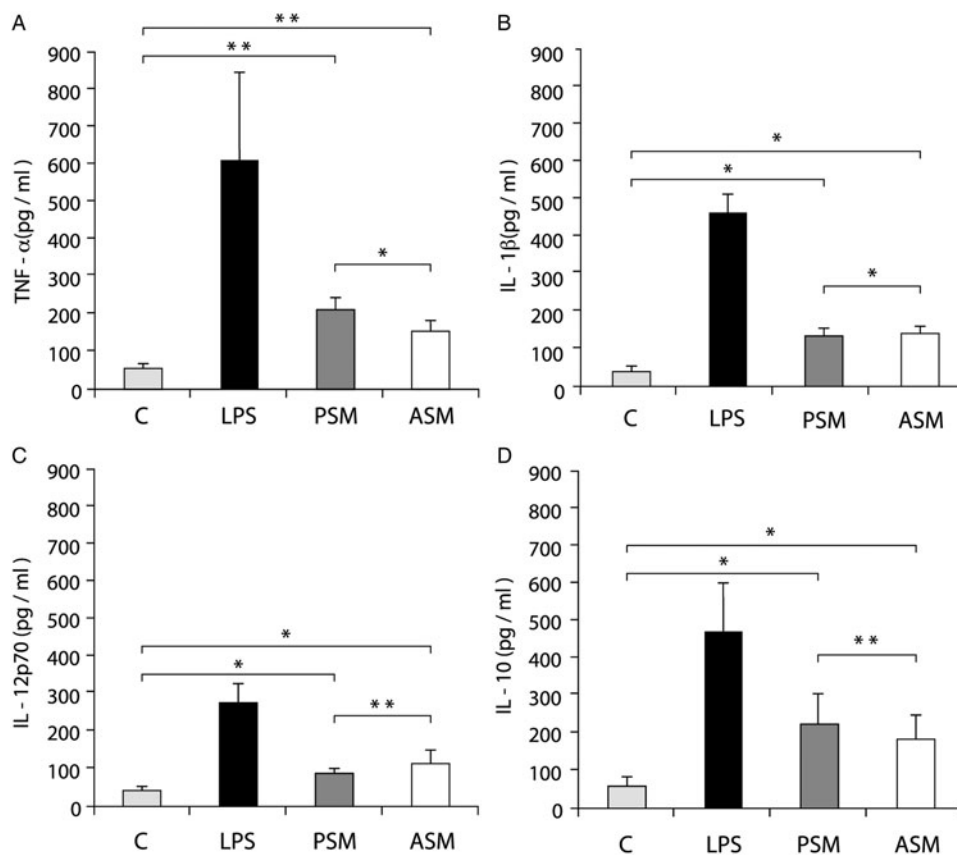


Fig. 5. Cytokine production induced by PSM⁷ and ASM¹ of *L. mexicana* (Lacandona strain) in human macrophages. Macrophages (1×10^6 cells mL⁻¹) were cultured in RPMI medium (C), in presence of LPS (100 ng mL⁻¹), (PSM⁷) and (ASM¹). After 24 h, TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-12p70 (C), and IL-10 (D) production was analysed by ELISA. The bars represent mean \pm SD of four independent different experiments. Significant differences between PSM⁷ and ASM¹ were calculated in relation to the control (C), while PSM⁷ and ASM¹, were compared among themselves. Asterisk (*) is significant of ($p < 0.05$) and double asterisks (**) is significant of ($p < 0.001$).

in their ability to alter macrophage signalling and functions as is exemplified by the fact that in this *Leishmania* species promastigotes, but not amastigotes, were able to rapidly activate host PTP1B (Abu-Dayyeh *et al.* 2010).

We found that the phosphatase activity present in PSM dephosphorylate in a major extent phosphotyrosine residues as compared to phosphothreonine, whereas the enzyme present in ASM showed a low dephosphorylation of both substrates. The use of specific inhibitors for PTP activity only inhibited the phosphatase activity present in PSM, but not in ASM. Due to the fact that orthovanadate has been shown to be an irreversible inhibitor of PTPs, it is expected that the inhibition of phosphatase present in PSM and ASM by PTP inhibitors as has been reported for phosphatases present in other microorganism (Catta-Preta *et al.* 2013). On the other hand, serine/threonine phosphatase inhibitors showed no effect. The characterization of phosphatases with these compounds has been reported in different systems (Aguirre-Garcia *et al.* 2003, 2006; Escalona-Montaña *et al.* 2010).

A further characterization of the phosphatase activity secreted by promastigotes and amastigotes was performed by Western blot using an antibody raised against a recombinant PP2C of *L. major*. We detected a protein phosphatase PP2C secreted by *L. mexicana* promastigotes and amastigotes. This antibody reacted with 44.9 kDa protein present in the TE and CF of promastigotes and amastigotes, respectively, while in PSM and ASM reacted with a 72 kDa protein.

The *Leishmania* secretome has been analysed in search of potential virulence factors (Silverman *et al.* 2008). Candidate virulence factors have been divided into four categories: proteins putatively involved in intracellular survival, proteins with known immunosuppressive functions, proteins involved in signal transduction, and proteins involved in transport processes. In the group of proteins involved in signal transduction a protein phosphatase type 2C (LmjF25-0750) has been reported and when analysed in GeneDB and shown to be a PP2C similar to a *Leishmania chagasi* type 2C serine/threonine protein phosphatase, LcPP2C.

LcPP2C was shown to be present as a 42-kDa protein in *L. chagasi* and *L. amazonensis* promastigotes and tissue amastigotes of (Burns *et al.* 1993).

The antibodies against the PP2C of *L. major* used in this work were generated against a recombinant protein PP2C from *L. major* that has a molecular weight 44.9 kDa that corresponds with the molecular weight detected. However, the fact that it also recognized a protein with a molecule weight of 72 kDa in PSM and ASM possibly indicates that this molecule is the result of a glycosylation process or the classical amino-terminal signal sequence peptide to direct the export of most secreted proteins through the flagellar pocket used by *Leishmania*. Additionally, we analysed ET, CF and MF of amastigotes after different times of secretion and interestingly found that the antibodies against the PP2C of *L. major* recognized a 44.9 kDa molecule only in amastigotes after 1 and 5 h of secretion. Antibodies against the PP2C of *L. major* did not detect any molecule in ET of amastigotes at different protein concentration (data not shown). This result is important because this *L. mexicana* PP2C could be activated as a result of a stress response of amastigotes due to the secretion process. Similar events have been observed that PP2Cs of plants, representing the major group of protein phosphatases. The recent discovery of novel abscisic acid (ABA) receptors (ABARs) has placed the PP2Cs at the centre stage of the major signalling pathway regulating plant responses to stresses and plant development (Mitula *et al.* 2015; Singh *et al.* 2015).

Once we determined that *L. mexicana* amastigotes secrete a PP2C, we were also interested in determining its localization in this morphological stage by IEM. The abundant, specific and reproducible localization of the immunogold labelling within the flagellar pocket and its particular association with vesicles and a fuzzy material, suggest that the enzyme could be secreted from the flagellar pocket to the extracellular space. It remains to be determined whether the enzyme is secreted in a soluble form or is associated to secretory vesicles. Similar results have been observed in *L. major* promastigotes by IEM analysis, where in promastigotes it was shown that the antibody against the PP2C of *L. major* specifically labelled abundantly the flagellum since the beginning of the structure at the level of the flagellar pocket, but also along the whole length of this motile organelle (manuscript in preparation).

We then analysed the effect of PSM and ASM on cytokine production by human macrophages. We found that cytokines are produced by macrophages after the incubation with PSM and ASM. In regard to the production of TNF- α , IL-12 p70 and IL-10 we observed differences when macrophages were incubated with PSM or ASM. It is expected that cytokines production by human macrophages is driven by molecules secreted by promastigotes

and amastigotes; albeit it is not clear whether secreted phosphatase are involvement in this process.

The effect that *Leishmania* secreted molecules exert on the immune response has been analysed for different *Leishmania* species. Such is the case of *L. donovani*, secreted vesicles and exosomes have been shown to alter the cytokine response of human monocytes to *Leishmania* infection and interferon (IFN)- γ treatment. The inhibition of IL-8 and TNF- α production combined with augmented production IL-10 due to *L. donovani* secreted vesicles and exosomes favoured an anti-inflammatory response. These results suggest that secretion of exosomes by *Leishmania* likely plays major role in the pathogenesis of these organisms and led us to speculate that exosomes may be a mechanism of immune modulation used more generally by intracellular and extracellular pathogens (Silverman *et al.* 2010).

It has previously been shown that *L. major* secreted antigens suppress *in vitro* proliferation of lymphocytes in BALB/c mice. Additionally, semi-purified secreted antigens were shown to suppress 60% of lymphocyte proliferation and prevented the stimulation of lymphocytes. These fractions decreased IFN- γ production and increased IL-4 in lymphocytes, and downregulated nitric oxide production in activated macrophages. These results suggest that *L. major* secreted proteins could function as immunosuppressive factors that downregulate the immune system (Tabatabaee *et al.* 2011). Conversely in *Leishmania infantum* the immunomodulatory effect of excreted/secreted proteins has been analysed in differentiation and maturation of human DC (Markikou-Ouni *et al.* 2015). Furthermore, *L. donovani* excretory-secretory antigens (LESAs) released by promastigotes to the CM, have shown an immunomodulatory role. Fractions from LESAs containing proteins of different molecular weights were found to be highly immunogenic, as they significantly induced NADPH oxidase (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase) and SOD (superoxide dismutase) activities, as well as NO (nitric oxide), TNF- α , IFN- γ and IL-12 production in stimulated RAW 264.7 macrophages. These results strongly suggest the potential role of LESAs in the modulation of macrophage effector functions and Th1 response that gives a hope for the development of a vaccine for visceral leishmaniasis (Gour *et al.* 2012). Similar results were reported by Kumar *et al.* 2015, who found a potential immunostimulatory effect when using soluble exogenous antigens of *L. donovani*, suggesting that these immunostimulatory molecules may be further exploited for developing a subunit vaccine against visceral leishmaniasis (Kumar *et al.* 2015).

The fact that we also observed that the production of cytokines in macrophages was differentially

induced by proteins secreted from *L. mexicana* promastigotes and amastigotes opens novel lines of research. The analysis of *L. mexicana* secreted proteins, especially from parasites isolated from patients with different disease severity as observed with LCL and DCL, will possibly shed new light on their role as immunomodulators. Additionally, it will be very interesting to explore the participation of secreted protein phosphatases PTP and PP2C in different signal transduction pathways of the host cell.

ACKNOWLEDGEMENTS

Alma Reyna Escalona Montaña is a student of Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México and was supported by a fellowship from CONACyT México (fellowship165409, CVU 165409). Authors express their gratitude to Marco Gudiño Zayas, Rocely Cervantes Sarabia, Miriam Berzunza Cruz, Carlos Ramírez Álvarez, Omar Agni García-Hernández and Jesús Argueta-Donohué for technical assistance. Authors are also grateful to Mónica Mondragón and Sirenia González from the Biochemistry Department and Electron Microscopy Facility-LANSE, respectively, at CINVESTAV, México, for their technical support.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by grants 152433 from CONACyT, IN218412 from DGAPA-PAPIIT (UNAM) to M.M.A.-G.

REFERENCES

- Abu-Dayyeh, I., Hassani, K., Westra, E. R., Mottram, J. C. and Olivier, M. (2010). Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. *Infection and Immunity* **78**, 2438–2445.
- Aguirre-Garcia, M. M., Anaya-Ruiz, M. and Talamas-Rohana, P. (2003). Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. *Parasitology* **126**, 195–202.
- Aguirre-Garcia, M. M., Escalona-Montano, A. R., Bakalara, N., Perez-Torres, A., Gutierrez-Kobeh, L. and Becker, I. (2006). *Leishmania major*: detection of membrane-bound protein tyrosine phosphatase. *Parasitology* **132**, 641–649.
- Argueta-Donohue, J., Carrillo, N., Valdes-Reyes, L., Zentella, A., Aguirre-Garcia, M., Becker, I. and Gutierrez-Kobeh, L. (2008). *Leishmania mexicana*: participation of NF-kappaB in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Experimental Parasitology* **120**, 1–9.
- Bates, P. A. and Dwyer, D. M. (1987). Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **26**, 289–296.
- Bates, P. A., Hermes, I. and Dwyer, D. M. (1989). *Leishmania donovani*: immunochemical localization and secretory mechanism of soluble acid phosphatase. *Experimental Parasitology* **68**, 335–346.
- Berzunza-Cruz, M., Bricaire, G., Salaiza Suazo, N., Perez-Montfort, R. and Becker, I. (2009). PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis. *Parasitology Research* **104**, 691–699.
- Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K. A. and Olivier, M. (1999). *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *European Journal of Immunology* **29**, 3737–3744.
- Bliska, J. B., Guan, K. L., Dixon, J. E. and Falkow, S. (1991). Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 1187–1191.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Burns, J. M., Jr., Parsons, M., Rosman, D. E. and Reed, S. G. (1993). Molecular cloning and characterization of a 42-kDa protein phosphatase of *Leishmania chagasi*. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 17155–17161.
- Catta-Preta, C. M., Nascimento, M. T., Garcia, M. C., Saraiva, E. M., Motta, M. C. and Meyer-Fernandes, J. R. (2013). The presence of a symbiotic bacterium in *Strigomonas culicis* is related to differential ecto-phosphatase activity and influences the mosquito-protozoa interaction. *International Journal for Parasitology* **43**, 571–577.
- Chang, K. P., Reed, S. G., McGwire, B. S. and Soong, L. (2003). *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Tropica* **85**, 375–390.
- Cosentino-Gomes, D. and Meyer-Fernandes, J. R. (2011). Ecto-phosphatases in protozoan parasites: possible roles in nutrition, growth and ROS sensing. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **43**, 89–92.
- Cuervo, P., De Jesus, J. B., Saboia-Vahia, L., Mendonca-Lima, L., Domont, G. B. and Cupolillo, E. (2009). Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *Journal of Proteomics* **73**, 79–92.
- Dissing, J., Dahl, O. and Svensmark, O. (1979). Phosphonic and arsonic acids as inhibitors of human red cell acid phosphatase and their use in affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta* **569**, 159–176.
- Escalona-Montaña, A. R., Pardave-Alejandre, D., Cervantes-Sarabia, R., Garcia-Lopez, P., Gutierrez-Quiroz, M., Gutierrez-Kobeh, L., Becker-Fauser, I. and Aguirre-Garcia, M. M. (2010). *Leishmania mexicana* promastigotes secrete a protein tyrosine phosphatase. *Parasitology Research* **107**, 309–315.
- Fernandes, A. C., Soares, D. C., Saraiva, E. M., Meyer-Fernandes, J. R. and Souto-Padron, T. (2013). Different secreted phosphatase activities in *Leishmania amazonensis*. *FEMS Microbiology Letters* **340**, 117–128.
- Geiger, A., Hirtz, C., Becue, T., Bellard, E., Centeno, D., Gargani, D., Rossignol, M., Cuny, G. and Peltier, J. B. (2010). Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiology* **10**, 20.
- Gomez, M. A., Contreras, I., Halle, M., Tremblay, M. L., McMaster, R. W. and Olivier, M. (2009). *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Science Signaling* **2**, ra58.
- Gomez de Leon, C. T., Diaz Martin, R. D., Mendoza Hernandez, G., Gonzalez Pozos, S., Ambrosio, J. R. and Mondragon Flores, R. (2014). Proteomic characterization of the subpellicular cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Journal Proteomics* **111**, 86–99.
- Gour, J. K., Kumar, V., Singh, N., Bajpai, S., Pandey, H. P. and Singh, R. K. (2012). Identification of Th1-responsive leishmanial excretory-secretory antigens (LESAs). *Experimental Parasitology* **132**, 355–361.
- Green, S. P., Hartland, E. L., Robins-Browne, R. M. and Phillips, W. A. (1995). Role of YopH in the suppression of tyrosine phosphorylation and respiratory burst activity in murine macrophages infected with *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Leukocyte Biology* **57**, 972–977.
- Gregoraszczyk, E. L., Rak-Mardyla, A., Rys, J., Jakubowicz, J. and Urbanski, K. (2015). Effect of chemotherapeutic drugs on caspase-3 activity, as a key biomarker for apoptosis in ovarian tumor cell cultured as monolayer. A pilot study. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **14**, 1153–1161.
- Kumar, A., Samant, M., Misra, P., Khare, P., Sundar, S., Garg, R. and Dube, A. (2015). Immunostimulatory potential and proteome profiling of *Leishmania donovani* soluble exogenous antigens. *Parasite Immunology* **37**, 368–375.
- Markikou-Ouni, W., Drini, S., Bahi-Jaber, N., Chenik, M. and Meddeb-Garnaoui, A. (2015). Immunomodulatory effects of four *Leishmania infantum* potentially excreted/secreted proteins on human dendritic cells differentiation and maturation. *PLoS ONE* **10**, e0143063.
- McConville, M. J. and Blackwell, J. M. (1991). Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 15170–15179.
- McConville, M. J., Mullin, K. A., Ilgoutz, S. C. and Teasdale, R. D. (2002). Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 122–154; table of contents.
- Mitula, F., Tajdel, M., Ciesla, A., Kaspruwicz-Maluski, A., Kulik, A., Babula-Skowronska, D., Michalak, M., Dobrowolska, G., Sadowski, J. and Ludwikow, A. (2015). Arabidopsis ABA-activated kinase MAPKKK18 is regulated by protein phosphatase 2C AB11 and the ubiquitin-proteasome pathway. *Plant & Cell Physiology* **56**, 2351–2367.
- Neves, R. F., Fernandes, A. C., Meyer-Fernandes, J. R. and Souto-Padron, T. (2014). *Trypanosoma cruzi*-secreted vesicles have acid and

- alkaline phosphatase activities capable of increasing parasite adhesion and infection. *Parasitology Research* **113**, 2961–2972.
- Rohousova, I., Volf, P. and Lipoldova, M.** (2005). Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species. *Parasite Immunology* **27**, 469–473.
- Rojas-Bernabe, A., Garcia-Hernandez, O., Maldonado-Bernal, C., Delegado-Dominguez, J., Ortega, E., Gutierrez-Kobeh, L., Becker, I. and Aguirre-Garcia, M.** (2014). *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. *Parasitology* **141**, 788–800.
- Ruffolo, J. J., Cushion, M. T. and Walzer, P. D.** (1986). Techniques for examining *Pneumocystis carinii* in fresh specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **23**, 17–21.
- Santarem, N., Silvestre, R., Tavares, J., Silva, M., Cabral, S., Maciel, J. and Cordeiro-da-Silva, A.** (2007). Immune response regulation by leishmania secreted and nonsecreted antigens. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* **2007**, 85154.
- Shibata, K., Noda, M., Sawa, Y. and Watanabe, T.** (1994). Acid phosphatase purified from *Mycoplasma fermentans* has protein tyrosine phosphatase-like activity. *Infection and Immunity* **62**, 313–315.
- Silverman, J. M., Chan, S. K., Robinson, D. P., Dwyer, D. M., Nandan, D., Foster, L. J. and Reiner, N. E.** (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biology* **9**, R35.
- Silverman, J. M., Clos, J., de'Oliveira, C. C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L. J. and Reiner, N. E.** (2010). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *Journal of Cell Science* **123**, 842–852.
- Singh, A., Pandey, A., Srivastava, A. K., Tran, L. P. and Pandey, G. K.** (2015). Plant protein phosphatases 2C: from genomic diversity to functional multiplicity and importance in stress management. *Critical Reviews in Biotechnology* **18**, 1–13.
- Singla, N., Khuller, G. K. and Vinayak, V. K.** (1992). Acid phosphatase activity of promastigotes of *Leishmania donovani*: a marker of virulence. *FEMS Microbiology Letters* **73**, 221–225.
- Solbach, W. and Laskay, T.** (2000). The host response to *Leishmania* infection. *Advances in Immunology* **74**, 275–317.
- Tabatabaee, P. A., Abolhassani, M., Mahdavi, M., Nahrevanian, H. and Azadmanesh, K.** (2011). *Leishmania major*: secreted antigens of *Leishmania major* promastigotes shift the immune response of the C57BL/6 mice toward Th2 *in vitro*. *Experimental Parasitology* **127**, 46–51.
- Trocoli Torrecilhas, A. C., Tonelli, R. R., Pavanelli, W. R., da Silva, J. S., Schumacher, R. I., de Souza, W., NC, E. S., de Almeida Abrahamsohn, I., Colli, W. and Manso Alves, M. J.** (2009). *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection* **11**, 29–39.
- Vannier-Santos, M. A., Martiny, A., Meyer-Fernandes, J. R. and de Souza, W.** (1995). Leishmanial protein kinase C modulates host cell infection via secreted acid phosphatase. *European Journal of Cell Biology* **67**, 112–119.
- Wilkins-Rodriguez, A. A., Escalona-Montano, A. R., Aguirre-Garcia, M., Becker, I. and Gutierrez-Kobeh, L.** (2010). Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Experimental Parasitology* **126**, 426–434.

ANEXO II (ARTICULO DERIVADO DEL PROYECTO DOCTORAL)

Escalona-Montaña AR., Pérez-Montfort R, Cabrera N, Mondragón-Flores R, Vélez-Ramírez D.E, Gómez-Sandoval J.N, Gutiérrez-Kobeh L, Becker I and Aguirre-García MM. (2017). Protein phosphatase PP2C in the flagellum of *L. major*: Cloning and Characterization. *Parasitology Open* 3, e15, 1-9 doi.org/10-1017/pao 2017.14.

Research Article

Cite this article: Escalona-Montaña AR, Pérez-Montfort R, Cabrera N, Mondragón-Flores R, Vélez-Ramírez DE, Gómez-Sandoval JN, Gutiérrez-Kobeh L, Becker I, Aguirre-García MM (2017). Protein phosphatase PP2C in the flagellum of *Leishmania major*: cloning and characterization. *Parasitology Open* 3, e15, 1–9. <https://doi.org/10.1017/pao.2017.14>

Received: 4 April 2017

Revised: 11 September 2017

Accepted: 12 September 2017

Key words:

Leishmania major; flagellum; protein phosphatase PP2C

Author for correspondence:

M.M. Aguirre-García, E-mail: maguirre@unam.mx

Protein phosphatase PP2C in the flagellum of *Leishmania major*: cloning and characterization

A. R. Escalona-Montaña¹, R. Pérez-Montfort², N. Cabrera², R. Mondragón-Flores³, D. E. Vélez-Ramírez⁴, J. N. Gómez-Sandoval⁵, L. Gutiérrez-Kobeh¹, I. Becker¹ and M. M. Aguirre-García¹

¹Facultad de Medicina, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Universidad Nacional Autónoma de México, Dr. Balmis 148, Colonia Doctores C.P. 06726, Ciudad de México, México; ²Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, Ciudad de México, México; ³Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco C.P. 07360, Ciudad de México, México; ⁴Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Edificio D, 1o. Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México and ⁵Universidad Politécnica del Valle de Toluca Carretera Toluca-Almoloya de Juárez km. 5.6 Santiaguillo Tlalcalcalí, Almoloya de Juárez, C.P. 50904, Estado de México, México

Abstract

The main goal of this work consisted in cloning, purifying and characterizing a protein phosphatase 2C (PP2C) from promastigotes of *Leishmania major*. The gene was cloned and amplified by PCR using specific oligonucleotides and the recombinant protein was purified by affinity chromatography. The peak with maximal protein concentration was analysed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and revealed a protein of 44.9 kDa with PP2C activity. This activity was dependent on divalent cations (Mg^{+2} and Mn^{+2}) and was optimal at pH of 8.5, using phosphothreonine as the substrate. Sanguinarine inhibited the activity of the recombinant *LmPP2C*, while protein tyrosine phosphatase inhibitors had no effect. The recombinant *LmPP2C* was used to generate polyclonal antibodies. These antibodies recognized a protein of 44.9 kDa in different *Leishmania* species; the *LmPP2C* was localized in the flagellar pocket and the flagellum of promastigotes.

Introduction

The parasite *Leishmania major* is the causative agent of cutaneous leishmaniasis in the Old World. *Leishmania* survives and replicates within host macrophages and evades numerous host defences by inhibition of important cell functions, including the modulation of host cell signalling pathways through phosphorylation and dephosphorylation mechanisms. Protein phosphorylation and dephosphorylation processes are regulated by protein kinases and phosphatases, respectively, which generally occur on tyrosine, serine or threonine residues (Cohen, 2002; Wang *et al.* 2008). Protein phosphatases are classified in three families based on substrate specificity, sequence alignment, structure and their catalytic mechanism, which are: PPP (phosphoprotein phosphatases), PPM (metal-dependent protein phosphatases) and PTP (protein tyrosine phosphatases) (Moorhead *et al.* 2007). The PPP family consists of the phosphatases PP1, PP2A and PP2B. The PPM family contains type 2C protein phosphatases (PP2C) and pyruvate dehydrogenase phosphatase (PDP). The PP2C is a monomeric enzyme that requires the metal cations Mg^{+2} or Mn^{+2} for enzymatic activity (Das *et al.* 1996; Andreeva and Kutuzov, 2004; Schweighofer *et al.* 2004; Lammers and Lavi, 2007; Moorhead *et al.* 2007). In the human genome, 16 genes have been identified which generate 22 isoforms by a process of alternative splicing; each of these enzymes regulates distinct signalling pathways (Das *et al.* 1996). The roles of PP2C in eukaryotic cells are diverse and have been described in different organisms such as the plant *Arabidopsis thaliana*, in which 76 candidates of PP2C-type phosphatases were identified in its genome (Schweighofer *et al.* 2004). Different PP2C from *A. thaliana* participate in various signalling pathways, such as the one regulated by abscisic acid and the signalling pathways activated by mitogen protein (Mitula *et al.* 2015). In protozoan parasites such as *Plasmodium falciparum*, an unusual PP2C phosphatase (*PfPP2C*) was identified. It has two catalytic sites, one with serine and the other with threonine, with an identity between them of about 9% (Mamoun *et al.* 1998). Sporozoites of *Plasmodium yoelli* and *Plasmodium berguei*, incubated with increasing concentrations of potassium, enhanced the infectivity of the parasites and the copy number of the transcripts for PP2C was increased, when compared with parasites not exposed to potassium in which the expression of the enzyme was kept at basal levels (Kumar *et al.* 2007). *Toxoplasma gondii* also has a protein phosphatase PP2C (*TgPP2C*), which is secreted from the rhoptries, a group of secretory organelles involved in host cell invasion. Once inside the parasitophorous vacuole, *TgPP2C* is transported to the nucleus of the host cell. In contrast, a PP2C knockout strain had reduced intracellular growth, which was reversed by complementation with the wild-type gene for PP2C (Gilbert *et al.* 2007). PP2C was cloned in the parasite

© Cambridge University Press 2017. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

Leishmania chagasi (LcPP2C); however, there are no reports of its function in the parasite or in the host cell (Burns *et al.* 1993). The genome analysis of *L. major* predicted the existence of 45 phosphatases of the PPP family and 15 of the PPM family; however, the biochemical characterization and localization of these enzymes in this parasite have not yet been reported. We previously identified a membrane-bound PTP in *L. major* that differs in expression, activity and ultrastructural localization between the procyclic and metacyclic stages of the parasite life cycle (Aguirre-García *et al.* 2006). We now report the cloning, expression, purification and biochemical characterization of PP2C from *L. major*. The enzyme was identified in different *Leishmania* species and its ultrastructural localization is shown in *L. major* promastigotes.

Materials and methods

Culture of *Leishmania spp* promastigotes

Leishmania major MHOM/SU/73/5-ASKH (a generous gift from Dr H. Moll, University of Würzburg, Germany), *Leishmania (L.) mexicana* MNYC/BZ/62/M379, *Leishmania (L.) venezuelensis* MHOM/VE/80/PMH3, *Leishmania (L.) amazonensis* IFLA/BR/67/PH8, *Leishmania (V.) panamensis* MHOM/PA/71/LS94, *Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, *Leishmania (V.) donovani*, [a generous gift from Dr Nancy Sarabia, Centro Internacional de Entrenamiento e Investigación Médica in Cali, Colombia (CIDEIM)], promastigotes were cultivated in RPMI 1640 medium, which contained penicillin (100 units mL⁻¹), streptomycin (100 µg mL⁻¹) and 10% fetal bovine serum, at 26 °C (all reagents were from Gibco, Invitrogen Corporation Carlsbad, CA, USA). The cultured promastigotes were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.5, centrifuged for 10 min at 2500 × g at room temperature (RT).

Extraction of DNA and amplification of the gene for PP2C from *L. major*

Total DNA was extracted from *L. major* promastigotes using TRIZOL. The gene was amplified using the forward oligonucleotide (Fw) 5'ATGGGCATTCCACTTCCGA3' and reverse oligonucleotide (Rv) 5'TCACTGCGTCTGCTCACC3'. The PCR was performed using 100 µL of the following reaction mixture: 1.5 mM MgCl₂; 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates; 100 ng of the corresponding oligonucleotides; 10 ng genomic DNA and one unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen) using 40 cycles for 5 min at 94 °C, 30 s, 1 min at 50.7 °C, 30 s and 48 s at 72 °C, and a final extension of 10 min at 72 °C. The gene was cloned into pET-23b expression plasmid using the *Nde* I and *Hind* III restriction sites. The gene was completely sequenced and transformed into BL21 (DE3) pLysS cells (Novagen, Madison, WI, USA). Bacteria containing the plasmid with the gene of protein phosphatase PP2C of *L. major* were grown in Luria-Bertani medium and selected for ampicillin resistance (100 µg mL⁻¹) at 37 °C allowing them to grow until the OD of the culture at 600 nm reached 0.8–1.0. Expression of the recombinant protein was induced with 0.4 mM isopropyl-thio-b-D-galactopyranoside (IPTG) for 3 h. After incubation, bacteria were harvested by centrifugation and processed immediately, or frozen at –70 °C until use.

Purification of recombinant PP2C from *L. major* (LmPP2C)

Cell cultures in volumes of 100 mL were centrifuged and suspended in 50 mL lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 8; 300 mM NaCl; 1 mM benzamidine, 100 µM leupeptin, 2 µg mL⁻¹ aprotinin

and 5 mM imidazole). The suspension was sonicated five times for 40 s with resting periods of 2 min between each interval and 32% amplitude, using a ModelVCX 650 Ultrasonic processor (Ultrasonics, Inc.). The homogenate was centrifuged at 21 000 × g for 1 h at 4 °C to obtain the supernatant with the soluble protein. The supernatant was loaded onto a Ni-charged column previously equilibrated with binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 300 mM NaCl and 5 mM imidazole). The recombinant protein (LmPP2C) was purified and eluted with an elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 300 mM NaCl and 50–500 mM imidazole) and the protein concentration was quantified using the Bradford method (Bradford, 1976).

Production of polyclonal antiserum

Anti-LmPP2C antibodies were generated in rabbits as previously described by Montfort and collaborators (Montfort *et al.* 1994). Before the immunization, the rabbits were bled, and pre-immune serum was collected. Briefly, rabbits were injected intramuscularly with 150 µg of recombinant LmPP2C emulsified in complete Freund's adjuvant; the same procedure was repeated 2 weeks later without adjuvant. The immunization was done with two weekly intramuscular injections, after which the animals were bled and antiserum was separated by centrifugation and stored at –20 °C. The pre-immune and immune sera were used for Western blot analysis. Rabbits were housed at the animal facilities of the Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, and their handling was done following the National Ethical Guidelines for Animal Health NOM-062-ZOO-1999 and the guidelines recommended for animal care by the Ethical Committee of the Medical School of the UNAM.

Phosphatase activity assays

p-NPP substrate

Acid phosphatase activity was determined as described by Dissing *et al.* (1979). Briefly, 0.7 µg of recombinant LmPP2C was incubated in the following buffers: 50 mM MES, pH 5–6.5; 50 mM MOPS, pH 7–7.5; 50 mM HEPES, pH 8; 50 mM TRIS, pH 8.5–9 and 50 mM CAPS, pH 10–11 and added to 10 mM MgCl₂ and 10 mM *p*-nitrophenyl phosphate [*p*-NPP] in a final volume of 100 µL for 60 min at 37 °C. Afterwards, the reaction was stopped with 20 µL of 2 N NaOH. The absorbance was read at 405 nm using a micro titre plate reader. Divalent cations (10 mM MgCl₂ or MnCl₂) were added in 50 mM HEPES, pH 8.

Phosphopeptides

Tyrosine and serine/threonine phosphatase activity was assayed using Promega's non-radioactive tyrosine phosphatase assay system. The release of inorganic phosphate (P_i) was monitored by measuring the absorbance of the molybdate-malachite green-phosphate complex. A 0.7 µg of recombinant LmPP2C was incubated in a total volume of 100 µL of assay buffer containing 50 mM HEPES pH 8.0 plus 10 mM MgCl₂. The reaction was started by adding 50 µM Tyr phosphopeptide-1 substrate [END (pY) INASL], 50 µM Thr [RRA (pT)VA] during 30 min at RT and stopped with 50 µL molybdate dye/additive mixture. The optical density of the samples was read at 630 nm, using a curve of phosphates as standard (Aguirre-García *et al.* 2006).

Effect of inhibitors of phosphatases on recombinant LmPP2C

The activity of recombinant LmPP2C (0.7 µg) was analysed in the presence of specific PTP inhibitors such as 200 µM sodium orthovanadate, 200 µM ammonium molybdate and 50 µM sodium

pervanadate. Additionally, serine/threonine phosphatase inhibitors were tested such as 5 nM calyculin and 1 μ M okadaic acid.

Sanguinarine, a specific inhibitor for PP2C, was used at 0.1, 0.5, 1, 5, 10 and 20 μ M. For the inhibition assays, 100 μ L of the reaction mixture was pre-incubated for 15 min at RT before adding the *p*-NPP substrate (all reagents from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and were incubated thereafter for another 60 min at 37 °C. Afterwards, the reaction was stopped with 20 μ L of 2 N NaOH. The absorbance at 405 nm was read using a micro titre plate reader. Recombinant PTP from *Yersinia enterocolitica* (YePTP) was used as a control of PTP activity (purchased from Calbiochem, La Jolla, CA, USA).

SDS-PAGE and Western blot

Identification of the His-Tag in recombinant LmPP2C

Total extract (TE) of bacteria was analysed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in 10% acrylamide gels and then electro transferred to nitrocellulose membranes. The blots were incubated with a polyclonal HRP anti-His₆-Tag antibody at a 1:1000 dilution in TBS-T (200 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20) and washed four times every 10 min with TBS-T.

Identification of PP2C in TEs of *L. (L.) mexicana*, *L. (N.) panamensis*, *L. (N.) braziliensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (N.) donovani*, *L. (L.) amazonensis*, *L. major* promastigotes

All promastigotes were harvested by centrifugation at 2000 \times g for 10 min and then washed three times with PBS. The pellet containing the parasites was suspended in cold lysis buffer (10 mM imidazole pH 7.2, 2 μ g mL⁻¹ leupeptin, 10 μ g mL⁻¹ aprotinin, 2 mM benzamidine) and then sonicated (TE). Afterwards, 10 μ g of TE from different *Leishmania* species and were analysed by SDS-PAGE in 10% acrylamide gel and electro transferred onto nitrocellulose membranes. The PP2C protein was used as a control. These were washed with TBS-T and blocked by treatment with 5% milk in TBS-T for 1 h; then they were incubated with antibodies against LmPP2C using a dilution of 1:1000 in 1% milk in TBS-T overnight at 4 °C. After this incubation, the membranes were washed with TBS-T and incubated with the secondary HRP-goat anti-rabbit IgG antibody (Biomedica, Foster City, CA, USA) at a dilution of 1:5000 in TBS-T with 3% of milk. The membranes were finally washed 10 times in TBS-T.

Bands were detected using enhanced chemiluminescent substrate (Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA), following the manufacturer's instructions.

Fluorescence microscopy

Leishmania major promastigotes were washed with PBS and allowed to adhere to poly-L-lysine-coated cover slides for 90 min. They were then fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 30 min at RT and washed three times with PBS. Afterwards, these cells were permeabilized with 5% triton X-100 and blocked with 5% BSA for 30 min. They were then incubated overnight at 4 °C with antibodies against the recombinant LmPP2C using a 1:100 dilution. The parasites were washed with PBS after the incubation and stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies at a 1:200 dilution. Cells were counterstained with 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at a 1:1000 dilution in PBS. Cover slides were mounted with vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) and observed in a fluorescence microscope (Axioskop 2 mot plus, Carl Zeiss, Germany). The images were recorded in an AxioCam HR digital

camera and processed with the Axiovision software (Carl Zeiss, Version 4.8), (Gomez de Leon *et al.* 2014).

Immunolocalization of PP2C by immune electron microscopy (IEM)

Detection of PP2C in *L. major* promastigotes was achieved by electron microscopy (Gomez de Leon *et al.* 2014). Briefly, promastigotes were washed with PBS and then fixed with a mixture of 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in PBS for 1 h at RT. Once washed, the promastigotes were gradually dehydrated in ethanol and embedded in LR White resin (London Resin, Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA). Promastigotes in resin were deposited in plastic moulds and were polymerized overnight, under ultraviolet light, at 4 °C. Thin sections of the blocks were obtained in an Ultracut E ultra-microtome (Reichert Jung, Austria) and then mounted on Formvar-covered nickel grids. Immunogold labelling was carried out by flotation of the mounted sections on drops of the respective solutions; non-specific labelling was diminished by incubation with 1% skim milk and PBS-T (PBS and 0.05% Tween-20) for 30 min. Grids with the sections were incubated with the antibody against LmPP2C at a 1:10 dilution in PBS-T for 1 h at RT and overnight at 4 °C. Grids were washed with PBS-T and then incubated with a goat anti-rabbit polyclonal antibody coupled to 10 nm gold particles for 2 h at RT (Zymed, Thermo Scientific, PA, USA) (1:40 dilution in PBS-T). After thorough washings in PBS and distilled water, sections were contrasted with 2% uranyl acetate and a saturated solution of lead citrate and then examined with a transmission electron microscope (TEM, JEOL 1400x, JEOL Ltd, Japan). As negative control, sections were incubated with pre-immune rabbit serum diluted in PBS-T and then with the secondary antibody coupled to gold particles.

The identification of the subcellular structures positive for PP2C was performed using thin sections of parasites that were processed to preserve the ultrastructure. (Gomez de Leon *et al.* 2014). Briefly, promastigotes were fixed for 1 h in 2.5% glutaraldehyde. After thorough rinsing in PBS, parasites were post-fixed for 1 h in 1% OsO₄ at 4 °C, rinsed, gradually dehydrated in ethanol, and finally embedded in Spurr's resin. Thin sections were obtained with an Ultracut E ultramicrotome and stained with uranyl acetate and lead citrate. Copper grids with the sections were examined in the TEM at 80 keV. Digital images were obtained and processed with Adobe Photoshop software (USA).

Bioinformatic analysis

Homology modelling was performed using the SWISS-MODEL server (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>); the model was validated with the Mod Eval software version master.e8f19a7 (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/evaluation/>), and the structure obtained was edited using the Swiss-PDBViewer programme version 4.1 (<http://www.expasy.org/spdbv/>). Secondary structure prediction was carried out using PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench version 3.3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Melo *et al.* 2002; Arnold *et al.* 2006; Shen and Sali, 2006; Bordoli *et al.* 2009; Guex *et al.* 2009; Buchan *et al.* 2013; Biasini *et al.* 2014).

Phylogenetic analysis of *L. major* PP2Cs

The non-rooted phylogenetic tree was constructed using the MEGA 6 programme from the alignment of 15 amino acid sequences PP2Cs present in the *L. major* genome with the protein sequence of the LmxM.25.0.750 gene of *L. mexicana* and the protein sequence of the human PP2C (PPM1A, NP_066283.1), which was used as seed.

Results

Cloning, expression and purification of PP2C of *L. major*

In order to determine the primary structure of PP2C homologue from *L. major*, forward and reverse primers were constructed from the sequence of the LmjF.25.0750 gene in TriTrypDB, the database of Trypanosomatids (tritrypdb.org). A fragment of 1200 bp was amplified from *L. major* DNA using PCR. The pET-23b (+) expression vector containing a C-terminal His₆ Tag was transformed into BL21 strain of *Escherichia coli* for expression and purification of the PP2C fusion protein. The transformed BL21 cells were grown and induced with 1 mM IPTG for 3 h at 30 °C, the recombinant protein was observed in gels stained with Coomassie blue (Fig. 1A, lanes 2 and 3), in contrast to cells in which the expression of the protein was not induced (Fig. 1A, lane 1). The presence of the histidine tag in the recombinant protein was verified by Western blot with specific antibodies that recognized the C-terminal His₆ Tag (Fig. 1B, lanes 2 and 3), which was negative in non-induced cells (Fig. 1B, lane 1). TE of

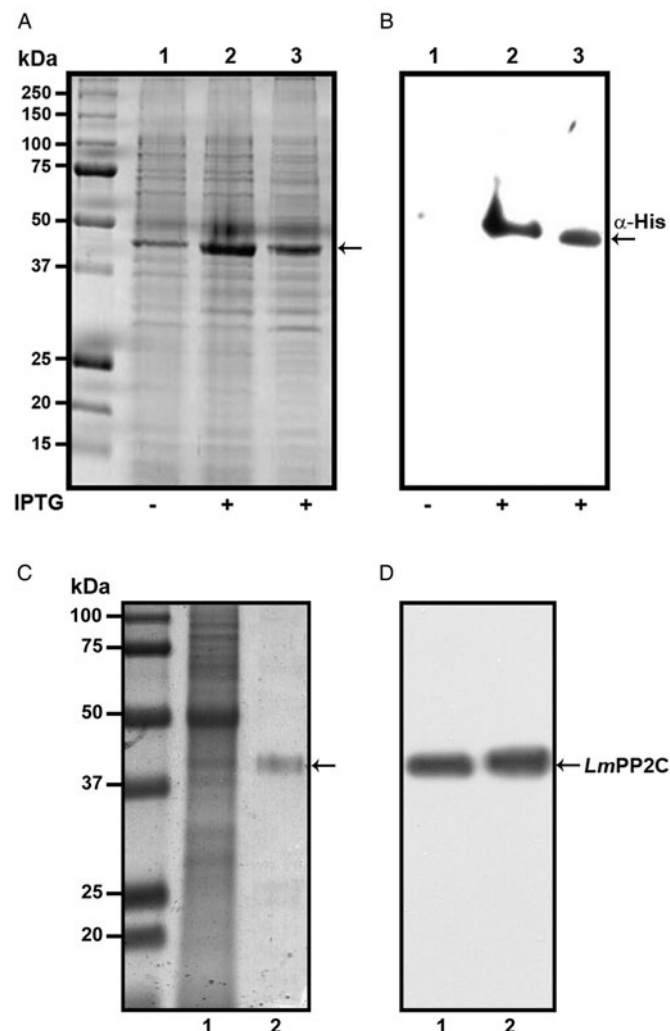


Fig. 1. Expression, purification and identification of PP2C of *Leishmania major* (*Lm* PP2C). (A) Expression of *Lm* PP2C in different fractions of *Escherichia coli* cells. Crude extract prepared from non-induced *E. coli* cells BL21 (1), *E. coli* cells induced with IPTG (2) and supernatant (3). SDS-PAGE gel was stained with Coomassie-blue dye. (B) Western blot analysis of the same sample used above: crude extract prepared from non-induced *E. coli* cells BL21 (1), *E. coli* cells induced with IPTG (2) and supernatant (3). The C-terminal His-Tag was detected using a monoclonal antibody. (C) SDS-PAGE gel of TE of *L. major* (1) and *Lm* PP2C purified (2) were stained with Coomassie Blue. (D) Western blot of TE of *L. major* (1), and purified *Lm* PP2C (2), using polyclonal antibodies against *Lm* PP2C.

L. major promastigotes and recombinant protein were analysed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue (Fig. 1C, lanes 1 and 2). This result showed that the purified protein had the expected molecular mass of 44.9 kDa. The anti-*Lm*PP2C antibodies were checked by Western blot using TE of *L. major* and purified *Lm*PP2C. These antibodies recognized a 44.9 kDa protein in both samples (Fig. 1D, lanes 1 and 2).

Multiple sequence alignment

Using Clustal W multiple-sequence alignment, the sequence of the cloned *Lm*PP2C revealed that it has 98% similarity with the sequence of PP2C of *L. chagasi*. It also demonstrated that the complete *Lm*PP2C open reading frame shares 11 distinct conserved motifs in the enzymes belonging to this family (Fig. 2A).

Furthermore, both *Hs*PP2C and *Lm*PP2C have conserved amino acids for catalytic activity such as: the aspartic acid residues involved in the coordination of Mg⁺² and Mn⁺² cations. The catalytic site of PP2C is localized in a cleft between two central β sheets formed by aspartic acids D38, D55, D221, D265, arginine R33 and glutamic acid E37 (Fig. 2B). Identical residues were identified at these positions in all aligned sequences (Fig. 2A). These residues were confirmed to be present in *Lm*PP2C.

Phylogenetic tree analysis

To compare the protein LmjF.25.0750 analysed in this work with the members of the PP2C in *L. major* family and for the identification of conserved residues, a multiple-sequence alignment was constructed using the 15 *L. major* PP2C, LmxM.25.0750 and the human PP2C (PPM1A). Similarity relationships among the amino acids sequences were obtained and we identified characteristic motifs preserved by evolution. A total of 11 conserved signature motifs were identified that seem to correspond to structural elements and exposed functional residues of PP2C proteins (data not shown). To investigate the phylogenetic relationships of PP2C genes between *L. major* phosphatases, *L. mexicana* PP2C and the human PPM1A, we constructed a phylogenetic tree based on the alignments of PP2C domains using the maximum likelihood method. The phylogenetic analyses indicated that the 15 *Lm*PP2C proteins were divided into four groups (Fig. 2C, I–IV). The LmjF 25.0750 recombinant protein clustered together with LmxM.25.0750 (Fig. 2C, III), while the nine Lmj phosphatases formed an independent group (Fig. 2C, IV). There was a cluster of three proteins in group I, whereas LmjF 36.1230 was in an independent branch (Fig. 2C, II).

Biochemical characterization of *Lm*PP2C

Cation dependence

Phosphatases PP2C are usually monomeric enzymes that require metal cations such as Mg⁺² or Mn⁺² for their enzymatic activity. We analysed the activity of *Lm*PP2C with the substrate *p*-NPP in the presence or absence of divalent cations. We observed that *Lm*PP2C showed higher phosphatase activity in the presence of MnCl₂, compared with MgCl₂ (Fig. 3A).

Substrate specificity

Substrate specificity was tested by dephosphorylation assays using peptides phosphorylated in tyrosine and threonine residues. It was observed that *Lm*PP2C dephosphorylate preferentially the threonine substrate (Fig. 3B), whereas the tyrosine substrate was not dephosphorylated.

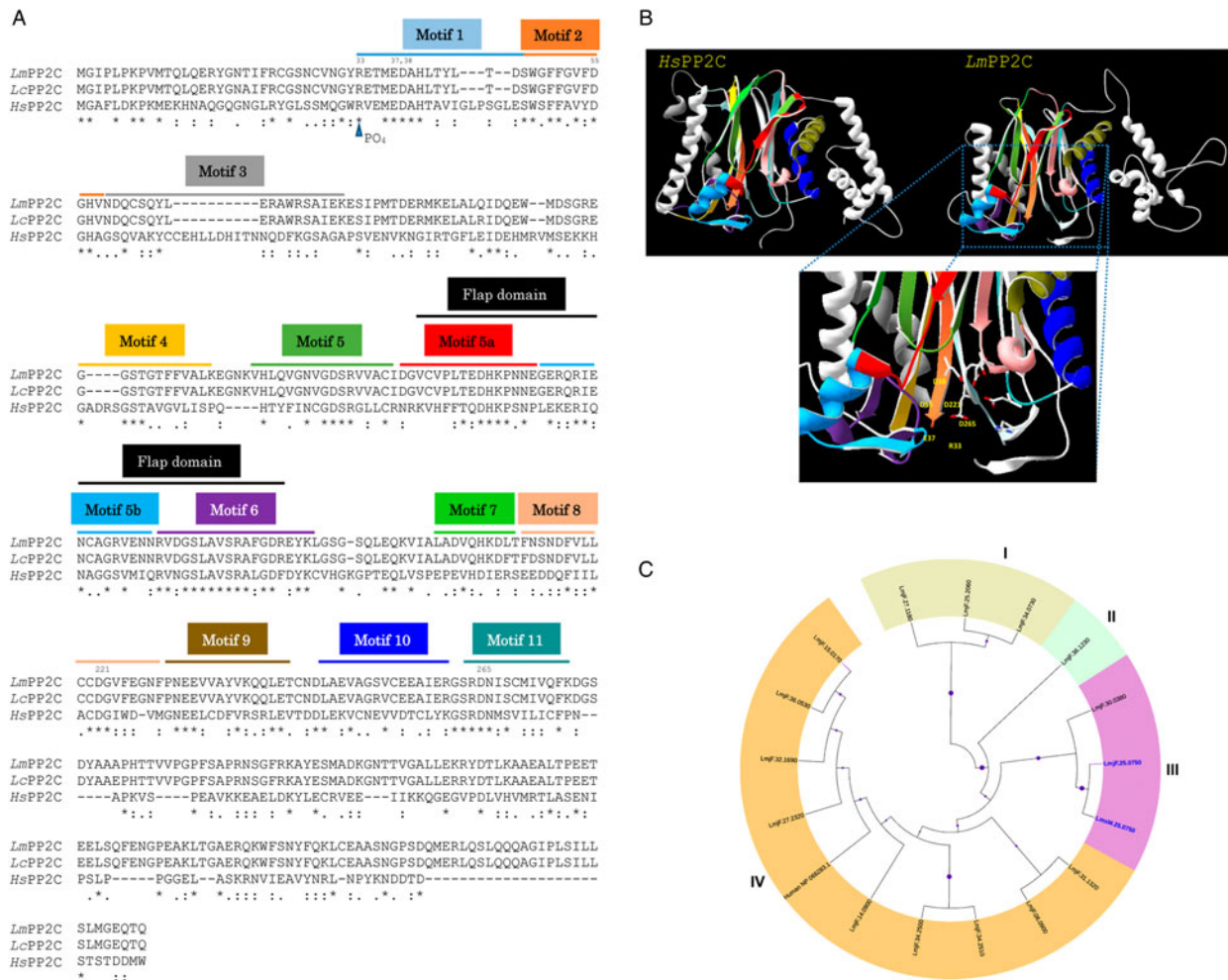


Fig. 2. Multiple sequence alignments of human, *Leishmania major* and *Leishmania chagasi* PP2C and phylogenetic analysis of *L. major* PP2Cs. (A) Multiple sequence alignment of Human PP2C (HsPP2C), *L. major* (LmPP2C) and *L. chagasi* (LcPP2C). Alignment of the catalytic domain sequences was performed using the programme CLUSTAL W. The most important residues of the three PP2C are indicated with numbers and motifs with colours: motif 1 (blue line), motif 2 (orange line), motif 3 (grey line), motif 4 (yellow line), motif 5 (dark green line), the Flap domain is indicated by a black line. Motifs 5a and 5b are shown with a red and dark blue line respectively, motif 6 (purple line), motif 7 (clear green line), motif 8 (pink line), motif 9 (brown line), motif 10 (blue line) and motif 11 (water green line). (B) Ribbon diagram of HsPP2C and LmPP2C. The catalytic site of LmPP2C was amplified, showing the important amino acids. (C) Phylogenetic analysis of *L. major* PP2Cs. The non-rooted phylogenetic tree was constructed in the MEGA 6 programme from the alignment of 15 amino acid sequences PP2Cs present in the *L. major* genome with the protein sequence of the LmxM.25.0.750 gene of *Leishmania mexicana* and the protein sequence of the human PPM1A (NP_066283.1). Seventeen proteins were grouped into four groups and designated with different colour (I–IV). The evolutionary history was inferred using the maximum probability, method based on the Le_Gascuel_2008 model.

Optimum pH

The influence of pH on the enzymatic activity for recombinant LmPP2C was evaluated using two different substrates: *p*-NPP and the phosphothreonine peptide [RRA (pT) VA] in different buffers. The results showed that the optimal activity of PP2C phosphatase reached at pH 8.5 using *p*-NPP as substrate, while the phosphothreonine substrate showed the maximum at pH 7 (Fig. 3C).

Effect of various inhibitors of phosphatases on the activities of LmPP2C

In order to characterize if the phosphatase activity is due to PTP or PP2C activity, we used different phosphatase inhibitors: orthovanadate, molybdate and pervanadate for PTP and calyculin, okadaic acid and sanguinarine for serine/threonine phosphatases.

LmPP2C was not inhibited by the specific PTP inhibitors (Fig. 4A), which contrasts with the YePTP that was completely inhibited by these compounds (Fig. 4A). Calyculin and okadaic acid did not inhibit LmPP2C or YePTP (Fig. 4A). However, sanguinarine, the specific inhibitor of PP2C activity, inhibited

LmPP2C in a dose-dependent manner (0–20 μ M), with a complete inhibition at a concentration of 10 μ M (Fig. 4B).

Western blot reactivity of recombinant LmPP2C

Antibodies were prepared against the recombinant LmPP2C (α -LmPP2C) and used to identify the PP2C protein in TE promastigotes from different *Leishmania* species: *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (V.) donovani*, *L. (L.) amazonensis*, *L. major* and LmPP2C. In all *Leishmania* species, a 44.9 kDa protein was identified (Fig. 5A, lanes 1–7) which had the same molecular mass as LmPP2C (Fig. 5A, lane 8). Tubulin, as a loading control, was included in the same experiment.

Immunolocalization of PP2C in *L. major* promastigotes by immunofluorescence

The analysis of the distribution of the PP2C in promastigotes of *L. major* was performed by indirect immunofluorescence. Parasites were observed using phase contrast microscopy (Fig. 5B, panel a).

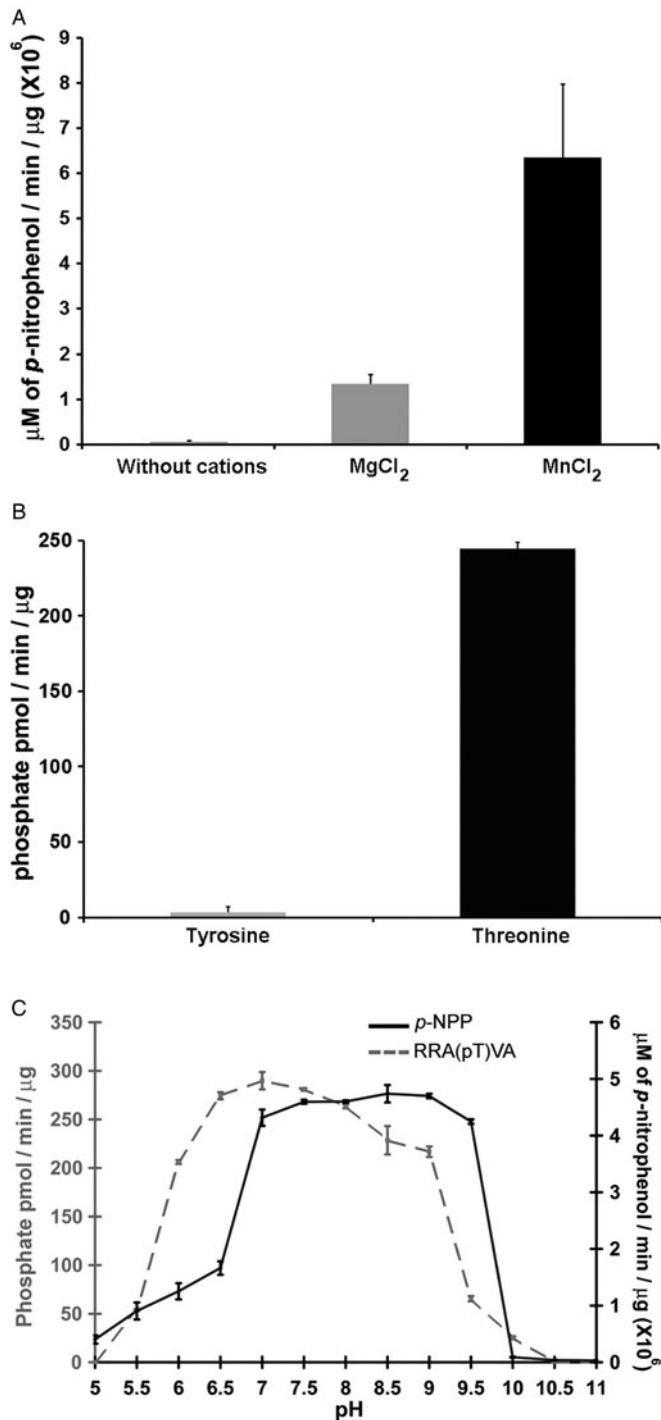


Fig. 3. Biochemical characterization of *LmPP2C*. (A) The effect of MgCl₂ and MnCl₂ on *LmPP2C* activity was measured under standard conditions using *p*-NPP 10 mM as a substrate. (B) Hydrolysis of [END (pY) INASL] and Thr [RRA (pT) VA] by *LmPP2C*. (C) Determination of optimum pH for the activity of *LmPP2C*. *PP2C* was incubated with the appropriate buffers at different pH (5–11) in the presence of 10 mM MgCl₂ and different substrates: *p*-NPP and RRA(pT) VA.

The nucleus was stained with DAPI (Fig. 5B, panel b). In several parasites, the distribution of PP2C showed a fluorescent pattern confined to the flagellum and to the flagellar pocket (big arrows). Interestingly, some parasites exhibited a three-band pattern located in the cell body (small arrows) without staining of the flagella (Fig. 5B, panel c). The merge of both: nuclei and PP2C labelling, is shown in panel d (Fig. 5B). The negative control with pre-immune serum showed no labelling of the parasite (data not shown).

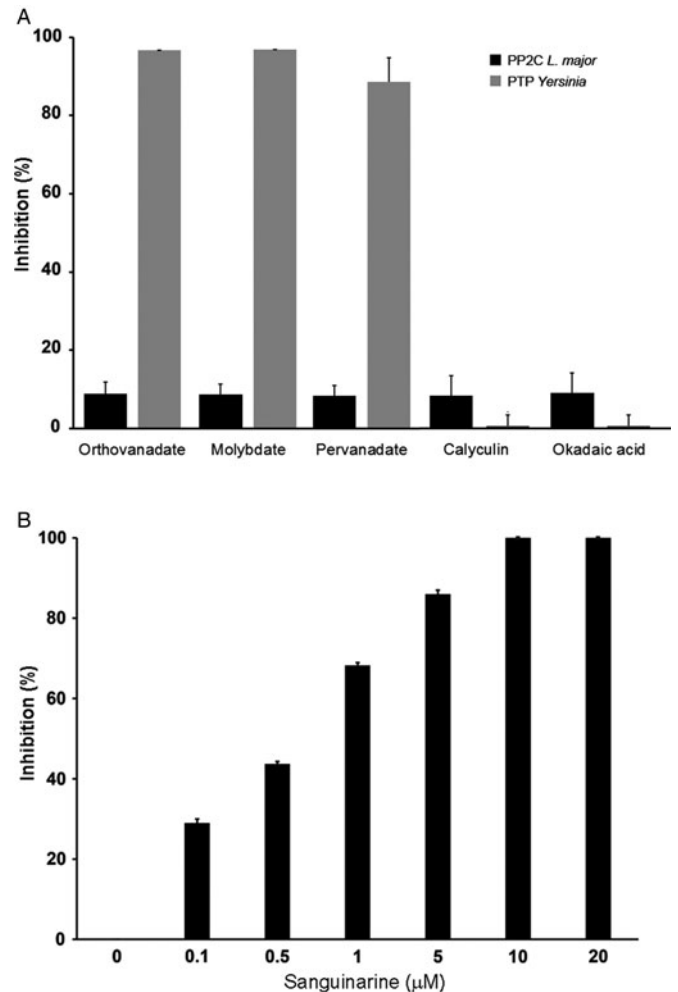


Fig. 4. Effect of different inhibitors on *LmPP2C* and *YePTP* activities. (A) Inhibitors of PTP (orthovanadate, molybdate and pervanadate) and inhibitors of serine threonine phosphatases (calyculin and okadaic acid) were incubated with *LmPP2C*, and *YePTP* and phosphatase activity was analysed by *p*-NPP. (B) An inhibitor of the PPM family (sanguinarine) was incubated at different concentrations with *LmPP2C*. The bars represent the mean values of the per cent relative activity obtained separately in three different experiments.

Ultrastructural localization of PP2C in promastigotes of *L. major*

The distribution of PP2C in promastigotes of *L. major*, studied by IEM using α -*LmPP2C*, showed labelling of the flagellum and the flagellar pocket (Fig. 6C–E). In order to determine precise location of the immune gold labelling, fine structure images of the flagellar pocket and the flagellum were done in longitudinal and transverse sections (Fig. 6A and B). Negative controls with pre-immune serum showed no labelling of any structure of the parasite (data not shown).

Discussion

In recent years, the number of PP2C family members has grown steadily, and more interesting features, phenotypes and potential clinical applications have been described for the family of phosphatases. Orthologs of human PP2C can be found in virtually all organisms, ranging from mammals, insects, plants, bacteria and yeasts to parasites. This conservation throughout evolution indicates that these enzymes probably play important roles in regulating key cellular signalling events (Su and Forchhammer, 2013). The genome of *L. major* was reported in 2005 (Ivens *et al.*, 2005), and 2 years later, the first analysis of catalytic domains of

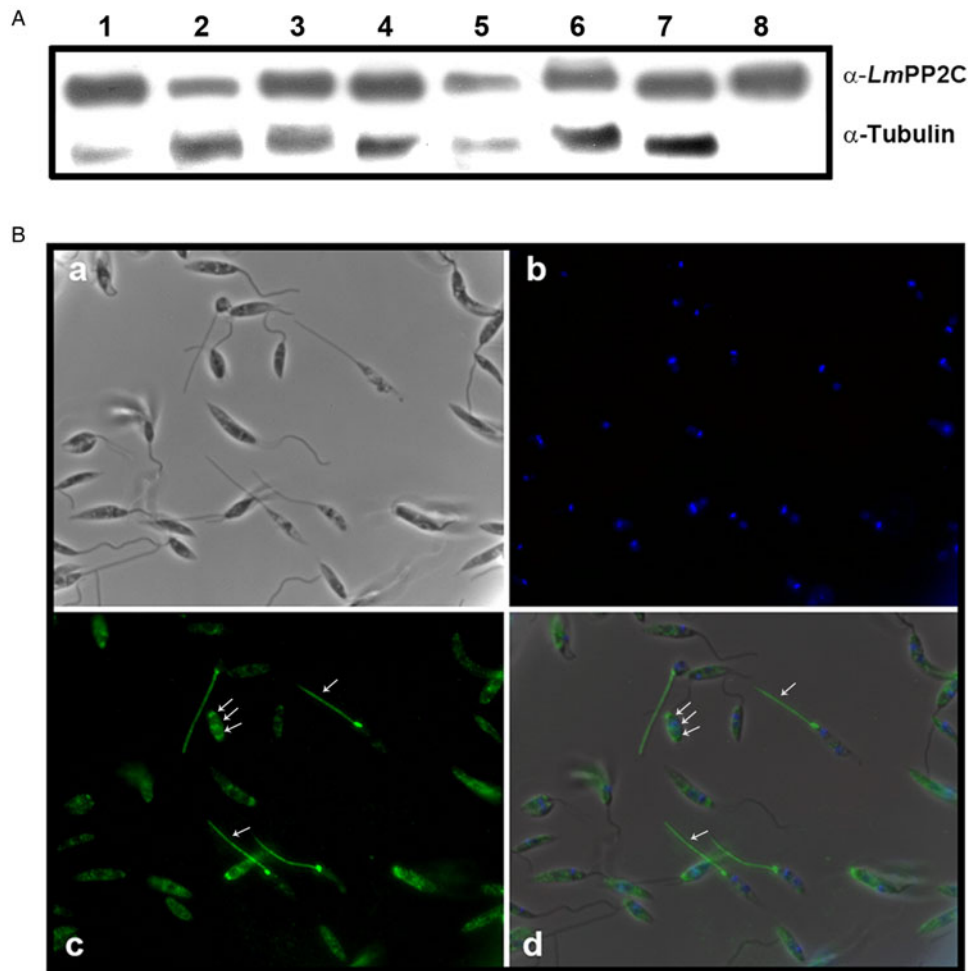


Fig. 5. PP2C: immunodetection in TE promastigotes from different *Leishmania* species and immunolocalization in promastigotes. (A) Immunodetection of PP2C protein in TE promastigotes from *Leishmania* (*L.*) *mexicana* (1), *Leishmania* (*V.*) *panamensis* (2), *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* (3), *Leishmania* (*L.*) *venezuelensis* (4), *Leishmania* (*V.*) *donovani*(5), *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* (6), *Leishmania major* (7), promastigotes *Lm* PP2C recombinant was used as control (lane 8). Tubulin as a loading control. (B) Immunolocalization of PP2C in *L. major* promastigotes by immunofluorescence microscopy. Parasites were observed in phase contrast (panel a), the nucleus was stained with DAPI (panel b). Distribution of *Lm* PP2C was determined by using an antibody against PP2C and then evidenced with a secondary antibody conjugated to FITC (panel c). Inset d represents the merge of the different staining conditions. Scale bar = 5 μ m.

protein phosphatases in Trypanosomatids was also reported. The authors identified 86 phosphatases in *Trypanosoma cruzi*, 78 in *Trypanosoma brucei* and 88 in *L. major*. In the case of *L. major*, 58 serine/threonine phosphatases were reported, of which 30 were from the PPP family, 13 were phosphatases that dephosphorylate the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II (F-cell production eukaryotic-like phosphatases) and 15 were PP2C eukaryotic-like phosphatases (Brenchley *et al.* 2007). Currently, the function of each of the 15 different PP2C from *L. major* is unknown.

In the present work, we cloned PP2C from *L. major* and generated a recombinant His-Tag PP2C fusion protein. *Lm*PP2C was expressed in BL21 *E. coli* cells and purified. The biochemical characterization of *Lm*PP2C showed it had a molecular mass of 44.9 kDa, an activity optimum at alkaline pH, that it could specifically dephosphorylate a threonine substrate and had a dependence on divalent cations (Mg^{+2} and Mn^{+2}) for enzymatic activity; all of which are also biochemical characteristics of PP2C from mammalian cells. In all the PP2C, the catalytic domains are important because they include conserved motifs that contain invariant residues involved in the binding of the two metal cations (D42, 66, 202 and 240) and on the phosphate group of the substrate (R37) (Das *et al.* 1996). Alignment of the phosphatase domains of *T. gondii* with other PP2C proteins showed an absence of two conserved aspartic acid residues that are important for metal binding

and typical PP2C activity (Gilbert *et al.* 2007). The absence of these residues caused that the recombinant PP2C protein showed low metal-dependent phosphatase activity.

Examination of the primary sequence of *Lm*PP2C shows homology to other PP2C proteins. Additionally, the conservation of the essential catalytic residues between human PP2C (*Hs*PP2C) and *Lm*PP2C suggests that the latter is a PP2C from the PPM family. The analysis of sequences for the PPM phosphatase proteins has identified 11 motifs, which are also conserved between the different phosphatases. The sequence alignment of *Lm*PP2C with the consensus sequences of *Hs*PP2C and *Lc*PP2C phosphatases indicated that *Lm*PP2C contains also 11 conserved motifs characteristic of PP2C. In other microorganisms, such as bacteria, it has been observed that motifs 5a and 5b (Flap domain) of the PP2C protein are absent, thus affecting the enzymatic activity (Schlicker *et al.* 2008). On the other hand, PP2C α has a Flap domain, which is inserted between strands β 8 and β 9 of the catalytic domain (Das *et al.* 1996; Pullen *et al.* 2004; Schlicker *et al.* 2008). This domain, with conserved motifs 5a and 5b, is found in PP2C phosphatases, like the mitochondrial PDP and the phosphatase domains of fungal adenylate cyclases, but is absent in bacterial SpoIIE-type phosphatases (Kennelly, 2001; Pullen *et al.* 2004). The function of the Flap domain is uncertain, but appears to be involved in substrate recognition (Schlicker *et al.* 2008; Su *et al.* 2011).

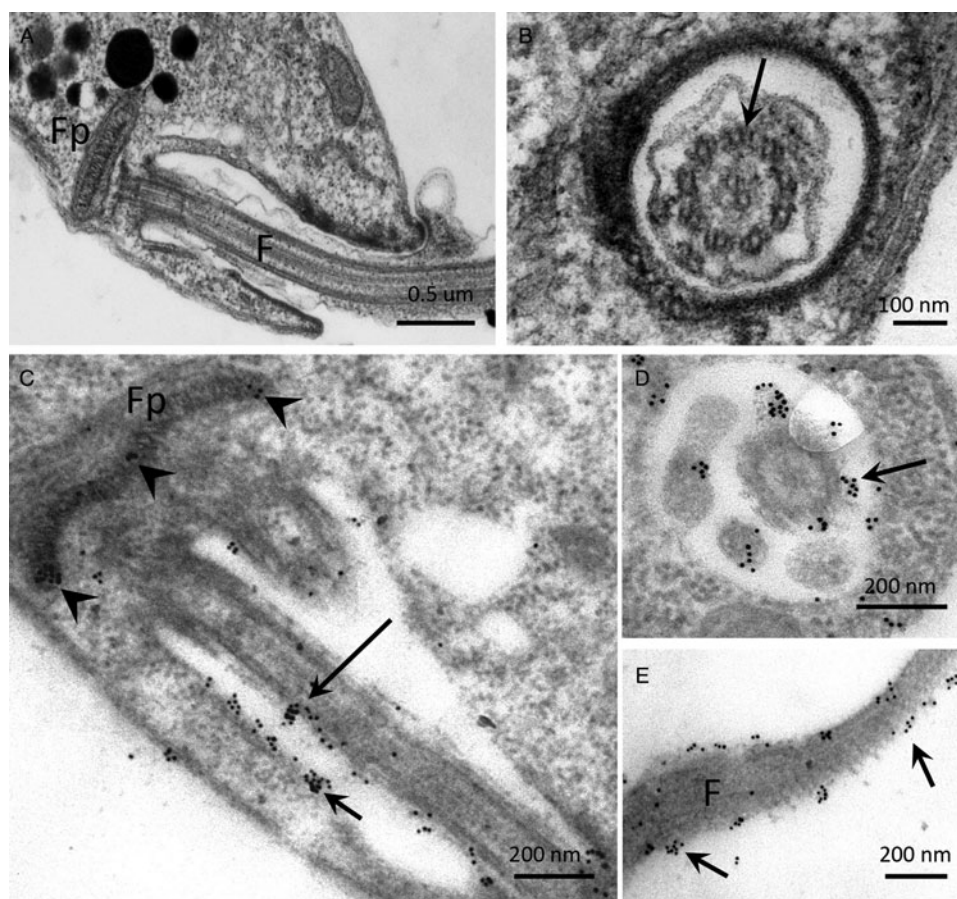


Fig. 6. IEM localization of *LmPP2C* in promastigotes. Insets (A) and (B) correspond to controls of ultrastructure of the flagellar pocket of promastigotes seen in longitudinal and transverse thin sections, respectively. Insets (D, E) correspond to the immuno-gold labelling of the *LmPP2C* in magnified zones of the promastigote in longitudinal (inset C) and transverse (inset D) views of the flagellar pocket. Inset (E) corresponds to the labelling of *LmPP2C* in a magnified zone of the flagellum. Scale bar = 200 nm.

The phylogenetic analysis showed that the 15 *L. major* PP2C are clustered in four groups. Surprisingly, the recombinant protein LmjF.25.0750 and the different species LmxM.25.0750 are grouped in the same cluster suggesting that they share a common ancestor, and, more distant in the same cluster, is LmjF.30.0380. The groups in the phylogenetic tree of PP2C represent proteins with highly similar sequences; however, to the best of our knowledge, there are no reports of their structure, localization in the parasite or functional results.

Using a general substrate for phosphatases, *LmPP2C* showed a strong preference for Mn^{+2} , in comparison to Mg^{+2} . The preference for this cation has also been observed in other PP2C enzymes like the STP1 phosphatases of *Streptococcus agalactiae* and *Pseudomonas aeruginosa* (Mukhopadhyay *et al.* 1999; Rajagopal *et al.* 2003). *In vitro* assays using *p*-NPP as a substrate showed that the highest specific activity of *LmPP2C* was at pH 8.5 in the presence of Mg^{+2} ; however, when using phosphotreonine, the optimal pH was observed at 7.0. It is well known that PP2C of pathogenic microorganisms show alkaline optimal pH, as has been observed in Prp C from *Bacillus subtilis* and PPC6803 from *Synechocystid* (Obuchowski *et al.* 2000; Ruppert *et al.* 2002). For *LmPP2C*, both divalent cations (Mg^{+2} and Mn^{+2}) are important for catalytic activity at alkaline pH.

We show novel data on the ultrastructural localization of PP2C in *L. major* promastigotes, which was found in the flagellum, the flagellar pocket and in the micro axoneme. The heterogeneous staining pattern of the parasites may be due to different development stages of the parasite, since the culture was not synchronized. In other Trypanosomatid parasites, such as *Trypanosoma*

rangeli, a PTP was reported to be associated with the parasite flagellum, yet the function remains unknown (Prestes *et al.* 2012). In most of these cells, the PP2C enzymes are mainly localized in the cytosol, and in the case of *T. gondii*, the parasite also uses secretion from the rhoptries during invasion, in order to deliver a parasite-derived PP2C into the host cell and target it to the host nucleus (Gilbert *et al.* 2007).

The localization of PP2C in the flagellum of *L. major*, an important structure for differentiation in Trypanosomatids, is noteworthy since the phosphatase could potentially exert a regulatory function within this organelle. Yet the role of *L. major* PP2C remains to be established and functional tests are warranted to determine its biological role in the parasite.

Acknowledgements. This work is one of the requirements to obtain the Ph.D. degree in Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM) for Alma Reyna Escalona Montaño who was the recipient of doctoral fellowship from CONACyT México (fellowship165409, CVU 165409).

The authors gratefully acknowledge Marco Gudiño Zayas, Norma Salaiza Suazo, José Delgado Domínguez, Marco Benítez Rosas, Rocely Cervantes Sarabia, Augusto González Canto, Arturo Wilkins Rodríguez and Angélica Leticia Serrano Ahumada for technical assistance from the Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. Thanks to Mónica Mondragón, Ricardo Mondragón González and Sirenia González from the Biochemistry Department and Electron Microscopy Facility-LANSE, respectively, at CINVESTAV, México, for the technical support.

Financial support. This work was supported partially by grants 152433 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of México and IN220816 from DGAPA-PAPIIT to MMAG.

References

- Aguirre-Garcia MM, Escalona-Montano AR, Bakalara N, Perez-Torres A, Gutierrez-Kobeh L and Becker I (2006) *Leishmania major*: detection of membrane-bound protein tyrosine phosphatase. *Parasitology* **132**, 641–649.
- Andreeva AV and Kutuzov MA (2004) Widespread presence of ‘bacterial-like’ PPP phosphatases in eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology* **4**, 47.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J and Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195–201.
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Gallo Cassarino T, Bertoni M, Bordoli L and Schwede T (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research* **42**, W252–W258.
- Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J and Schwede T (2009) Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols* **4**, 1–13.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Brenchley R, Tariq H, McElhinney H, Szoor B, Huxley-Jones J, Stevens R, Matthews K and Taberner L (2007) The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics* **8**, 434.
- Buchan DW, Minnici F, Nugent TC, Bryson K and Jones DT (2013) Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research* **41**, W349–W357.
- Burns JM Jr, Parsons M, Rosman DE and Reed SG (1993) Molecular cloning and characterization of a 42-kDa protein phosphatase of *Leishmania chagasi*. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 17155–17161.
- Cohen P (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology* **4**, E127–E130.
- Das AK, Helps NR, Cohen PT and Barford D (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *The EMBO Journal* **15**, 6798–6809.
- Dissing J, Dahl O and Svensmark O (1979) Phosphonic and arsonic acids as inhibitors of human red cell acid phosphatase and their use in affinity chromatography. *Biochimica et Biophys Acta* **569**, 159–176.
- Gilbert LA, Ravindran S, Turetzky JM, Boothroyd JC and Bradley PJ (2007) *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryotic Cell* **6**, 73–83.
- Gomez de Leon CT, Diaz Martin RD, Mendoza Hernandez G, Gonzalez Pozos S, Ambrosio JR and Mondragon Flores R (2014) Proteomic characterization of the subpellicular cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Journal of Proteomics* **111**, 86–99.
- Guex N, Peitsch MC and Schwede T (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis* **30** (Suppl. 1), S162–S173.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Dueterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Muller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O’Neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabinowitz E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schafer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B and Myler PJ (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**, 436–442.
- Kennelly PJ (2001) Protein phosphatases – a phylogenetic perspective. *Chemical Reviews* **101**, 2291–2312.
- Kumar KA, Garcia CR, Chandran VR, Van Rooijen N, Zhou Y, Winzler E and Nussenzweig V (2007) Exposure of plasmodium sporozoites to the intracellular concentration of potassium enhances infectivity and reduces cell passage activity. *Molecular and Biochemical Parasitology* **156**, 32–40.
- Lammers T and Lavi S (2007) Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **42**, 437–461.
- Mamoun CB, Sullivan DJ Jr, Banerjee R and Goldberg DE (1998) Identification and characterization of an unusual double serine/threonine protein phosphatase 2C in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 11241–11247.
- Melo F, Sanchez R and Sali A (2002) Statistical potentials for fold assessment. *Protein Science: a Publication of the Protein Society* **11**, 430–448.
- Mitula F, Tajdel M, Ciesla A, Kasprowicz-Maluski A, Kulik A, Babula-Skowronska D, Michalak M, Dobrowolska G, Sadowski J and Ludwikow A (2015) Arabidopsis ABA-activated kinase MAPKKK18 is regulated by protein phosphatase 2C ABI1 and the ubiquitin-proteasome pathway. *Plant & Cell Physiology* **56**, 2351–2367.
- Montfort I, Perez-Tamayo R, Perez-Montfort R, Gonzalez Canto A and Olivos A (1994) Purification and immunologic characterization of a 30-kDa cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research* **80**, 607–613.
- Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L and Ulke-Lemee A (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 234–244.
- Mukhopadhyay S, Kapatral V, Xu W and Chakrabarty AM (1999) Characterization of a Hank’s type serine/threonine kinase and serine/threonine phosphoprotein phosphatase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **181**, 6615–6622.
- Obuchowski M, Madec E, Delattre D, Boel G, Iwanicki A, Foulger D and Seror SJ (2000) Characterization of PrpC from *Bacillus subtilis*, a member of the PPM phosphatase family. *Journal of Bacteriology* **182**, 5634–5638.
- Prestes EB, Bayer-Santos E, Hermes Stoco P, Sincero TC, Wagner G, Umaki A, Frago SP, Bordignon J, Steindel M and Grisard EC (2012) *Trypanosoma rangeli* protein tyrosine phosphatase is associated with the parasite’s flagellum. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **107**, 713–719.
- Pullen KE, Ng HL, Sung PY, Good MC, Smith SM and Alber T (2004) An alternate conformation and a third metal in PstP/Ppp, the *M. tuberculosis* PP2C-family Ser/Thr protein phosphatase. *Structure* **12**, 1947–1954.
- Rajagopal L, Clancy A and Rubens CE (2003) A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 14429–14441.
- Ruppert U, Irmeler A, Kloft N and Forchhammer K (2002) The novel protein phosphatase PphA from *synechocystis* PCC 6803 controls dephosphorylation of the signalling protein PII. *Molecular Microbiology* **44**, 855–864.
- Schlicker C, Fokina O, Kloft N, Grune T, Becker S, Sheldrick GM and Forchhammer K (2008) Structural analysis of the PP2C phosphatase tPphA from *Thermosynechococcus elongatus*: a flexible flap subdomain controls access to the catalytic site. *Journal of Molecular Biology* **376**, 570–581.
- Schweighofer A, Hirt H and Meskiene I (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Science* **9**, 236–243.
- Shen MY and Sali A (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science: a Publication of the Protein Society* **15**, 2507–2524.
- Su J and Forchhammer K (2013) Determinants for substrate specificity of the bacterial PP2C protein phosphatase tPphA from *Thermosynechococcus elongatus*. *The FEBS Journal* **280**, 694–707.
- Su J, Schlicker C and Forchhammer K (2011) A third metal is required for catalytic activity of the signal-transducing protein phosphatase M tPphA. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 13481–13488.
- Wang B, Zhang P and Wei Q (2008) Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases. *Science in China. Series C, Life Sciences/Chinese Academy of Sciences* **51**, 487–494.